

UNIVERSIDAD DE GRANADA

AREA DE PSICOBIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGÍA EXPERIMENTAL Y FISIOLOGÍA DEL
COMPORTAMIENTO.



**EFFECTOS COMPORTAMENTALES DE LA ACTIVACIÓN DEL
COMPLEJO PARABRAQUIAL TRONCOENCEFÁLICO:
RELEVANCIA DEL SUBNUCLEO LATERAL EXTERNO EN EL
APRENDIZAJE ESPACIAL Y GUSTATIVO INDUCIDO
POR ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA O ADMINISTRACION
ENTERAL DE NUTRIENTES**

MARIA JOSÉ SIMÓN FERRE

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

CERTIFICA: Que la presente Tesis Doctoral titulada “EFECTOS COMPORTAMENTALES DE LA ACTIVACIÓN DEL COMPLEJO PARABRAQUIAL TRONCOENCEFÁLICO: RELEVANCIA DEL SUBNUCLEO LATERAL EXTERNO EN EL APRENDIZAJE ESPACIAL Y GUSTATIVO INDUCIDO POR ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA O ADMINISTRACION ENTERAL DE NUTRIENTES” ha sido realizada por la doctoranda Maria José Simón Ferre en el Laboratorio de Psicobiología del Departamento de Psicología Experimental y Fisiología del Comportamiento de la Universidad de Granada, bajo mi dirección.

Y para que así conste, expido el presente que firmo en Granada a 28 de Abril de 2003.

Fdo. D. Amadeo Puerto Salgado

D^a FILOMENA MOLINA VALERO, Profesora Titular del Area de Psicobiología de la Universidad de Granada

CERTIFICA: Que la presente Tesis Doctoral titulada “EFECTOS COMPORTAMENTALES DE LA ACTIVACIÓN DEL COMPLEJO PARABRAQUIAL TRONCOENCEFÁLICO: RELEVANCIA DEL SUBNUCLEO LATERAL EXTERNO EN EL APRENDIZAJE ESPACIAL Y GUSTATIVO INDUCIDO POR ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA O ADMINISTRACION ENTERAL DE NUTRIENTES” ha sido realizada por la doctoranda Maria José Simón Ferre en el Laboratorio de Psicobiología del Departamento de Psicología Experimental y Fisiología del Comportamiento de la Universidad de Granada, bajo mi dirección.

Y para que así conste, expido el presente que firmo en Granada a 28 de Abril de 2003.

Fdo. D^a. Filomena Molina Valero

**EFFECTOS COMPORTAMENTALES DE LA ACTIVACIÓN DEL
COMPLEJO PARABRAQUIAL TRONCOENCEFÁLICO:
RELEVANCIA DEL SUBNUCLEO LATERAL EXTERNO EN EL
APRENDIZAJE ESPACIAL Y GUSTATIVO INDUCIDO POR
ESTIMULACION ELECTRICA O ADMINISTRACION
ENTERAL DE NUTRIENTES**

María Jose Simón Ferre

Area de Psicobiología

Departamento de Psicología Experimental y Fisiología del Comportamiento

TESIS DOCTORAL

Directores: D. Amadeo Puerto Salgado y D^a. Filomena Molina Valero

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Junio 2003

INDICE GENERAL:

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

I-	Sistemas Motivacionales y Refuerzo.....	3
II-	Nutrición, Refuerzo y Preferencias Gustativas.....	15
III-	Sistemas Neuroquímicos, Ingesta y Refuerzo.....	41
IV-	Sustancias de abuso y Refuerzo / Recompensa	65
V-	AEIC y Mecanismos de Refuerzo / Recompensa.....	79
VI-	Mecanismos de Refuerzo, Analgesia y Dolor.....	85
VII-	Implicación del S. Mesocorticolímbico en la Motivación Aversiva	91
VIII-	El Complejo Parabraquial: Citoarquitectura y Conexiones.....	103
IX-	Hipótesis de trabajo.....	123

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

CAPÍTULO I:	131
<i>Experimento 1: Preferencias Gustativas Inducidas por Estimulación Eléctrica del Núcleo Parabraquial Lateral Externo en una Tarea de Aprendizaje Discriminativo Gustativo.....</i>	133
Método.....	139
Resultados.....	148
Discusión.....	150
CAPÍTULO II:	159
<i>Experimento 2: Preferencias y Aversiones Gustativas Inducidas por Estimulación Eléctrica del Núcleo Parabraquial Lateral Externo en Tareas de Aprendizaje Discriminativo Gustativo.....</i>	161
Método.....	164
Resultados.....	169
Discusión.....	172
CAPÍTULO III:.....	177
<i>Experimento 3: Efecto de las Lesiones del Núcleo Parabraquial Lateral Externo en la Adquisición de Preferencias Gustativas Inducidas por la</i>	

Administración de Alimentos Predigeridos en Pruebas de Aprendizaje Discriminativo Gustativo Concurrente.....	179
Método.....	184
Resultados.....	190
Discusión.....	192
<i>Experimento 4: Efecto de las Lesiones del Núcleo Parabraquial Lateral Externo en la Adquisición de Preferencias Gustativas Inducidas por la Administración de Alimentos Predigeridos en Pruebas de Aprendizaje Discriminativo Gustativo Secuencial.....</i>	193
Método.....	193
Resultados.....	197
Discusión.....	199
Discusión General.....	201
CAPÍTULO IV:.....	207
<i>Experimento 5: Efectos de la Estimulación Eléctrica del Núcleo Parabraquial Lateral Externo en una Tarea de Aprendizaje Espacial.....</i>	209
Método.....	213
Resultados.....	217
Discusión.....	221
CAPÍTULO V:.....	229
Introducción.....	231
<i>Experimento 6: Efectos de la Estimulación Eléctrica de los Núcleos Parabraquial Lateral Externo e Hipotálamo Lateral en Tareas de Aprendizaje Espacial.....</i>	235
Método.....	235
Resultados.....	239
Discusión.....	243
<i>Experimento 7: Hipotálamo Lateral y Núcleo Parabraquial Lateral Externo en relación con el Fenómeno de la Autoestimulación Eléctrica Intracerebral.....</i>	245
Método.....	246
Resultados.....	249

Discusión.....	250
Discusión General.....	251
CAPÍTULO VI:	257
<i>Experimento 8: Efectos de la Estimulación Eléctrica del Núcleo Parabraquial Lateral Externo en Tareas de Aprendizaje Espacial y Gustativo, Eliminando los Índices de Posición y las Claves Propioceptivas</i>	259
Método.....	262
Resultados.....	267
Discusión.....	274
DISCUSIÓN FINAL	279
CONCLUSIONES	305
ANEXO I:	
EXPRESION DE INMUNORREACTIVIDAD AL C-FOS INDUCIDA POR ESTIMULACION ELECTRICA REFORZANTE DEL NUCLEO PARABRAQUIAL LATERAL EXTERNO.....	311
Método.....	316
Resultados y Discusión.....	318
ANEXO II:	
TABLAS Y GRAFICOS.....	347
ABREVIATURAS.....	363
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	369

*A Jose Luis.
A mis padres,
a mi tío Manuel.*

AGRADECIMIENTOS:

Quedaría incompleta esta Tesis Doctoral sin dedicar unas palabras de agradecimiento a todas las personas que me han acompañado en este recorrido y han hecho posible la realización de dicho trabajo:

En primer lugar, para mis Profesores-Tutores, Filo Molina y Amadeo Puerto. Creo que no exagero si digo que gran parte de lo aprendido en estos años ha sido posible gracias a la oportunidad que me dieron de formarme bajo su dirección. Por haber inculcado en mí una visión crítica y minuciosa, propia del trabajo científico. Por su apoyo personal y humano, de gran ayuda en medio de las circunstancias adversas que han dificultado y puesto en peligro el trabajo de estos años. Por su dedicación y entrega de tantas horas, a veces robadas al tiempo de descanso. Por su trato cordial, afectuoso y sincero. Por sus correcciones, hechas siempre con cariño y delicadeza... Son tantas las razones, que quizás, las palabras se queden cortas para decir 'gracias'.

A M^a Angeles Zafra, que ha sido y es una gran amiga y compañera: Por todo el cariño y apoyo manifestado en este tiempo. Por su disponibilidad en tantas ocasiones en que he necesitado su ayuda... y por haber logrado que este camino fuese un poco mas fácil y agradable.

A Raquel, con quien he compartido muchas horas de trabajo dentro y fuera del laboratorio, por haberlas hecho amenas e interesantes. Y a todos mis compañeros, Javier Mahía, Antonio Bernal y Antonio Agüera -que además son buenos amigos-, por haber estado ahí y por el interés que siempre muestran en esta investigación.

Mi agradecimiento también a Cristina y M^a Dolores, por sus consejos y su experiencia, tanto en el laboratorio como en la docencia. Y porque siempre que les ha sido posible, han ayudado a aliviar mis 'otros deberes' para permitir la finalización de esta Tesis.

A todos los profesores del Área de Psicobiología, por sus aportaciones y apoyo constante.

Al profesor Juan Lupiáñez, por su desinteresada colaboración, que ha sido de gran importancia para mí en cuestiones 'técnicas' y de informática.

INTRODUCCIÓN TEORICA

I - SISTEMAS MOTIVACIONALES Y REFUERZO

Probablemente todos los organismos están dotados de la capacidad para aprender a partir de la experiencia, lo cual resulta útil para asegurar la supervivencia individual y de la especie. Pero la adaptación a los cambios del medio externo y/o interno requiere de la participación de una serie de mecanismos cerebrales que permitan la integración de reacciones conductuales, endocrinas y autonómicas, que dan lugar a lo que se ha dado en llamar *conducta motivada* (Robbins & Everitt., 1999; Kandel et al., 2000).

Esta organización neurobiológica permite, por ejemplo, seleccionar y obtener aquellos nutrientes que el organismo necesita para sobrevivir, a partir de una enorme variedad de estímulos posibles y evitar aquellas sustancias que podrían resultar nocivas (Booth, 1985; Carlson, 1993; Saper et al., 2002). En efecto, dada la importancia de la ingesta en la vida de los individuos, la evolución ha favorecido el desarrollo de repertorios comportamentales (por ejemplo, preferencias innatas por determinados productos, conductas neofóbicas) y mecanismos de aprendizaje especializados en la formación de asociaciones (por ej., Condicionamiento Interoceptivo), que favorecen la discriminación, minimizan el gasto energético y reducen el riesgo de cometer errores que, por otra parte, podrían resultar fatales (Booth, 1985; Molina & Puerto, 1981; Hoebel, 1997).

La alimentación, la regulación de la temperatura, la sed o el sexo, son conductas motivadas, gobernadas básicamente por mecanismos homeostáticos, cuyo funcionamiento se ha intentado explicar tradicionalmente mediante un modelo que implica la existencia de un sistema de control interno que realiza comparaciones, detecta desviaciones de un estado ideal o '*set point*', y pone en marcha respuestas correctoras encaminadas a reducir el disconfort generado por la desviación respecto a este punto óptimo, -aunque cuanto mas complejo es el comportamiento estudiado, menos valor explicativo presenta este modelo, por otra parte, demasiado simplista- (Grossman, 1967; Kandel et al., 1997; Robbins & Everitt, 1999). En este sentido, diferentes autores han demostrado experimentalmente que el valor motivacional -apetitivo o aversivo- de los nutrientes fluctúa en función del grado de déficit/saciación del organismo. O, lo que es lo mismo, cuanto mayor es el grado de privación de alimento en general o de una determinada sustancia en particular (por ejemplo sodio o determinados macronutrientes), más atractivo resultara para un

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

individuo dado, y tenderá con más frecuencia a realizar conductas de búsqueda y aproximación. (Cabanac, 1971; Gallistel, 1978;...). Pero además de guiar y reforzar el comportamiento, los estados motivacionales tienen efectos más generales en tanto que, por ejemplo, pueden actuar facilitando el aprendizaje (Capdevila-Ortiz et al., 1988; Robbins & Everitt, 1996; Kandel et al., 1997).

Hasta ahora hemos citado estados motivacionales muy simples. Sin embargo, no se puede descartar, la influencia de otros factores externos no relacionados directamente con las necesidades del organismo (Kandel et al., 2000; Leibowitz, 1982; Rolls, 1982; Siviy et al., 1982), entre los cuales se podrían incluir:

1. Constricciones ecológicas: por ejemplo, la disponibilidad de alimento en el medio o la presencia de depredadores, ha moldeado los mecanismos cerebrales de las especies para minimizar costes y maximizar beneficios. Así, los carnívoros pueden comer una gran cantidad de alimento y de manera rápida aunque no experimenten señales intensas de déficit.
2. Mecanismos anticipatorios, como los ritmos biológicos, hábitos aprendidos, señales externas...
3. Factores hedónicos como el sabor, olor o aspecto de los alimentos, capaces de modular sus consecuencias motivacionales aversivas o reforzantes.

Así, Le Magnen y su grupo, han sido unos de los primeros en tomar en consideración la presencia de los factores relacionados con las características sensoriales de la ingesta ('palatabilidad'). Estos, por sí solos, pueden facilitar el inicio y mantenimiento de conductas consumatorias, y a la larga, conducir incluso al desarrollo de problemas de obesidad y sobrepeso. Mas aún, según este autor, los estímulos agradables al paladar pueden estimular la actividad opiácea endógena (Le Magnen et al., 1980; Le Magnen, 1992).

Desde los años 40 y 50, muchos investigadores han intentado buscar los 'centros' y señales neurales o humorales responsables de la iniciación y el control de algunas conductas con relevancia biológica. El Hipotálamo, ha sido considerado clásicamente como un candidato ideal para realizar estas funciones integradoras, dado que recibe aferencias viscerales y envía mensajes al Sistema Nervioso Autónomo y conocida es su cercanía respecto al líquido cefalorraquídeo así como sus conexiones con la Hipófisis. Los resultados de estudios que empleaban técnicas lesivas demostraron la existencia de múltiples subdivisiones hipotalámicas en el control de las diversas conductas motivadas -ingesta, regulación hídrica, termorregulación, agresión,

conducta sexual, etc.- (Grossman, 1979; Olds & Fobes, 1981; Robbins & Everitt, 1999). En relación con la ingesta, las investigaciones clásicas de Hetherington y Ranson, así como de Brobeck y colaboradores, demostraron que la manipulación de diversas áreas hipotalámicas tenía importantes repercusiones sobre el consumo de alimentos (Rolls, 1982; Rolls, 1994). Sin embargo, estudios más recientes han cuestionado la validez teórica de sus planteamientos, desembocando en una teoría mucho más compleja en donde las estructuras hipotalámicas no serían sino parte de una red más extensa que incluye estructuras a distintos niveles del neuroeje y sistemas neuroquímicos, todos ellos responsables del control sobre el comienzo y cese de esta conducta (Leibowitz, 1992; Le Magnen, 1992; Carlson, 1993; Cooper & Higgs, 1994; Robbins & Everitt, 1999).

Junto con la '*motivación*', el '*refuerzo*' es un concepto clave para la Psicología (Wise & Rompré, 1989; White & Milner, 1992; Wise, 1996; Rolls, 2000), que ha dado lugar a numerosas controversias. Ambos términos han sido considerados como las dos '*caras*' en la explicación de una misma '*moneda*', la conducta, en tanto que la abordan desde sus aspectos antecedentes y consecuentes, respectivamente.

Un reforzador sería para los conductistas clásicos, 'cualquier evento que sigue a una respuesta y es capaz de modificar la probabilidad de emisión de esta respuesta en el futuro aumentándola o disminuyéndola' (White & Milner, 1992; Schultz, 1997), pero esta definición no especifica nada del modo en que se produce el cambio conductual. Algunos autores han intentado dar respuesta a esta cuestión argumentando que el individuo además de experimentar placer, aprende una asociación entre una respuesta y el reforzador: de este modo, Hull señaló que cualquier estímulo o condición capaz de reducir un estado de desequilibrio se convertirá en reforzador (Toates, 1989; Molina & Puerto, 1990). Sin embargo, a veces es la presencia del propio reforzador -o la activación de una representación neural del mismo- lo que impulsa a un individuo a realizar una determinada conducta (por ejemplo, la simple presencia del olor o la visión de una comida apetitosa o un compañero sexual, pueden desencadenar respuestas de acercamiento adecuadas). Por tanto, para los defensores de las teorías motivacionales de incentivo, el refuerzo ha sido entendido como un estado inductor de "*drive*" o necesidad, en tanto que incorpora representaciones mentales de objetos externos y planes de acción futuros que dirigen el comportamiento (Bindra, 1974; Domjan & Burkhard, 1990; Molina & Puerto, 1990; White & Milner, 1992; Kelley & Berridge, 2002). Rolls, abundando en este tema, sugiere que los reforzadores actuarían especificando una meta hacia la que

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

se dirige la conducta; por tanto, el valor adaptativo de los sistemas motivacionales reside en actuar como intermediarios –‘*interface*’- entre los sistemas sensoriales y los encargados de la acción (Rolls, 2000).

También podemos afirmar que los reforzadores inducen dos tipos de reacciones conductuales: una conducta inicial, flexible, *preparatoria*, que sirve para hacer que el individuo explore o se acerque al objeto, y una conducta *consumatoria*, estereotipada y refleja, que es específica para ese reforzador particular (Schultz, 1997; Nader, Bechara & Van Der Kooy, 1997; Robbins & Everitt, 1999).

Finalmente, también podemos hablar de reforzadores ‘*primarios*’, relacionados con necesidades básicas, o de reforzadores ‘*condicionados*’, o sea, estímulos inicialmente neutros pero que tras haber sido repetidamente asociados con un reforzador primario, adquieren propiedades de control sobre la conducta (White & Milner, 1992; Schultz, 1997; Robbins & Everitt, 1999).

En 1954 Olds y Milner realizan un importante descubrimiento al comprobar que la estimulación eléctrica directa de algunas estructuras neurales puede convertirse en un evento poderosamente reforzante. De hecho, observaron que los animales de laboratorio eran capaces de adquirir una conducta instrumental cuando el aprendizaje era reforzado mediante Estimulación Eléctrica de estas zonas cerebrales. Ello implicaba la existencia de un sistema especializado, cuya activación produce unos efectos comportamentales comparables a los observados en conductas dependientes de necesidades biológicas (Olds & Fobes, 1981; Robbins & Everitt, 1999; Spanagel & Weiss, 1999).

Se inicia entonces una brillante línea de investigación con el objetivo de caracterizar los sistemas neurobiológicos implicados en el refuerzo o recompensa cerebral, que empieza a generar múltiples resultados, como la elaboración de un mapa de las áreas cerebrales que sustentan autoestimulación intracerebral, distribuidas fundamentalmente a lo largo del Haz Prosencefálico Medio -una red de fibras nerviosas ascendentes y descendentes que discurren a lo largo del eje rostro-caudal intersectando al Hipotálamo-, pero con la participación, también, de otras zonas de la Corteza, Sistema Límbico, Cerebelo y Tronco (Olds & Fobes, 1981; Wise & Rompré, 1989; Gallistel et al., 1996; Robbins & Everitt, 1999; Kandel et al., 2000). Además se ha encontrado un cierto solapamiento entre éstas zonas y aquellas otras implicadas en conductas homeostáticas como la ingesta o la bebida (Olds &

Fobes, 1981; Wise & Rompré, 1989; Rolls, 1982; Rolls, 1994; Robbins & Everitt, 1999; Kandel et al., 2000).

Finalmente, los experimentos de refuerzo inducido por autoestimulación intracraneal (AEIC) han mostrado que cuando los animales son entrenados para autoadministrarse corriente eléctrica, se produce la activación la vía Mesocorticolímbica, que promueve la liberación de dopamina en el N. Accumbens. Alternativamente, los antagonistas dopaminérgicos reducen las tasas de AEIC, lo que convierte a este neurotransmisor en candidato idóneo para la mediación del refuerzo (Wise & Rompré, 1989; Bauco & Wise, 1994; Salamone et al., 1997; Sokolowski et al., 1998).

Por otro lado, las investigaciones psicofarmacológicas han ido poniendo de manifiesto que determinadas sustancias con elevado potencial de abuso – psicoestimulantes, opiáceos, nicotina, cannabis, etanol, fenciclidina...- también promueven la liberación de dopamina en el N. Accumbens a la vez que modulan la potencia reforzante de la estimulación eléctrica cerebral e inducen modificaciones en los patrones nutritivos normales (Wise, 1982; 1994; 1996; 1998; 2000; Wise & Rompré, 1989; White & Milner, 1992; Van der Kooy et al., 1983; Gallistel & Karras, 1984; Miliaressis et al., 1986; Bauco & Wise, 1994; 1997; Di Chiara, 1998; 1999; Spanagel & Weiss, 1999), efecto que también se ha encontrado tras la utilización de reforzadores naturales –comida- (Martel & Fantino, 1996) todo lo cual ha hecho suponer que, reforzadores naturales, sustancias de abuso y autoestimulación podrían compartir, al menos en parte, un mismo substrato neuroanatómico.

Estudios neurofisiológicos, empleando pulsos dobles de corriente, así como con técnicas de colisión de impulsos nerviosos, en las que se utilizan dos electrodos situados uno en cada extremo de la fibra nerviosa, han permitido estimar la duración de los períodos refractarios de las neuronas situadas en el extremo del electrodo mediante el cual se lograba inducir Autoestimulación Eléctrica. Así se ha llegado a la conclusión de que la AEIC actúa despolarizando fibras mielinizadas que viajan en dirección rostrocaudal (Wise & Rompré, 1989; Bielajew & Shitzgal, 1986 –citado por Wise, 1998-; Wise, 2000; Gallistel et al., 1996). Sin embargo, las fibras dopaminérgicas relevantes para el refuerzo –vía Mesolímbica- se dirigen, en dirección rostral hacia el Núcleo Accumbens y tienen velocidades de conducción lentas así como períodos refractarios largos, con un elevado umbral para la activación directa, lo que hace pensar en que éstas últimas podrían ser activadas

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

indirecta y trans-sinápticamente mediante conexiones axodendríticas y axosomáticas del Haz Prosencefálico Medial en el Área Tegmental Ventral (Wise, 1996; 1998) o incluso en localizaciones más caudales.

Algunos de estos axones descendentes del Fascículo Prosencefálico Medial que proyectan hacia estructuras del mesencéfalo e incluso hacia localizaciones caudales a éste, podrían actuar activando indirectamente neuronas de la Vía Mesolímbica a través de conexiones colinérgicas desde la Zona Pedunculopontina (NTPP y NTLD) hacia el ATV, tal y como han propuesto algunos autores, basándose en la repercusión que tiene sobre la conducta de AEIC el bloqueo farmacológico de los receptores de acetilcolina en el NTPP (Yeomans et al., 1993; Yeomans & Baptista, 1997; Wise, 1998).

En definitiva, hoy se puede afirmar que el elemento más firmemente establecido en relación con el circuito cerebral de refuerzo es la vía dopaminérgica mesolímbica, cuyas neuronas se dirigen desde el Área Tegmental Ventral hacia el Núcleo Accumbens, así como sus aferencias gabaérgicas locales y sus eferencias que parten del Núcleo Accumbens y se dirigen hacia diversas regiones corticales y límbicas (Wise & Rompré, 1989; Wise 1996; 1998). Aunque también se han trazado aferencias glutamérgicas procedentes de la Corteza Prefrontal medial, Sistema Límbico y NTPP (Wise, 1998), colinérgicas desde el NTPP (Yeomans et al., 1993; Yeomans & Baptista, 1997) o noradrenérgicas desde el Locus Coeruleus hasta ATV y NAC (Wise, 1998), así como gabaérgicas del NAC hacia el ATV (Van Bockstaele & Pickel, 1995; Wise, 1998), lo cual añade una mayor complejidad al sistema.

Mención aparte debe hacerse con respecto al significado biológico que para el organismo tiene la activación de esta Vía Dopaminérgica Mesolímbica. Existen diferentes interpretaciones acerca del papel que se le atribuye a dicho mecanismo, como por ejemplo, evaluación hedónica, aprendizaje asociativo, motivación de incentivo, integración sensoriomotora, etc...

Una de las hipótesis más influyentes en este campo, que ha guiado la investigación durante décadas, fue propuesta inicialmente por Wise (Wise, 1982; 1994; 1996), quien sugirió que la liberación de dopamina en la Vía Mesolímbica sería la señal neural provocada por aquellos estímulos que son experimentados por el organismo como placenteros, y por lo tanto, la señal responsable del '*efecto hedónico*'. Consecuentemente, la manipulación farmacológica del sistema

dopaminérgico mesolímbico debería producir modificaciones en el valor hedónico de cuantos estímulos resultan normalmente apetitivos, ya sean naturales, drogas o AEIC (Wise & Rompré, 1989; Wise, 1996). Posteriormente este autor ha admitido que la función de la dopamina cerebral podría ir más allá de un mero detector de eventos apetitivos en tanto que puede generar efectos proactivos en la intención e iniciación de la conducta, pero no deja de considerarla como un evento clave en el establecimiento de una asociación entre el placer subjetivo y la conducta observable (Ikemoto & Panksepp, 1999; Wise 2000; 2002). Basándose en esta idea, las ‘teorías hedónicas’ de la adicción proponen que el sistema dopaminérgico mesolímbico sería responsable del intenso ‘placer’ provocado por las drogas adictivas y la sensación de ‘anhedonia’ que los individuos tienen durante el síndrome de abstinencia (Kelley & Berridge, 2002).

Una interpretación alternativa relacionada con la ‘*teoría del aprendizaje*’, propone que la función de la dopamina del mesencéfalo es convertir las señales intracerebrales que predicen refuerzo en conductas dirigidas a mantener los estímulos predictores de refuerzo (Minerowicz & Schultz, 1996; Schultz, 1998). Se basa en los hallazgos de que esta vía se activa ante la aparición de estímulos apetitivos solo bajo condiciones de privación y novedad, de manera que cuando un estímulo apetitivo puede ser totalmente predicho por las señales contextuales, deja de producir activación en este sistema. O sea que, dicho de otro modo, las neuronas dopaminérgicas de la Vía Mesolímbica muestran actividad durante los cambios en las expectativas del refuerzo, codificando una señal de ‘error’ en la predicción del valor de éste, de manera que la liberación de dopamina en el Núcleo Accumbens solo se produciría en el caso de que el valor hedónico del estímulo presentado fuese mayor de lo esperado (Schultz, 1997; Schultz et al, 1998; Di Chiara, 1998; 1999; Roitman et al., 2001; Schultz, 2002).

La ‘*teoría del Incentivo*’ propuesta por Robinson y Berridge sugiere que el Sistema Dopaminérgico Mesolímbico permite atribuir relevancia de incentivo a la representación neural de los eventos reforzantes, guiando la conducta hacia la búsqueda de estos (Berridge & Robinson, 1998; Kelley & Berridge, 2002). Los autores citados, tras examinar los efectos de la destrucción masiva de la vía mesolímbica mediante 6-OH-Dopamina, proponen que estas lesiones producirían una interrupción en la capacidad del organismo para dirigir la conducta, sin afectar al establecimiento de un aprendizaje asociativo (E-reforzador) ni a la evaluación

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

hedónica de los estímulos reforzantes (Berridge & Robinson, 1998; Robinson & Berridge, 2003).

Finalmente, otros autores, dada la relación existente entre los efectos motivacionales y sensorio-motores de los estímulos reforzantes, suponen que la activación del Núcleo Accumbens actuaría como *'enlace -interface- entre los sistemas sensoriales/ motivacionales y la ejecución motora'* (Salamone, et al., 1997). Asimismo, introducen el concepto de *'anergia'* para referirse al efecto que producen los fármacos neurolépticos sobre los aspectos sensoriomotores complejos que se manifiestan como enlentecimiento motor, menor reacción ante determinados estímulos y sesgo en la selección de respuesta hacia opciones menos costosas. De aquí se concluye que los fármacos neurolépticos tendrían un efecto de supresión sobre los mecanismos implicados en la regulación y ejecución de la conducta motivada (Salamone et al., 1997; Hoebel, 1997; Rolls, 2000).

Sin embargo existen algunas excepciones, y así, las interacciones dopaminérgicas con neuronas eferentes del N. Accumbens no parecen necesarias para la acción reforzante de algunas otras drogas de abuso como las benzodiazepinas o los barbitúricos (Wise, 1998; 2000; Spanagel & Weiss, 1999). Incluso los opiáceos pueden tener efectos reforzantes, tanto directamente en el N. Accumbens como independientemente de la vía Mesolímbica (Spanagel et al., 1992; Wise, 2000).

Por tanto, podemos concluir diciendo que la DA, si bien es el neurotransmisor mas importante, podría no ser el único implicado en codificación de información relacionada con refuerzo (Spanagel et al., 1992; Yeomans et al., 1993; Yeomans & Baptista, 1997; Rada et al., 2000) y que la liberación de dopamina en el Núcleo Accumbens probablemente no sea el único mecanismo final común para todos los reforzadores (Wise, 2000; Spanagel & Weiss, 1999). Se podría hablar entonces, bien de sistemas independientes para el procesamiento de señales hedónicas, que funcionan en paralelo (Ettenberg et al., 1982; Nader et al., 1997; Wise, 1996), o bien, de un mecanismo multisináptico de refuerzo, del que la Vía Meso-Accumbens no sería mas que un eslabón principal en el circuito, del que participarían otras estructuras anteriores como la Corteza Prefrontal, Amígdala o zonas caudales como el NTPP, entre otras (Wise & Rompré, 1989; Wise, 1996; Robbins & Everitt 1996; Nader et al., 1997).

Al mismo tiempo, se han identificado zonas cerebrales en las que la Estimulación Intracerebral elicit respuestas de escape o defensivas (Anderson et al., 1995; Brandão et al., 1999; Diotte et al., 2000; Rada & Hoebel, 2001) y estructuras neurales que intervienen en las reacciones del organismo ante estímulos dolorosos, aversivos o amenazantes (Wall & Melzack, 1999; Bures et al., 1998):

Algunos de estos estudios han comprobado, por ejemplo, que determinados eventos estresantes o aversivos también provocan la liberación de dopamina en el Núcleo Accumbens, lo cual ha llevado a algunos autores a plantear: a) Que el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico podría relacionarse con funciones generales como atención o integración sensoriomotora, y no directamente implicado en aversión o refuerzo (Salamone, 1994; Shippenberg & Elmer, 1998; Kelley & Berridge, 2002). b) Que los eventos aversivos se pueden reconceptualizar en términos positivos, en tanto que para un individuo puede resultar reforzante cualquier situación o conducta que permita finalizar un estado motivacional negativo (Rada et al., 1998; Ikemoto & Panksepp, 1999; Rada & Hoebel, 2001; Kelley & Berridge, 2002). O bien, c) considerar que ciertos sistemas mesocorticolímbicos jugarían un papel activo en motivación aversiva, diferente de su papel en refuerzo (Salamone, 1994; Berridge & Robinson, 1998; Kelley & Berridge, 2002).

Es posible que los sistemas neurales implicados en el procesamiento de estímulos aversivos sean diferentes de los que controlan la motivación para eventos positivos, pero, dado que hay zonas en donde la Estimulación Eléctrica provoca efectos marcadamente ambivalentes (Diotte et al., 2000; Anderson et al., 1995), cabe pensar, y así lo evidencia la experiencia reciente, que en el procesamiento de los aspectos motivacionales apetitivos/ aversivos intervienen amplias redes neurales interconectadas que interactúan y se influyen mutuamente (Hoebel, 1976; Salamone, 1994; Robbins & Everitt, 1999; Brandão et al., 1999; O'Doherty et al., 2001), así como sistemas dopaminérgicos y no dopaminérgicos (Shippenberg & Elmer, 1998; Rada & Hoebel, 2001). Algunas hipótesis, como la 'Teoría de los Procesos Oponentes' pretenden explicar razón de estos efectos, dirigiendo la investigación hacia regiones cerebrales donde los sistemas apetitivos y aversivos se solapan (Hoebel, 1976; Robbins & Everitt, 1999).

En este sentido, es importante mencionar las investigaciones llevadas a cabo en este y otros laboratorios en donde se pone de manifiesto la participación del Área Parabraquial troncoencefálica en la adquisición de aversiones gustativas (Agüero et

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

al., 1993a; 1993b; 1997; Mediavilla et al., 2000; Cubero & Puerto, 2000b), pues es ésta una zona de relevo en el procesamiento de señales viscerales (Fulwiler & Saper, 1984; Kiefer, 1985; Hermann & Rogers, 1985; Lança & Van der Kooy, 1985; Papas & Ferguson, 1990; Halsell, 1992) y donde converge información relacionada con la codificación de las propiedades -sensoriales y motivacionales- de los estímulos gustativos (Hermann & Rogers, 1985; Yamada et al., 1990; Davis, 1991; Di Lorenzo & Monroe, 1992; Halsell, 1992; Kobashi et al., 1993; Yamamoto et al., 1994).

Simultáneamente y en relación con el planteamiento teórico anterior, esta zona también ha sido implicada en el procesamiento del dolor, comprobándose que el N. Parabraquial es una estación de relevo de información nociceptiva procedente de las astas dorsales medulares, a través de la vía espinoparabraquial, implicada en el procesamiento del componente emocional del dolor (Bernard et al., 1991; 1993; Besson et al., 1994; Bernard et al., 1995; Saper, 1995a; Bester et al., 1997; Buritova et al., 1998; Craig & Dostrovsky, 1999). Pero también, la estimulación eléctrica de esta zona ha sido útil como estimulación analgésica para aliviar dolores intratables en sujetos humanos, al parecer mediante mecanismos de analgesia no opiácea (Katayama et al., 1985; Young et al., 1992).

En el Área Parabraquial se han localizado fibras aferentes procedentes del NTS inmunorreactivas a encefalinas (Maley & Panneton, 1988) así como cantidades notables de receptores μ y κ (Mansour et al., 1995). De hecho, investigaciones recientes han señalado que esta estructura podría estar implicada en motivación de incentivo, en tanto que la administración intraparabraquial de morfina favorece el establecimiento de una asociación gustativo-visceral, actuando como estímulo discriminativo para el aprendizaje (Jaeger & Van der Kooy, 1996), aunque no se ha logrado demostrar su participación en el procesamiento del valor hedónico de esta droga.

Finalmente, se ha demostrado que los niveles de receptores opiáceos del Complejo Parabraquial se pueden ver modificados o alterados en condiciones de privación de alimento (Wolinsky et al., 1994; 1996).

En resumen, la participación del Tronco Cerebral en la conducta nutritiva, modulada por factores de tipo homeostático, ha quedado demostrada en diferentes paradigmas experimentales (Grill & Norgren, 1978a; Flynn & Grill, 1983; Ino et al., 1987; Nagai et al., 1987; Takaki et al., 1990; Carr et al., 1991; Li & Rowland, 1993;

1995; Calingasan & Ritter, 1993; Wolinsky et al., 1996; Moufid-Bellancourt et al., 1996...), en los que se observa que posee los mecanismos necesarios para analizar e integrar diversos tipos de señales interoceptivas y exteroceptivas, coordinar funciones gastrointestinales y poner en marcha conductas consumatorias (Grill & Norgren, 1978a; 1978b; Grill & Kaplan 1990; Roger & Hermann, 1992, Altschuler et al., 1992).

II- NUTRICIÓN, REFUERZO Y PREFERENCIAS GUSTATIVAS

La Nutrición, desde el punto de vista psicobiológico, es una conducta motivada, que resulta esencial para la supervivencia de las especies, y requiere la participación de mecanismos complejos en cuya regulación intervienen gran variedad de factores biológicos, psicológicos, sociales, ambientales, etc... y cuyas aportaciones específicas es importante descubrir y estudiar (Rowland et al., 1996; Woods & Stricker, 1999; Smith, 2000; Schwartz et al., 2000).

2.1- Psicobiología de la ingesta de alimento

Una de las principales razones que lleva a los organismos a buscar e ingerir alimento (carbohidratos, lípidos, proteínas, vitaminas y minerales) es la necesidad de proporcionar los nutrientes necesarios para su funcionamiento y así mantener la homeostasis energética corporal (Levine & Billington, 1997), el proceso por el cual se establece un equilibrio bastante preciso entre el consumo y gasto calórico durante largos períodos de tiempo (Martin et al., 1991; Rowland et al., 1996; Jéquier & Tappy, 1999; Woods et al., 1998a; Woods et al., 2000; Schwartz et al., 2000). El objetivo de la homeostasis calórica no es otro que el mantenimiento del metabolismo celular: las células para llevar a cabo las funciones que les son propias necesitan un suministro constante de glucosa, oxígeno y otros nutrientes, tanto mayor cuanto mas alto es su nivel de actividad. Esta energía es obtenida a partir de la dieta, pero dado que los nutrientes no están disponibles de inmediato, sino que deben pasar por un proceso de digestión y absorción, los vertebrados han adquirido evolutivamente la capacidad para almacenar energía suficiente como para asegurar este suministro continuo durante largos períodos de tiempo (Woods & Stricker, 1999; Woods et al., 2000). Actualmente, algunos autores proponen que ambos procesos, ingesta de alimento y equilibrio energético, pueden ser regulados a través de la acción conjunta a ambos niveles de un sistema neurohumoral altamente redundante y complejo, que minimiza el impacto de las fluctuaciones a corto plazo y ajusta el tamaño de las comidas individuales. (Figlewicz et al., 1996; Woods et al., 1998a; 2000; Hirschberg, 1998; Inui, 1999; Schwartz et al., 2000; Mauer et al., 2001). O dicho de otro modo, la ingesta de alimento sería solo una de las variables controladas por el complejo sistema responsable del equilibrio energético corporal (Levine & Billington, 1997).

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Algunos tejidos como el hígado, las células del músculo esquelético o los adipocitos tienen capacidad para almacenar la energía que no está siendo utilizada por las células durante la fase de absorción del alimento, caracterizada por la abundancia de nutrientes en la sangre. Los carbohidratos son captados y almacenados principalmente (pero no exclusivamente) en el hígado, en forma de glucógeno, constituyendo una reserva de energía rápidamente utilizable (Woods & Stricker, 1999; Hadley, 1997), mientras que las grasas son depositadas fundamentalmente en el tejido adiposo, en forma de triglicéridos (una molécula de glicerol a la que se unen tres moléculas de ácidos grasos libres), las cuales constituyen un almacén de energía a largo plazo (Carlson 1993; Hadley, 1997; Woods & Stricker, 1999). Los aminoácidos en cambio, son utilizados para la fabricación de proteínas en las células de la musculatura esquelética, mediante un mecanismo aún no bien conocido (Hadley, 1997). Se suele hablar de dos almacenes de reserva de nutrientes, uno a corto plazo en el hígado y la musculatura, y otro a largo plazo en el tejido adiposo (Carlson, 1993).

Durante la fase post-absortiva o de ayuno, el glucógeno del hígado es transformado nuevamente en glucosa, que entra al torrente circulatorio y queda disponible para su utilización. Igualmente, los triglicéridos son movilizados desde el tejido adiposo en forma de ácidos grasos y glicerol, los cuales deberán ser transformados por los tejidos, respectivamente, en cuerpos cetónicos y glucosa (Woods & Stricker, 1999; Scharrer, 1999).

Tanto la entrada de calorías al torrente circulatorio desde el intestino o los depósitos de almacenamiento, como la captación-utilización de esta energía en los tejidos del organismo son procesos eficientemente controlados desde el cerebro y el hígado, órganos que son capaces de detectar la energía disponible en la sangre e intercomunicarse a través de señales neurales y humorales. El hígado además tiene la capacidad de convertir unos nutrientes en otros: carbohidratos en ácidos grasos o aminoácidos en carbohidratos, de manera que siempre hay energía disponible. En consecuencia, los animales normalmente inician la ingesta mucho antes de que sus reservas se hayan agotado (Martin et al., 1991; Woods & Stricker, 1999; Woods et al., 2000).

A pesar de esto, y del ya mencionado intervalo temporal entre la comida y la absorción de nutrientes por parte de los tejidos, el concepto de que la ingesta es disparada por un mecanismo de control simple (modelo de agotamiento-reposición)

que detecta desviaciones y pone en marcha respuestas correctivas con el objetivo de rellenar los almacenes ha persistido durante varias décadas (Woods et al, 2000).

J. Mayer, autor de la "hipótesis glucostática", propuso a mediados del siglo XX, que la ingesta se iniciaría cuando la disponibilidad de glucosa circulante y utilización por parte de las células sufriese una reducción, y finalizaría cuando los niveles o la disponibilidad de esta sustancia fuesen restaurados (Molina & Puerto, 1988; 1990; Friedman et al., 1986; Martin et al.,1991; Le Magnen, 1992; Calingasan & Ritter, 1993; Ritter et al., 1994; Woods et al., 2000). Actualmente, aunque se han obtenido resultados a favor de que la glucosa interviene en la iniciación de la ingesta, y que ésta se puede estimular mediante fármacos como la 2-desoxi-D-glucosa (2-DG) o 5-tioglucona (5-TG), análogos de la glucosa que no son metabolizables por el organismo (Martin et al., 1991; Ritter, 1994). Sin embargo, se piensa que el inicio de la ingesta puede verse influido por otras variables internas y/o externas al organismo, y que esta señal reguladora a corto plazo, por sí sola podría no ser imprescindible para explicar el mantenimiento de la homeostasis calórica, puesto que el mecanismo regulador (según el modelo del agotamiento-reposición) solo se activaría hasta el punto de estimular la ingesta, en condiciones de emergencia metabólica extrema (Martin et al.,1991; Le Magnen, 1992; Woods et al., 2000; Schwartz et al., 2000; Smith, 2000).

Para otros autores como Kennedy, quien en 1953 desarrolla la "teoría lipostática", lo decisivo son las reservas de grasa corporal. Postula que en el organismo se generan señales inhibitorias en proporción a la cantidad de grasa almacenada, las cuales actuarían sobre el cerebro para reducir la ingesta (Friedman et al., 1986; Martin et al., 1991; Woods et al., 1998; Schwartz et al., 2000; Mauer et al., 2001). Los estudios clásicos de Coleman, con animales parabióticos ya apoyaban esta idea: En estos experimentos se conectaban quirúrgicamente los sistemas circulatorios de parejas de ratas o ratones, mostrando que cuando uno de ellos era genéticamente obeso y el otro normal, éste último se volvía hipofágico y perdía peso, mientras que no se observaban modificaciones si ambos animales eran obesos o ambos delgados. El autor, a la vista de los datos, interpretó que algún factor humoral presente en el animal obeso pasaría a la circulación general y actuaría sobre receptores cerebrales que controlan la ingesta del animal delgado, frenándola y reduciendo su peso (Martin et al, 1991). Además, se ha podido observar experimentalmente una estimulación de la ingesta tras la administración de sustancias exógenas o endógenas, que interfieren con el metabolismo de los ácidos

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

grasos, como el Mercaptoacetato [MA], o el Metil Palmoxirato [MP] (Friedman et al., 1986; Calingasan & Ritter, 1993; Rowland et al., 1996; Scharrer, 1999).

Esta teoría ha vuelto de nuevo a primera línea de actualidad como explicación de la regulación a largo plazo de la ingesta, tras el descubrimiento de la 'leptina'. Se trata de una proteína codificada por un gen cuya mutación podría ser responsable de algunos tipos de obesidad en ratones y seres humanos, denominado 'ob' y cuyos receptores son codificados por otro gen conocido como 'db'. La leptina se expresa únicamente en el tejido adiposo y, en condiciones normales, esta sustancia es liberada al torrente circulatorio actuando como señal de 'feedback negativo' sobre receptores situados en el SNC. Así, el aumento de peso conlleva una elevación de los niveles plasmáticos de esta sustancia que promueven el gasto energético y reducen la ingesta, y, viceversa (Friedman, 1998).

Para los defensores de la "teoría aminostática", como Mellinkoof y Harper, lo que determina el comienzo de la nutrición es la cantidad de aminoácidos circulantes en el plasma sanguíneo, por lo que un aumento o descenso de estos puede afectar al inicio o a la inhibición de la ingesta, respectivamente (Wurtman, 1985; Molina & Puerto, 1980; Rowland et al., 1996). Por ejemplo, se ha visto que los niveles plasmáticos de triptófano correlacionan con la concentración cerebral de esta sustancia, la cual actúa como precursora de la serotonina, uno de los neurotransmisores que han resultado ser clave en la conducta nutritiva (Wurtman, 1985). Sin embargo, esta teoría ha tenido menor desarrollo teórico que las anteriores, dada la limitada participación de estos nutrientes en la homeostasis calórica (Beverly et al., 1994).

En definitiva, podemos decir que la Nutrición es un proceso complejo y cada una de las hipótesis anteriormente citadas hace aportaciones importantes para explicar distintos aspectos de la ingesta. Sin embargo, actualmente predominan las teorías que incluyen a las 'leptinas' en la explicación la ingesta dentro del complejo mecanismo de regulación energética, que integra y enlaza las señales de déficit/saciación de alimento –a corto plazo- con las señales de adiposidad –a largo plazo- (Martin et al., 1991; Woods, 1998; Inui, 1999).

En la génesis del proceso nutritivo existen sensaciones de déficit que llevan a un individuo a la búsqueda e ingesta de alimento, así como señales que llevan a la supresión de este comportamiento, un proceso conocido saciedad (Martin et al.,

1991; Le Magnen, 1999; Reid & Hetherington, 1997; Jéquier & Tappy, 1999), si bien la mayoría de los autores distinguen entre saciedad a corto plazo y a largo plazo, –saciación versus saciedad, según la terminología de otros autores–, para referirse a la terminación de una comida, y al tiempo que tarda el individuo en iniciar de nuevo la conducta de ingesta, respectivamente. Otros investigadores consideran, sin embargo, que la búsqueda e ingesta de alimento es la tendencia natural de los individuos, salvo que sea inhibida por señales de saciedad (Woods & Stricker, 1999; Smith, 2000; Woods et al., 2000). Así, para analizar la cantidad de energía que un individuo ingiere, pongamos por caso, en un período de 24 horas, utilizan dos variables operacionales: la frecuencia con que se inicia un episodio de ingesta – número de comidas–, y la cantidad que se ingiere en cada uno de éstos –lo cual determina la duración de una comida o el período de tiempo durante el que se mantiene la conducta ingestiva– (Jéquier & Tappy, 1999; Smith, 2000; Woods et al., 2000).

Los mensajes de déficit/saciación y los relativos a la cantidad de energía almacenada se supone que habitualmente son originados en la periferia antes de ser transmitidos e integrados a niveles centrales (Molina & Puerto, 1980; 1988; 1990; Campfield & Smith, 1990; Martin et al., 1991; Fraser et al., 1995; Figlewicz et al., 1996; Woods et al., 1998a), aunque la búsqueda de alimento, ingesta y movilización de las reservas internas, así como el cese de tales comportamientos, son controlados por un complejo circuito de centros nerviosos interconectados (Figlewicz et al., 1996; Levine & Billington, 1997; Woods et al., 1998a; 2000; Hirschberg, 1998; Inui, 1999; Schwartz et al., 2000; Mauer et al., 2001). Algunos de estos mensajes periféricos podrían actuar facilitando el inicio de la ingesta, otros modularían su frecuencia y duración, y finalmente, una serie de señales humorales que reflejan cambios a largo plazo serían enviadas al cerebro, en función de las cuales se lleva a cabo el ajuste de las comidas individuales.

La iniciación de la ingesta puede verse afectada por variables tanto internas como externas al organismo (Schwartz et al., 2000; Woods et al., 1998a; 2000; Smith, 2000). Uno de los cambios observados de manera mas sistemática, previo al inicio espontáneo de una comida, es un ligero pero consistente descenso en los niveles de glucosa circulante, descrito inicialmente por Louis Sylvestre y Le Magnen, y corroborado después con nuevas tecnologías, tanto en animales como en humanos (Le Magnen, 1992; Campfield & Smith, 1990; Campfield, et al., 1996; Smith, 2000). También se han descrito cambios en la temperatura corporal y en el

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

metabolismo basal -aumento y descenso, respectivamente- (Woods et al., 2000; Schwartz et al., 2000; Smith, 2000). Las variables externas tienen que ver con factores rítmicos (circadianos, ováricos...), ecológicos (temperatura ambiental, disponibilidad del alimento, presencia de depredadores...), cognitivos, sociales, culturales, estéticos, etc..., cuya influencia puede verse alterada por efectos del aprendizaje (Figlewicz, 1996; Reid & Hetherington, 1997; Jéquier & Tappy, 1999; Woods et al., 1998a; 2000; Schwartz et al., 2000; Smith, 2000).

Los factores responsables del cese o finalización de la conducta, que influyen en la duración de un episodio de ingesta -saciedad a corto plazo o saciación, según la terminología que utilizan diferentes autores-, actúan preabsortivamente e implican la estimulación de receptores situados a lo largo del tracto digestivo (Smith, 2000). Muchos autores distinguen entre señales de 'feedback positivo' y 'feedback negativo', cuyos efectos serían contrapuestos, aunque ambos se generen a nivel sistémico y sean enviados al cerebro para su integración dinámica (Davis, 1999; Smith, 2000; Schwartz, 2000).

Cualidades como el olor, sabor, textura, etc. de los alimentos (factores orofaríngeos), desempeñan un papel importante como señales de 'feedback positivo' en el control de la conducta nutritiva en condiciones naturales, como ya puso de manifiesto Pavlov al investigar la "fase cefálica" de la digestión (Pavlov, 1910; Tordoff & Friedman, 1989). Investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio han confirmado esta idea, poniendo de relieve que cuando estos factores no están presentes, como ocurre en el caso de la administración enteral de alimento, se producen reacciones aversivas y de malestar gástrico (Molina et al., 1977; Puerto & Molina, 1977; Deutsch, 1990; Zafra, 2000). Pero también estos factores, por sí solos, pueden estimular la ingesta en situaciones en las que no existe desequilibrio homeostático -y, por tanto, en ausencia de sensaciones de déficit-, promoviendo el consumo excesivo de alimentos 'apetitosos' y conduciendo al desarrollo de trastornos de obesidad y sobrepeso, dado que, según se ha demostrado recientemente, conllevan una hiperactivación del sistema opiáceo endógeno, relacionado con los mecanismos de refuerzo y recompensa cerebral (Le Magnen, 1992; 1999; Carlson, 1993; Cecil et al., 1998; Davis, 1999; Smith, 2000).

Mediante la técnica de 'alimentación ficticia' o '*sham feeding*', consistente en el implante de un cateter intragástrico que permite extraer el alimento antes de que sea totalmente digerido y/o absorbido por el sistema digestivo, se facilita la

investigación acerca del papel de estos mecanismos de ‘feedback positivo’ en la conducta ingestiva. Como cabía esperar, en esta situación se observa que el tamaño de la comida ingerida es mucho mayor y el tiempo transcurrido entre dos comidas, mucho mas corto que en situaciones reales (Grill & Kaplan, 1992; Carlson, 1993; Davis, 1999; Smith, 2000; Schwartz, 2000). Además, la técnica se ve afectada por el grado de privación y por la experiencia previa con los nutrientes, lo que sugiere que los efectos observados pueden ser resultado del establecimiento previo de un condicionamiento entre señales orosensoriales y estimulación postingestiva en episodios anteriores de ingesta real (Davis, 1999; Smith, 2000; Schwartz, 2000).

Pero la implicación de dichos factores en la conducta nutritiva será discutida ampliamente en un apartado posterior, dado que por sí solos, estos sistemas orosensoriales pueden funcionar a modo de incentivos dirigiendo el comportamiento (Leibowitz 1982; Rolls, 1982; Le Magnen, 1992; Kandel et al., 2000).

En relación con las señales fisiológicas de ‘feedback negativo’, se ha visto que el tracto gastrointestinal es capaz de detectar la presencia de nutrientes que estimulan la actividad de mecanorreceptores (sensibles a distensión mecánica, contracciones...), quimiorreceptores (activables por sustancias como la glucosa, ácidos grasos...), etc., que provocan la liberación de determinados péptidos y neurotransmisores (CCK, gastrina,...) al paso del alimento (Molina y Puerto, 1980; Smith et al., 1982; Tordoff & Friedman, 1989; Ritter et al., 1992a; Le Magnen, 1992; Gibbs et al., 1993; Grundy, 1992; Grundy et al., 1994; 1995; Fraser et al., 1995; Reid & Hetherington, 1997; Raybould, 1999; Woods & Stricker, 1999; Schwartz, 2000; Smith, 2000). Además, el consumo de comida incrementa la osmolalidad plasmática, que estimula la sed y, por tanto, la ingesta de agua, lo cual influye en el tamaño de la ingesta (Woods & Stricker, 1999).

La contribución de las señales de distensión gástrica ha sido estudiada ampliamente mediante diseños experimentales en los que se utilizan dispositivos tales como globos inflables, material no nutritivo, etc. para provocar el efecto, junto con paradigmas de ‘alimentación ficticia’. Aunque globalmente los resultados señalan que se produce una inhibición de la conducta nutritiva, ésta solo se obtiene si el grado de distensión es severo. Entonces, el efecto podría ser explicado, alternativamente, por la generación de malestar (Deutsch, 1990; Martin et al., 1991; Cecil et al., 1998; Davis, 1999; Schwartz, 2000). Otro planteamiento adicional resulta de las manipulaciones que implican la retirada de pequeñas cantidades de

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

alimento del estómago, lo cual modifica la tasa de vaciado gástrico y dificulta la valoración del efecto de distensión, no permitiendo diferenciar entre éste y otros efectos como por ej. la tasa de absorción de los nutrientes (Davis, 1999).

Sin embargo, en el momento actual, muchos autores defienden la implicación de las señales de distensión, que viajan a través de fibras vagales aferentes, en el control del tamaño de la ingesta, aunque se ha puntualizado que no serían las únicas responsables de la conducta (Gonzalez & Deutsch, 1981; Deutsch, 1990; Davis, 1999; Schwartz, 2000).

El tracto gastrointestinal posee, además, receptores que responden diferencialmente a distintos tipos de estimulación química (quimiorreceptores), cuyas señales son enviadas al cerebro a través de fibras vagales y de los nervios espláncnicos (Ritter et al., 1992a; 1994; Deutsch & Ahn, 1986; Cecil et al., 1998; Raybould, 1999; Davis, 1999).

Algunas de las investigaciones recientes en este campo, se han centrado básicamente en comparar la capacidad de distintos macronutrientes para reducir la ingesta, cuando son administrados en el intestino delgado. Los resultados muestran que tanto las grasas como los carbohidratos y aminoácidos son capaces de reducir la ingesta, pero sus efectos van mas allá de la mera detección del contenido calórico, pues el efecto inhibitorio que provocan no es equipotencial (Ritter et al., 1992a; Lucas et al., 1998; Davis, 1999; Schwartz, 2000). Aunque en estos experimentos se controló la tasa de vaciado gástrico, queda por dilucidar si el efecto inhibitorio de la ingesta se debe realmente a saciación o es resultado de los efectos aversivos de la infusión directa de los nutrientes en el duodeno –sin pasar, por ejemplo, por la fase cefálica- (Deutsch, 1990; Ritter et al., 1992a).

Gibbs y Smith fueron los primeros autores en demostrar que el paso de la comida a lo largo del canal digestivo provoca la liberación de péptidos que actúan modulando la ingesta. El mas conocido de ellos es la colecistoquinina (CCK) que disminuye el tamaño de las comidas y produce saciedad cuando es administrado exógenamente (Deutsch, 1990; Ritter et al., 1992a; Gibbs et al., 1993; Figlewicz, et al., 1996; Woods et al., 1998a; Schwartz, 2000; Smith, 2000), pero también se han identificado otras sustancias como el glucagón, el péptido liberador de la gastrina (GRP)/bombesina, somatostatina, amilina, enterostatina etc., que actuarían frenando la ingesta (Gibbs et al., 1993; Figlewicz, 1996; Rowland et al., 1996; Raybould,

1999; Woods et al., 2000). De nuevo, aunque muchos autores defienden la implicación de estas sustancias, los resultados deben tomarse con cautela dado que la inhibición de la ingesta que provocan cuando son administrados exógenamente podría deberse a que provoca efectos aversivos en lugar de saciadores (Deutsch, 1990).

Finalmente, varios autores defienden la participación, además de los factores orosensoriales, gástricos e intestinales, del hígado en el control de la ingesta y el metabolismo energético (Tordoff & Friedman, 1986, 1988; Friedman et al., 1999; Langhans, 1996). Este órgano es el primero a través del cual fluyen los nutrientes a medida que son absorbidos por el tubo digestivo y está inervado por ramas aferentes del nervio vago que contienen además receptores glucosensitivos (Martin et al., 1991; Ritter et al., 1992b). Algunas investigaciones muestran, por ejemplo, que las inyecciones de glucosa en la vena porta hepática –en cantidades fisiológicas- produce una reducción de la ingesta, aunque menor que la provocada por infusión intrainestinal de esta sustancia (Tordoff & Friedman, 1988; Martin et al., 1991; Ritter et al., 1992b). Por otra parte, el incremento de la oxidación de ácidos grasos en el hígado, altera las características electroquímicas de la membrana de los hepatocitos activando la bomba de sodio, cuyo efecto es eliminado por vagotomía (Tordoff & Friedman, 1988; Friedman et al., 1999; Scharrer, 1999; Langhans, 1996).

Pero estas manipulaciones o incluso los trasplantes de hígado, tienen un efecto poco marcado sobre la ingesta, lo cual significa, a la luz de la evidencia expuesta anteriormente, que su papel es necesario pero no suficiente. Por tanto habrá que considerar la participación todos los factores arriba mencionados, cuyas señales –incluso redundantes- interactúan, en circunstancias normales, para regular la conducta nutritiva (Martin et al., 1991).

Hasta ahora hemos destacado la participación de una serie de señales periféricas que actúan a corto plazo en relación con la ingesta y la regulación homeostática, pero también hemos de tener en cuenta que el complejo mecanismo responsable de la homeostasis calórica controla variables a largo plazo como es del caso del peso corporal, basándose fundamentalmente en la cantidad de energía almacenada en los adipocitos. Se rige por las leyes generales de la termodinámica, según las cuales, para que el peso se mantenga estable, el consumo y gasto energético deben estar equilibrados (Jéquier & Tappy, 1999; Woods et al., 2000).

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Estos mensajes generados en el tejido adiposo son de naturaleza humoral y reflejan el volumen global de grasa almacenada –mas que el número de células adiposas o su tamaño, según se desprende de los experimentos de trasplante o escisión quirúrgica de tejido-, en función de la cual se llevan a cabo los ajustes necesarios (Figlewicz, 1996; Woods et al., 2000; Mauer et al., 2001).

El tejido adiposo blanco es innervado por neuronas sensoriales que llevan información al cerebro acerca de las reservas lipídicas, pero dado que los experimentos en los que se realiza una denervación con capsaicina no producen un incremento significativo del volumen de grasa por la ausencia de señales, se ha concluido que la vía neural en este caso no es un factor clave (Mauer et al., 2001). En cambio, los experimentos de parabiosis mencionados al principio de este capítulo, pusieron de manifiesto la presencia de algún factor humoral capaz de informar al cerebro sobre la energía almacenada (Martin et al., 1991; Mauer et al., 2001).

Uno de los posibles candidatos es la insulina, hormona segregada por las células β de los islotes pancreáticos en respuesta a la glucosa circulante. Sus efectos agudos son anabólicos, promoviendo el almacenamiento de esta sustancia durante la fase de abundancia o absortiva. A largo plazo, en cambio, los niveles elevados de insulina actúan en sentido catabólico haciendo que el animal deje de comer y promoviendo el gasto energético y la oxidación lipídica por activación del S. Simpático. Estos niveles de insulina circulante son detectados por receptores cerebrales específicos distribuidos a lo largo del hipotálamo y S. Límbico (Figlewicz, 1996; Woods & Stricker, 1999; Jéquier & Tappy, 1999; Woods et al., 2000).

La otra hormona implicada es la leptina, sintetizada por el tejido adiposo blanco y liberada al torrente circulatorio en proporción al volumen de grasa almacenada. Actúa sobre receptores cerebrales específicos donde modula la síntesis y liberación de otras sustancias, que a su vez influyen en la conducta de ingesta, pero su papel fisiológico no está aún bien determinado. Se ha propuesto que podría actuar como señal indicativa de la cantidad de grasa almacenada, poniendo en marcha mecanismos que disminuyen la ingesta y promueven el gasto energético, o bien, podría actuar como indicador de que las reservas de grasa son suficientes para asegurar las necesidades metabólicas durante un determinado período de tiempo (Friedman, 1998; Elmquist et al., 1998; Mauer et al., 2001).

En animales, se ha visto que la mutación genética que ocurre en los ratones ob/ob e implica la ausencia de leptina conduce a una obesidad extrema junto con aumento de la ingesta, resistencia a la insulina y diabetes. Otra posible mutación genética que conduce al desarrollo de obesidad se observa en el genotipo db/db y afecta a los receptores de leptina, que se vuelven insensibles –por la mutación-, a pesar de los niveles elevados de ésta en sangre. En la mayoría de los casos de obesidad humana, se ha visto que no hay alteraciones genéticas sino mas bien una insensibilidad funcional a esta hormona (Friedman, 1998; Inui, 1999; Jéquier & Tappy, 1999; Woods & Stricker, 1999; Woods et al., 2000; Schwartz et al., 2000; Mauer et al., 2001).

Insulina y leptina, regulan pues, -actuando sobre receptores hipotalámicos del N. Arqueado- la liberación de otras sustancias: la leptina, principalmente ejerce un papel inhibitorio sobre la secreción de neuropéptido Y (agente orexígeno), excitatorio sobre la liberación de péptidos derivados de la Proopiomelanocortina (POMC) reductores de la ingesta, etc. Ambas hormonas tienen una influencia recíproca sobre los niveles de glucocorticoides (que incrementan la ingesta y promueven la ganancia de peso), actuando como parte del complejo mecanismo regulatorio antes mencionado.

Por lo tanto, una vía de detección y transmisión de la información periférica hacia el Sistema Nervioso Central de acción lenta es, como ya hemos apuntado, la liberación de hormonas en el sistema circulatorio. Junto al N. Arqueado, el Área Postrema es una de las zonas privilegiadas para recibir este tipo de información humoral y enviarla al siguiente relevo, el N. Parabraquial lateral (Kiefer, 1985; Lança & Van der Kooy, 1985; Papas & Ferguson, 1990).

En cambio, las fluctuaciones en los niveles de nutrientes específicos y las señales viscerales de saciación son captadas por un sistema de detectores centrales y/o periféricos, cuya localización es aún controvertida. Por ejemplo, se han hallado receptores sensibles a glucoprivación en el hipotálamo lateral (HTL), Área Postrema (AP), Núcleo del Tracto Solitario (NTS) y nervio Vago (Par craneal X) (Campfield & Smith, 1990; Ritter et al., 1992b; Ritter et al., 2000), pero también a nivel hepático, los cuales harían uso de una vía vagal (Ritter et al., 1994). El aumento de las concentraciones lipídicas en la sangre, parece ser detectado a nivel periférico y transmitido al cerebro a través de vías vagales hepáticas e intestinales, además de hacerlo mediante señales humorales (Ritter et al., 1992b; Calingasan & Ritter, 1993).

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Estas fibras vagales llevan información periférica hacia el primer relevo central, el NTS medial y caudal (Yuan & Barber, 1991) que a su vez envía proyecciones al Núcleo Parabraquial (NPB) (Fulwiler & Saper, 1984; Halsell, 1992).

Otra de las posibles razones que lleva a los individuos a ingerir alimento son las cualidades sensoriales de los alimentos. Aspectos como el gusto, olor, textura, etc. de ésta pueden estimular el apetito y funcionar a modo de incentivos dirigiendo la conducta. Incluso pueden llevar al desarrollo de problemas de obesidad y sobrepeso (Leibowitz, 1992; Le Magnen, 1992; Rolls, 1992; Levine & Billington, 1997; Drewnowski, 1997). Si asumimos una visión puramente descriptiva del refuerzo provocado por la ingestión de alimentos, podemos afirmar que la comida es reforzante en la medida en que un individuo es capaz de 'esforzarse' por conseguirla, del mismo modo en que, por ejemplo, un animal aprende una respuesta operante con el fin de obtener estimulación eléctrica que active determinadas zonas de su cerebro (White & Milner, 1992).

Varios han sido los procedimientos experimentales utilizados en el estudio de estos mecanismos orosensoriales que favorecen la ingesta: por ejemplo, se han desarrollado instrumentos computerizados, -'lickometers'-, para el análisis microestructural de la conducta, que permiten registrar de manera precisa variables como el volumen ingerido por unidad de tiempo, número de contactos orales, duración, pausas, etc. o el 'Test de Reactividad Gustativa', desarrollado por Grill y Norgren (Davis, 1999; Smith, 2000).

En la fisiología del sistema gustativo tenemos que distinguir entre las propiedades sensoriales del estímulo –cualidad e intensidad- y su valor hedónico (Drewnowski, 1997; Spector, 2000):

La cualidad del estímulo gustativo se refiere a la capacidad para detectar y reconocer su sabor, y para distinguirlo respecto a otros, como consecuencia de la interacción de sus componentes químicos con los receptores de la cavidad oral. Sigue una función logarítmica dependiente de la concentración (Drewnowski, 1997; Spector, 2000). Los investigadores en este campo hablan de que los individuos son capaces de detectar cuatro sabores básico –dulce, amargo, ácido y salado- a los que recientemente se ha incorporado uno más, el *umami* o sabor 'a proteína'. Estos

sabores son detectados por las células receptoras, agrupadas en ‘botones’, y estos a su vez en las ‘papilas gustativas’ de la lengua, cuya información es recogida por los nervios Facial, Glossofaríngeo y Vago (VII, IX y X) y transmitida a niveles centrales (Rolls, 1997; Spector, 2000; Sako et al., 2000; Smith & Margolskee, 2001).

Parece haber una predisposición innata de preferencia hacia los sabores dulces y salados, así como una tendencia a rechazar productos de gusto ácido y amargo, pero estas preferencias-aversiones pueden ser tempranamente modificadas por el aprendizaje, como veremos posteriormente (Drewnowski, 1997; 1998; Spector, 2000).

La mayoría de las neuronas que procesan información gustativa responden a más de un sabor –multimodales-, aunque su respuesta es máxima ante alguno de ellos y su sensibilidad se ve ajustada de forma cada vez más precisa a medida que la información avanza hacia estructuras del cerebro anterior (Halsell & Frank, 1992; Halsell & Travers, 1997; Rolls, 1997; Smith & Margolskee, 2001). La primera sinapsis tiene lugar en el Núcleo del Tracto Solitario (NTS) rostral y Formación Reticular parvicelular, y de aquí la información pasa al siguiente relevo, el N. Parabraquial medial (NPBm), a partir del cual se bifurca en dos ramas: 1) La ruta sensorial clásica hacia el Tálamo medial y la Corteza Gustativa -parte facial de la corteza somatosensorial y zona ventral de la corteza insular-, y 2) Una vía ventral que pasa a través de estructuras mesencefálicas conectando con el Hipotálamo Lateral (HTL), Núcleo Lecho de la Estría Terminal (BNST), Sustancia Innominada (SI) y N. Central Amigdaloides (CeA), -que también recibe proyecciones desde el NTS- (Norgren & Leonard, 1971; Fulwiler & Saper, 1984; Kiefer, 1985; Dunn & Everitt, 1988; Norgren, 1990; Halsell, 1992; Reilly & Pritchard, 1996a; 1996b; Schul et al., 1996; Rolls, 1997; Spector, 2000). En primates se han observado algunas diferencias con respecto a la trayectoria que sigue la información gustativa, pues ésta se dirige directamente al Tálamo y alcanza la ruta ventral mediante conexiones descendentes desde las cortezas gustativas primaria y asociativa (Rolls, 1997; Spector, 2000).

El valor hedónico, por su parte, se refiere al proceso que promueve la ingesta de nutrientes sólidos y líquidos. Esta función se debe, en parte, a su capacidad para activar el circuito motivacional de refuerzo (Taber et al., 1998; Tanda & DiChiara, 1998). Aunque se suele aceptar que la preferencia por un determinado sabor permite

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

predecir el grado de aceptación de una comida, esta relación no siempre es simple porque pueden influir multitud de variables intervinientes (Drewnowski, 1997).

Finalmente, es preciso resaltar que la intensidad del estímulo gustativo está basada en el grado de concentración, y su relación con el valor hedónico del alimento adopta la forma de U invertida, en el sentido de que el aumento de la preferencia por un sabor apetitoso es proporcional a la concentración de éste hasta un valor límite, por encima del cual se puede observar una tendencia al rechazo (Le Magnen, 1992; Drewnowski, 1997).

Uno de los fenómenos más relevantes en relación con la 'palatabilidad' o placer generado por la comida, es la denominada "saciedad sensorialmente específica", estudiada originalmente por Le Magnen. Este autor presentó a un grupo de ratas una misma dieta aderezada con cuatro sabores distintos, de manera que cada animal tenía acceso a cada uno de los sabores durante 30 minutos. Observó que en estas circunstancias, los animales consumían de 2 a 3 veces más cantidad que si se les presentaba el alimento con un único sabor durante un período de tiempo equivalente (Le Magnen, 1992; Carlson, 1993). Este resultado ha sido reproducido en primates y en seres humanos, y con estímulos olfativos o combinados gusto-olfatorios (Le Magnen, 1992; Rolls, 1997), poniendo de manifiesto que sabor, color, forma y textura son tan importantes como el contenido en cuanto a macronutrientes, a la hora de regular la cantidad de alimento a ingerir. [Se trata de un fenómeno distinto de la 'aliestesia', en el que se produce un cambio en la valoración hedónica de los estímulos gustativos, como consecuencia de la aparición de señales internas, provocadas por la infusión de glucosa en el intestino, por ejemplo (Rolls, 1997)].

Se ha comprobado que las preferencias hacia determinados sabores están bajo la influencia del sistema opiáceo, cuya implicación en la conducta ingestiva fue propuesta inicialmente por este mismo autor, Le Magnen, el cual observó que la administración de un antagonista opiáceo redujo la preferencia por soluciones de sacarina y sacarosa (Le Magnen et al., 1980; Le Magnen, 1992). Posteriormente otros investigadores, utilizando fármacos que actúan sobre el sistema opiáceo endógeno, han confirmado estos resultados y han puesto de manifiesto la existencia de una importante relación entre conducta nutritiva y actividad opiácea (Cooper & Higgs, 1994; Bodnar, 1996; Gosnell & Levine, 1996; Carr 1996; Vacarino, 1996; Drewnowski, 1997)

Y a la inversa, la ingesta de productos apetitosos tales como chocolate, dulces y pasteles, azúcar, sacarina, etc. modifica la actividad del sistema opiáceo, provocando por ej. liberación de β -endorfina en el Hipotálamo (Dum et al., 1983) al mismo tiempo que afecta a las consecuencias conductuales que tienen estas sustancias opiáceas generando, entre otros efectos, analgesia y/o alteraciones en la sensibilidad hacia los fármacos afines (Kanarek et al., 1997a; 1997b; 2000; D’Anci et al., 1997; Mercer & Holder, 1997).

Una cuestión relevante en relación con la modulación de la ingesta por parte de los opiáceos tiene que ver con el tipo de nutrientes cuya ingesta se ve potenciada por estas sustancias. Las investigaciones desarrolladas en este campo se agrupan, básicamente, en torno a dos hipótesis: Aunque una amplia evidencia sugiere que los opiáceos podrían actuar favoreciendo la ingesta de una amplia gama de sabores y nutrientes en función de las preferencias gustativas previas de cada individuo (Gosnell et al, 1990; Evans & Vacarino, 1990; Drewnowski et al., 1992; Doyle et al., 1993; Koch & Bodnar, 1994; Zhang & Kelley, 1997; Levine & Billington, 1997; Giraud et al, 1999), otros autores sugieren que estos péptidos opiáceos podrían alterar la ingesta de un tipo específico de macronutrientes, las grasas, independientemente de las preferencias iniciales de los sujetos (Marks-Kaufman & Kanarek, 1990; Levine & Billington, 1997).

Finalmente, *el estado interno* -determinado por la combinación de los numerosos factores mencionados al comienzo de este capítulo e implicados en el mantenimiento de la homeostasis calórica-, *podría actuar modulando el valor motivacional de los estímulos gustativos –palatabilidad-* y aumentando su valor de incentivo frente a otros estímulos del ambiente. Es decir que el valor hedónico de los alimentos, determinado fundamentalmente por las cualidades orosensoriales de la comida que hacen que ésta sea reforzante en si misma y actúan como incentivos dirigiendo la conducta, puede verse incrementado en la medida en que su sabor es asociado con la eliminación de estados de desequilibrio metabólico tras la ingesta (Le Magnen, 1992; Carr, 1996; Nencini, 1996; Carr, 2002; Saper et al., 2002).

En este sentido, experimentos clásicos de ‘aliestesia’ observaron que la preferencia por el sabor/olor de la comida disminuyó una vez que los sujetos

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

experimentales habían recibido una infusión directa de glucosa en el tracto gastrointestinal (Cabanac, 1971; Rolls, 1997).

Asimismo, estudios llevados a cabo por Rolls y colaboradores en monos, mediante registros electrofisiológicos, han revelado la existencia de células que responden a la visión, olor, etc. de los alimentos solo si los animales están hambrientos y dejan de hacerlo cuando éstos se encuentran saciados. Estas células se localizan en el Córtex Orbitofrontal caudolateral –corteza gustativa de asociación-. Por lo tanto, se puede afirmar que en algunas regiones cerebrales relacionadas con el gusto –principalmente del cerebro anterior-, el nivel de saciedad puede modular la valoración hedónica que el individuo hace de los alimentos (Rolls, 1994; 1997).

Siguiendo con esta misma línea de razonamiento, la aparente contradicción que se manifiesta en los datos expuestos en el apartado anterior, en relación a si los opiáceos estimulan la ingesta de un tipo específico de macronutrientes o actúan favoreciendo el consumo de alimentos en función de las preferencias individuales, podría explicarse, tal y como Zhang y colaboradores han demostrado, en función de las relaciones entre *hambre* y *palatabilidad*: En condiciones de privación, la inyección de agonistas opiáceos en el N. Accumbens tuvo un efecto facilitador amplio que estimuló la ingesta de nutrientes según las preferencias basales, mientras que en situaciones de ausencia de déficit, este efecto es más selectivo hacia un determinado tipo de macronutrientes –las grasas-, que son casi universalmente aceptados como apetitosos (Zhang, et al., 1998).

Como veremos en un apartado posterior, la privación de alimento y los cambios en las condiciones específicas de la ingesta (ayuno, glucoprivación, hambres específicas, falsa ingesta...) pueden alterar los niveles de opiáceos endógenos afectando a la actividad de los receptores sobre los que actúan (Carr & Papadouka, 1994; Koch & Bodnar, 1994; Bodnar et al., 1995; Leventhal & Bodnar, 1996; Stewart et al., 1996; Ragnauth et al., 1997).

2.2- Aprendizaje de Preferencias Gustativas

Aunque es bien sabido que animales y humanos muestran preferencias innatas hacia determinados sabores (dulces y salados), también tienden a rechazar

otros (ácidos y amargos) y estas tendencias pueden ser, en gran medida, modificadas por la experiencia (Le Magnen, 1992; 1999; Drewnowski, 1997).

Para algunos estados carenciales (deficiencias de sodio, glucosa, etc.), el reconocimiento innato de ciertas sustancias tiene un importante valor de supervivencia ya que el organismo requiere un aporte importante y continuo, pero en el caso de otras necesidades no tan básicas, no se precisan unas exigencias tan específicas en la conducta, pues el tipo de dieta que los individuos ingieren asegura la presencia de cantidades suficientes de estos productos (Parker et al., 1973). Es en este sentido en el que resulta adaptativo un mecanismo de aprendizaje asociativo como el Condicionamiento de Preferencias Gustativas (CPG), en donde se asocian las cualidades orosensoriales (inmediatas) de un estímulo gustativo, con los beneficios posteriores que se obtienen (a largo plazo), los cuales actuarían como reforzadores primarios (Parker et al., 1973; Puerto et al., 1976a; 1976b; Puerto & Molina, 1977; Deutsch & Tabuena, 1986; Le Magnen, 1992; 1999; Azzara & Sclafani, 1998; Pérez et al., 1998; Spector, 2000).

Este tipo de aprendizaje, al igual que el Aprendizaje Aversivo Gustativo (AAG), que permite la evitación de productos tóxicos y nocivos, tiene un importante valor adaptativo, pero se forma en condiciones menos dramáticas. Ambos, sin embargo -AAG y APG-, se consideran extremos de un continuo, como ya propusieron Rozin y Kalat en 1971 (-citados por: Bures et al., 1998-). Según estos autores, la comida se puede clasificar en un continuo: *familiar aversiva --- novedosa --- familiar segura*, de manera que los Estímulos Gustativos novedosos van modificando su valor hacia un extremo u otro en función de la experiencia, hasta llegar a ser considerados 'familiares y situados en un punto de ese continuo (Bures et al., 1998).

Parece haber, pues, una interacción entre la capacidad innata para responder a determinadas sustancias y la habilidad adquirida para asociar la superación y reducción de una necesidad metabólica con el sabor de estímulos previamente ingeridos, pues este efecto de condicionamiento es relativamente independiente de las preferencias innatas de los individuos -como se ha puesto de manifiesto en algunos de los experimentos citados en el apartado anterior- (Parker et al., 1973; Le Magnen, 1992; 1999; Drewnowski, 1997).

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Este aprendizaje puede ocurrir a edades tempranas de la vida de los individuos, incluso '*in utero*', según se ha puesto de manifiesto, tras conseguir que animales neonatos prefirieran el sabor de una sustancia que se había sido inyectada previamente en el líquido amniótico (Le Magnen, 1992). También han surgido dudas respecto a si el consumo de una dieta variada –como ocurre en seres humanos– podría interferir con el establecimiento del aprendizaje, pero experimentos recientes de “cafetería” permiten concluir que no existe tal interferencia (Perez et al., 1998).

Es precisamente en seres humanos donde los factores sociales, culturales, ambientales, económicos, etc., tienen un importante papel modulador sobre las preferencias/aversiones gustativas y la selección de los nutrientes. Por ejemplo, en niños pequeños estas preferencias están determinadas fundamentalmente por la familiaridad –adquirida– y por el sabor dulce, que les lleva a ingerir alimentos ricos en carbohidratos/grasas como helados, chocolate, golosinas, etc. En ancianos, el proceso de envejecimiento puede llevar a una pérdida de la agudeza sensitiva hacia los estímulos gustativos, pero no se han evidenciado modificaciones en su valor hedónico (Le Magnen, 1992; Drewnowski, 1997).

Estas interacciones entre predisposiciones innatas y variables ambientales pueden conducir también al desarrollo de ciertos trastornos alimentarios (obesidad/bulimia) muy extendidos en los países desarrollados (Drewnowski, 1997; Jéquier & Tappy, 1999). De hecho se ha visto que las personas obesas tienen tendencia a preferir comidas ricas en grasas y carbohidratos, y que productos como el chocolate, helados y dulces, suelen ser los preferidos durante los episodios de ingesta compulsiva (Drewnowski, 1997; Jéquier & Tappy, 1999).

Por último, la capacidad de asociar sabores con beneficios metabólicos, no se limita a la reducción de estados naturales de necesidad como el hambre o la sed, sino que se extiende hacia estados de disconfort/malestar no naturales provocados por la ausencia de determinadas drogas en individuos adictos –síndrome de retirada–, como por ejemplo cafeína o morfina (Parker et al., 1973; Yeomans et al., 2000).

Las técnicas de Aprendizaje de Preferencias Gustativas han sido de gran utilidad para las investigaciones en materia de nutrición, especialmente las relacionadas con el control neural de la ingesta. El paradigma experimental más utilizado consiste en comparar el consumo de dos sabores, uno que es asociado con la infusión de nutrientes en el Tracto Gastrointestinal (EC+), y otro con la

administración de vehículo (EC-), de manera que el animal aprende, en ensayos sucesivos a discriminar entre ambos sabores (Bures et al., 1998; Azzara & Sclafani, 1998; Pérez, et al., 1998). Se ha observado por ejemplo que, a veces, un único ensayo de emparejamiento entre sabor y/o olor con consecuencias nutricionales beneficiosas es suficiente para provocar un cambio en la “palatabilidad” del estímulo gustativo y/o en su carácter hedónico (Laeng et al., 1993; Drewnowski et al., 1992; Drewnowski, 1997).

2.3- Mecanismos Centrales de Control de la Ingesta y el Peso Corporal

Durante mas de cinco décadas se han venido llevando a cabo numerosas investigaciones encaminadas a dilucidar cuales son las Estructuras Cerebrales responsables del Control de la Ingesta y el Metabolismo Energético Corporal, que integrarían las señales generadas en la periferia y pondrían en marcha las respuestas motivacionales adecuadas (Martin et al., 1991; Le Magnen, 1992; Rolls, 1994; Woods & Stricker, 1999).

Las primeras hipótesis sobre las bases biológicas de la conducta nutritiva se centraron en el *Hipotálamo*. Los datos iniciales provenían de la observación de pacientes que habían desarrollado obesidad tras detectárseles tumores en el diencéfalo basal, así como de los dramáticos efectos provocados por la manipulación experimental de diversas áreas hipotalámicas sobre la ingesta, en animales: Concretamente, Hetherington y Ranson así como Anand y Brobeck descubrieron que las lesiones electrolíticas del Hipotálamo Ventromedial (HTVM) producían hiperfagia y obesidad, mientras que lesiones del Hipotálamo Lateral (HTL) generaban una disminución de la ingesta que podía llevar a los animales a la muerte si no se les alimentaba mediante una sonda. Por el contrario, la Estimulación Eléctrica de estas zonas provocaba, respectivamente, inhibición y facilitación de la ingesta de alimentos incluso en animales saciados (Grossman, 1979; Rolls, 1982, 1994; Martin et al., 1991; Le Magnen, 1992; Rowland et al., 1996).

A partir de estos datos, los investigadores propusieron la existencia de un mecanismo hipotalámico de control simple en el que la regulación de la ingesta podría estar en función de la actividad de estos dos centros interconectados entre sí, el HTL o 'centro del hambre' y el HTVM o 'centro de la saciedad'-. Según Stellar, cuando el centro de saciedad era activado provocaba una inhibición en el centro del

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

hambre, generando en consecuencia, el cese de la ingesta, mientras que si el HTVM estaba inactivo no había inhibición sobre el HTL y la conducta se manifestaba (Stellar, 1954; Rolls 1982, 1994; Martin et al., 1991; Le Magnen, 1992; Rowland et al., 1996).

Pero los resultados aparecidos posteriormente han ido cuestionando la validez de esta hipótesis: Las lesiones del HTVM producían además de obesidad una serie de cambios conductuales, metabólicos y fisiológicos inesperados: los animales se volvían agresivos, aumentaba la liberación de insulina en respuesta a la comida y descendía la actividad del sistema simpático. Estas lesiones afectaban también a fibras de paso, interrumpiendo vías serotoninérgicas que tienen su origen en los núcleos del Rafe o noradrenergicas del Haz Ventral, así como las conexiones procedentes de la zona paraventricular –HTPV- (Le Magnen, 1992; Rolls, 1994).

La afagia inducida por lesiones del HTL se caracterizaba por un rechazo activo de la comida si involucraba a zonas anteriores, o una reacción pasiva si involucraba a regiones posteriores, en el sentido de que el animal solo ingería en el caso de que la comida se le pusiese directamente en la boca, lo que llevó a pensar en que las lesiones podrían haber afectado a fibras de paso pertenecientes a la Vía Dopaminérgica Nigroestriada responsable de la iniciación de movimientos voluntarios y al Haz Prosencefálico Medial (Rolls, 1994; Le Magnen, 1992; Martin et al., 1991; Carlson, 1993).

La teoría dual hipotalámica no explicaba tampoco algunas cuestiones tales como la integración de las señales de ingesta con la homeostasis calórica, los aspectos relacionados con la motivación y el refuerzo, la integración de influencias excitatorias e inhibitorias, el control de las comidas individuales, la participación e influencia de otros sistemas neurales, etc. (Woods & Stricker, 1999). Tales carencias, junto con la aparición de nuevas investigaciones que implicaban a regiones no hipotalámicas, ha desembocado en la formulación de una teoría mucho más compleja y sofisticada en donde los núcleos Lateral y Ventromedial no serían sino partes de un macrosistema. Este incluiría estructuras situadas a distintos niveles del neuroeje, así como diferentes vías neuroquímicas, responsables del control de la ingesta y el metabolismo energético, sin olvidar la participación de otros sistemas cerebrales relacionados con el análisis sensorial de los estímulos relacionados con la ingesta –gusto, olfato, textura-, su valoración hedónica, el establecimiento de asociaciones aprendidas, el estado metabólico, etc. (Martin et al., 1991; Leibowitz, 1992; Le

Magnen, 1992; Carlson, 1993; Cooper & Higgs, 1994; Rolls, 1994; Woods & Stricker, 1999).

A pesar de todas las discrepancias habidas, el *Hipotálamo* sigue siendo considerado como una zona de gran importancia en el control de la ingesta, metabolismo y peso corporal, en el cual converge información sobre nutrientes, hormonas y señales neurales que modulan los procesos fisiológicos y conductuales (Le Magnen, 1992). De hecho, se han identificado nuevas estructuras hipotalámicas cuya participación es tan importante como la de los núcleos clásicamente implicados (Martin et al., 1991; Le Magnen, 1992; Rolls, 1994): Por ejemplo, las lesiones del núcleo Paraventricular (NPV) provocan sobreingesta y obesidad como consecuencia de un mecanismo regulador a corto plazo que haría uso de señales circadianas (Martin et al., 1991; Le Magnen, 1992; Leibowitz, 1992). En el Dorsomedial (HTDM) las manipulaciones alteran la ingesta de comida/agua y peso corporal, probablemente en función de sus conexiones con centros que procesan información metabólica (Thompson & Swanson, 1998).

Por su parte, lesiones en las regiones hipotalámicas lateral y ventromedial mediante el empleo de neurotoxinas, han confirmado nuevamente el papel de estos subnúcleos en el control de la ingesta y el peso corporal (Le Magnen, 1992; Rolls, 1994). Uno de los hallazgos más importantes, como veremos más adelante, es la presencia en estas zonas de células nerviosas que actúan modificando la tasa de actividad en función de las fluctuaciones en los niveles de glucosa circulante (Oomura, 1976, -citado por Hoebel et al., 1982-; Le Magnen, 1992).

En este sentido, y en un interesante estudio realizado por Rolls y colaboradores utilizando registros unicelulares, se identificó una población neuronal localizada en el HTL y Sustancia Innominada (SI), cuyas respuestas estaban relacionadas específicamente con la ingesta (Rolls, Burton & Mora, 1980; citado por Rolls, 1982; 1994). Algunas de estas células respondían ante la visión y/o sabor de los alimentos, pero solo en el caso de que los individuos estuviesen hambrientos, cesando su actividad cuando se encontraban saciados. Volvían a responder si se les presentaba una comida diferente, con lo cual podrían estar relacionadas con 'saciedad sensorialmente específica' y, por tanto, con su valor motivacional. De hecho, estos y otros autores han comprobado: a) que es posible conseguir conducta autoestimuladora y actividad neuronal dependiente de la presencia de comida mediante los mismos electrodos (Rolls, 1982, 1994; Papadouka & Carr, 1994) y b)

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

que la privación de alimento tiene un efecto facilitador sobre dicha conducta (Carr & Papadouka, 1994; Abrahamsen et al., 1995; Carr et al., 2000).

Tal grado de convergencia hace pensar que estimulación e ingesta podrían interactuar activando un mecanismo común de refuerzo, quizá a través de la *Vía Dopaminérgica Mesocorticolímbica* (Mogenson, 1982; Wise, 1982, 2000; Rolls, 1994; Di Chiara & North, 1992; Koob, 1992). En efecto, durante la ingesta de alimento -al igual que ocurre tras la administración de ciertos fármacos psicoactivos y autoestimulación- se produce un incremento en la liberación de dopamina en el Núcleo Accumbens (ACB), estructura propuesta como punto de enlace entre los sistemas límbico y motor (Mark et al., 1994; Salamone et al., 1994; Salamone, 1994; Martel & Fantino, 1996; Taber et al., 1998).

Nuevas líneas de investigación se han sumado en apoyo a esta idea. Así, algunos autores han comprobado que diversas manipulaciones neuroquímicas en estructuras que forman parte del S. de Refuerzo (por ej.: N. Accumbens, Área Tegmental Ventral, etc.), afectan al consumo de alimento en condiciones de privación y/o en situaciones en que se presenta comida muy apetitosa (Evans & Vacarino, 1990; Bodnar et al., 1995; Bakshi & Kelley, 1994; Kelley et al., 1996; Zhang & Kelley, 1997, 2000; Zhang et al., 1998; Ragnauth et al., 1997; Peciña & Berridge, 2000). Inversamente, mediante técnicas inmunohistoquímicas, se ha podido comprobar que tanto la restricción de nutrientes como la ingesta de productos apetitosos produce modificaciones en la actividad nerviosa basal de estructuras pertenecientes al Sistema de Recompensa cerebral (Wolinsky et al., 1994; Berman et al., 1994; Carr et al., 1998; Park & Carr, 1998; Carr et al., 2000).

Las neuronas del HTL y SI, -según las investigaciones de Rolls-, también podían ser influenciadas por el aprendizaje, ya que llegaban a responder ante estímulos neutros que habían sido asociados previamente con la comida -por ej., ante la visión de una jeringa con la que se administraba el alimento- (Rolls, 1982; 1994). Requieren la participación de conexiones con la *Corteza visual Inferotemporal* y la *Amígdala*, estructuras relacionadas con tareas de discriminación visual y valoración motivacional de estímulos biológicamente relevantes (Rogers & Hermann, 1992; Rolls, 1982; 1994; 1996; 1997; 2000).

En este modelo en el que adquiere relevancia la valoración hedónica de las características sensoriales de la comida, puede ser importante la actividad del sistema

gustativo desde sus conexiones más básicas hasta niveles corticales -donde es posible integrar información procedente de diversas modalidades (gusto, olfato, visión...)-, la modulación de la actividad gastrointestinal y la modificación del patrón básico de actividad en función del estado motivacional. En este sentido se ha destacado la participación de las áreas *Insular* y *Orbitofrontal* (Rogers & Hermann, 1992; Rolls, 1982; 1994; 1997; 2000).

Sin embargo, la nutrición es una actividad esencial para la supervivencia de los individuos, con lo cual es lógico pensar que al menos en sus aspectos más básicos sea sustentada por circuitos filogenéticamente antiguos (Leibowitz, 1992; Le Magnen, 1992; Cooper & Higgs, 1994). Diversos estudios experimentales han puesto de manifiesto que el *Tronco cerebral* es capaz de integrar diversos tipos de señales interoceptivas y exteroceptivas y producir comportamientos coordinados para regular la ingesta (Grill & Norgren, 1978a; 1978b; Grill & Kaplan, 1990; Carlson, 1993; Rowland et al., 1996; Woods & Stricker, 1999).

Esta zona, posee los mecanismos necesarios para masticar y deglutir en respuesta a varias formas de estimulación oral, para regular el volumen de una comida y para coordinar funciones gastrointestinales a corto plazo (Rogers & Hermann, 1992; Altschuler et al., 1992). De hecho, los animales descerebrados a nivel supracolicular fueron capaces de regular conductas consumatorias, que en ciertos aspectos no diferían significativamente de las mostradas por los sujetos intactos, aunque en otros pudieran resultar anómalas o desorganizadas (Grill & Kaplan, 1990).

Además, dentro de esta región existen importantes zonas de recepción de información periférica relacionada con la ingesta: el Núcleo del Tracto Solitario, el Área Postrema y el N. Parabraquial (Edwards & Ritter, 1989; Grill & Norgren, 1978a; Flynn & Grill, 1983; Ino et al., 1987; Nagai et al., 1987; Takaki et al., 1990; Carr et al., 1991; Rogers y Hermann, 1992; Li & Rowland, 1993; 1995; Calingasan & Ritter, 1993; Li et al., 1994; Xu et al., 1995; Wolinsky et al., 1996; Moufid-Bellancourt et al., 1996; Ritter et al., 2000...).

A este nivel, los sujetos son capaces de discriminar entre diferentes estímulos gustativos generando reacciones de ingestión activa o rechazo, y codificar sus características sensoriales así como su valor motivacional (Grill & Kaplan, 1990; Smith et al., 1994; Yamamoto et al., 1994). Pero por otro lado, las investigaciones

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

llevadas a cabo por Grill y Norgren con animales descerebrados a nivel supracolicular, pusieron de manifiesto que éstos son capaces de exhibir patrones ingestivos básicos, aunque como ya se ha señalado, no logran establecer asociaciones gustativo-visceral (Grill & Norgren, 1978a; 1978b; Grill & Kaplan, 1990; Smith et al., 1994; Yamamoto et al., 1994; Woods & Stricker, 1999; Reilly & Trifunovic, 2000a; 2000b; Smith, 2000).

La participación del Tronco en el control de la conducta nutritiva modulada por factores de tipo homeostático ha quedado también demostrada en diferentes estudios experimentales. Así, los animales descerebrados son capaces de tomar mayores cantidades de sacarosa tras veinticuatro horas de privación o después de una inyección de insulina (Grill & Norgren, 1978a; Flynn & Grill, 1983). Por el contrario, redujeron su consumo, o bien rechazaron infusiones intraorales de sacarosa cuando se encontraban saciados, siguiendo un patrón similar al manifestado por los sujetos controles (Grill & Norgren, 1978a; Grill & Kaplan, 1990).

Tales resultados apoyan la hipótesis anteriormente esbozada de que el substrato troncoencefálico puede llevar a cabo una integración primaria de la información nutritiva periférica en individuos no lesionados, que es trasladada a estructuras rostrales para un análisis más detallado y una mayor elaboración de la respuesta. Es probable que el producto que finalmente se refleja en forma de conducta, implique también conexiones eferentes de vuelta hacia la región caudal (Grill & Norgren, 1978a; 1978b; Grill & Kaplan, 1990; Le Magnen, 1992; Cooper & Higgs, 1994).

El *Hipotálamo* es también un centro clave para la detección de las señales periféricas de adiposidad que controlan la homeostásis calórica. En zonas como el N. Arqueado se han detectado altas concentraciones de receptores para leptina e insulina, pero también en el N. Paraventricular, áreas Dorsomedial y Ventromedial e Hipotálamo Lateral (Figlewicz et al., 1996; Hirschberg, 1998; Inui, 1999; Jéquier & Tappy, 1999; Woods et al., 1998).

En el N. Arqueado se han encontrado grupos de células nerviosas cuya actividad tiene un efecto modulador sobre la ingesta y el metabolismo: Algunas de ellas contienen Neuropeptido Y (NPY), un potente estimulador de la ingesta y

reductor del gasto energético, que, en consecuencia, promueve la ganancia de peso. Y en co-localización a este, otra sustancia denominada ‘Péptido relacionado con el Agouti’ –conocido en inglés por las siglas AGRP- que funciona como antagonista de los receptores de Melanocortinas, estimulando también la ingesta. Proyectan hacia el N. Paraventricular hipotalámico, pero también a otras zonas como el área Perifornical ... (Hirschberg, 1998; Inui, 1999; Schwartz et al., 2000).

Un grupo diferente de neuronas del N. Arqueado contiene otros dos sistemas colocalizados, responsables de la síntesis y liberación de derivados de la POMC – como la hormona estimulante de los Melanocitos, α -MSH- así como de CART. Proyectan hacia el N. Paraventricular, Hipotálamo Lateral, Zona Incerta... y tienen un efecto inhibitor de la ingesta (Schwartz et al., 2000; Woods et al., 1998a; 1998b; 2000; Lawrence et al., 1999).

En ambos grupos de células del N. Arqueado (las que expresan RNAm para NPY/AGRP y las que lo hacen para POMC/CART) se han identificado receptores para la leptina, lo cual hace suponer que esta hormona podría actuar regulando de forma diferencial a ambos sistemas. Provoca toda una cascada de acontecimientos que tienen que ver con la actuación sobre aquellos péptidos cuya función es estimuladora [NPY, AGRP, MCH, Galanina...] y/o inhibitora [α -MSH, GLP-1, NT, CART...] de la ingesta (Lawrence et al., 1999; Schwartz et al., 2000; Woods et al., 1998a; 1998b; 2000; Inui, 1999; Elías et al., 2000; Elmquist et al., 1997), aunque también podría tener efectos sobre las estructuras con las que conectan estas células (a nivel post-sináptico) pues atenúa la hiperfagia por administración exógena de NPY en el hipotálamo (Inui, 1999). Adicionalmente, la leptina podría regular los niveles de otras sustancias –orexinas A y B-, que estimulan la ingesta cuando son liberadas en el HTL, Zona Incerta y A. Perifornical (Schwartz et al., 2000). A su vez los niveles de esta hormona pueden verse modificados en presencia de otras sustancias circulantes, a saber, insulina y glucocorticoides (Jéquier & Tappy, 1998; Inui, 1999; Schwartz et al., 2000).

Por su parte, el *Tronco Cerebral* es también una zona clave en la regulación energética, pues integra información aferente periférica –señales a corto plazo generadas en el curso de las comidas individuales- junto con información descendente relacionada con la homeostasis calórica (Schwartz et al., 2000). Se han identificado receptores para leptina en el NTS y en los subnúcleos lateral externo y superior del Complejo Parabraquial, en co-localización con CCK, en este último caso

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

-NPBls- (Elmqvist, 1997; 1998). Otros estudios han permitido identificar receptores de insulina, glucorreceptores, etc. al tiempo que demuestran que esta zona recibe información acerca de los niveles plasmáticos de productos metabólicos implicados en el control de la ingesta (Ritter et al., 1981, 1992,1994; Calingasan & Ritter, 1993; Wang et al., 1999).

III - SISTEMAS NEUROQUÍMICOS, FARMACOS, INGESTA Y REFUERZO

Para comprender el complejo Mecanismo de Control Central de la Ingesta y el Peso Corporal hay que tener en cuenta que la mayoría de las estructuras mencionadas en el apartado anterior forman parte de circuitos cerebrales a través de los cuales actúan determinados neurotransmisores, neuromoduladores y hormonas, cuyos efectos es importante conocer (Rowland et al., 1996; Hirschberg, 1998; Woods et al., 1998a; 1998b; Woods & Stricker, 1999; Inui, 1999; Vacarino, 1996). Muchas de estas sustancias inciden sobre procesos motivacionales que modulan los estados de desequilibrio homeostático o de ingesta no homeostática (Cooper & Higgs, 1994; 1996). Se habla de sistemas catabólicos o anabólicos según actúen reduciendo el consumo de alimento y promoviendo el gasto energético o bien aumentando la ingesta y el almacenamiento de nutrientes (Woods et al., 1998a; 1998b; Schwartz et al., 2000).

Entre las sustancias que actúan reduciendo la ingesta podemos destacar la colecistoquinina o la serotonina (Cooper & Higgs, 1994; 1996; Rowland et al., 1996; Cooper & Clifton, 1996; Woods et al., 1998a; 1998b), que trataremos mas adelante. Pero también tienen este efecto, la hormona liberadora de corticotropina (CRH) (Rowland et al., 1996; Mercer et al., 1996; Levine & Billington, 1997; Hirschberg, 1998; Woods et al., 1998a; 1998b; Inui, 1999; Pan et al., 1999; Schwartz et al., 2000; Smith, 2000), oxitocina (Rowland et al., 1996; Woods & Stricker, 1999; Pan et al., 1999; Inui, 1999), bombesina (Inui, 1999; Pan, et al., 1999; Smith, 2000), α -MSH (Woods et al., 1998a; 1998b; Inui, 1999; Schwartz et al., 2000; Smith, 2000), sacietina (Rowland et al., 1996), glucagón (Rowland et al., 1996; Inui, 1999; Pan et al., 1999; Smith, 2000), la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) (Inui, 1999; Schwartz et al., 2000), calcitonina (Inui, 1999), y varias citoquinas (Inui, 1999; Swartz et al., 2000), entre otras.

Colecistoquinina (CCK)

Es uno de los agentes inductores de saciedad mejor conocidos (Gibbs et al., 1993; Cooper & Higgs, 1994; 1996; Rowland et al., 1996; Pan et al., 1999), aunque algunos estudios muestran que puede ser aversiva en sí misma (Deutch & Hardy,

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

1977). Se trata de una sustancia presente en células secretoras y fibras nerviosas periféricas, pero también en el SNC. En el tracto gastrointestinal es liberada ante la llegada de alimento, donde actúa para reducir la ingesta y regular procesos digestivos (secreciones pancreáticas, contracciones vesicales...), pero además puede funcionar como neurotransmisor o neuromodulador, en coordinación con otras sustancias químicas (Gibbs et al., 1993; Cooper & Higgs, 1994; Rowland et al., 1996; Moran, 1996; Södersten et al., 1996).

Se han identificado dos subtipos de receptores para esta sustancia, denominados CCK_A y CCK_B, respectivamente, ambos presentes en el tracto gastrointestinal y aferencias nerviosas vagales, pero también en distintas áreas del SNC –médula, tronco y estructuras relacionadas con el refuerzo, como la Habénula, y el N. Accumbens-. El papel de los agonistas y antagonistas de los receptores CCK_A en la reducción de la ingesta es inequívoco, mientras que resulta menos claro cual es el papel de los receptores CCK_B (Moran, 1996; Södersten et al., 1996).

En un estudio realizado por Södersten y colaboradores se observó que la administración intraventricular de antagonistas de esta sustancia no logran prevenir el efecto reductor de la ingesta provocado por administración sistémica de CCK-8, lo que ha llevado a pensar que, desde la periferia, podría activar redes neurales que controlan la ingesta (Södersten et al., 1996). De hecho, la administración periférica de esta sustancia provocó un patrón de inmunorreactividad que incluye activación de estructuras relevantes en el procesamiento de información visceral como el A. Postrema, N. del Tracto Solitario, N. Parabraquial lateral externo (parte interna y ventral) e interno, N. Central de la Amígdala, N. Lecho de la estría terminal y N. Paraventricular hipotalámico, cuyos efectos son invertidos por vagotomía (Li & Rowland, 1995). Sin embargo, parte de sus acciones en relación con la conducta nutritiva, son resultado de interacciones centrales complejas con otros neurotransmisores, como serotonina (Li & Rowland, 1995; Simansky, 1996) o dopamina, -donde ambos neurotransmisores coexisten en algunos sistemas neurales, como la vía mesolímbica (Södersten et al., 1996)-.

Serotonina (5-HT)

Los sistemas de serotonina cerebral han venido relacionándose con el control de la conducta nutritiva, selección de macronutrientes y metabolismo, sobretodo en

estructuras hipotalámicas como el Área Ventromedial y N. Paraventricular (Cooper & Higgs, 1994; Rowland et al., 1996; Orosco & Nicolaïdis, 1996; Simansky, 1996; Hirschberg, 1998; Woods et al., 1998a; Inui, 1999; Schwartz et al., 1999; Pan et al., 1999). De hecho, las drogas que favorecen la síntesis y utilización de esta sustancia, como por ejemplo la fenfluramina y fluoxetina, actúan como agentes anorécticos reduciendo la ingesta (Cooper & Higgs, 1994; Rowland et al., 1996; Orosco & Nicolaïdis, 1996; Simansky, 1996).

Una revisión de la bibliografía especializada ha permitido comprobar que la Fenfluramina reduce la ingesta en diferentes condiciones experimentales de privación/ nutrición espontánea, con dietas líquidas, semilíquidas o sólidas y con distinto grado de palatabilidad. Y al parecer, tanto la inyección central como sistémica, pueden modificar el tamaño, duración y tasa de ingesta, pero no influyen en la frecuencia de las comidas. (Simansky, 1996; Samanin & Grignaschi, 1996; Orosco & Nicolaïdis, 1996; De Vry & Schreiber, 2000). Sin embargo, los graves efectos secundarios observados en seres humanos y en estudios experimentales han hecho inviable el uso terapéutico de este fármaco (McCann et al., 1997).

Una de las hipótesis más influyentes en este campo ha implicado a la 5-HT en procesos de saciedad, de manera que la reducción de la ingesta podría deberse a la anticipación de estas señales de saciedad, bien a nivel sistémico –estimulando la liberación de opiáceos periféricos que inhiben el vaciado gástrico y los movimientos peristálticos, o la secreción de hormonas del tracto gastrointestinal- o bien centrales –inhibiendo la liberación de opiáceos del hipotálamo, interactuando con otros neurotransmisores, etc- (Majeed et al., 1986; Robert et al., 1991; Cooper & Higgs, 1994; Li & Rowland, 1995; Rowland et al., 1996; Samanin & Grignaschi, 1996; Simansky 1996; Orosco & Nicolaïdis, 1996; Smith et al., 1998; De Vry & Schreiber, 2000). Afectaría al parecer y, sobre todo, a un tipo de macronutrientes, las grasas (Smith et al., 1998; Simansky, 1996), y sería provocado por la acción sobre receptores específicos, a saber, 5HT_{1B} y 5HT_{2C} (Frazer & Hemsler, 1994; Rowland et al., 1996; Samanin & Grignaschi, 1996; Simansky 1996; Orosco & Nicolaïdis, 1996; De Vry & Schreiber, 2000), aunque dada la variedad de receptores que recientemente se han identificado, no pueden descartarse otras posibilidades (De Vry & Schreiber, 2000). De hecho, algunas investigaciones muestran que la estimulación de receptores 5HT_{1A} en los núcleos del Rafe, provoca el efecto inverso, estimulación de la conducta nutritiva (Samanin & Grignaschi, 1996; De Vry & Schreiber, 2000).

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Parte de este efecto, como decimos, se podría explicar por interacción con otros neurotransmisores al actuar sobre los receptores antes citados: Por ejemplo, la Fenfluramina puede bloquear la hiperfagia generada por el Neuropeptido Y (NPY) en la zona paraventricular hipotalámica a través de su actuación sobre $5HT_{1B}$; y, en sentido contrario, se ha observado un aumento en la síntesis de NPY tras el agotamiento de las reservas de 5-HT (Cooper & Higgs, 1994; Samanin & Grignaschi, 1996; Pan et al., 1999). Otro caso de interacción implica a la CCK-8 que actúa excitando algunas células del Rafe y coopera con el proceso de saciación en tanto en cuanto provoca la liberación de 5-HT (Li & Rowland, 1995; Samanin & Grignaschi, 1996).

Algunas investigaciones han relacionado a la serotonina con el control del metabolismo energético. En efecto, la administración de un agonista indirecto (fenfluramina) contribuye a la lipólisis y utilización de las reservas de grasa endógena y al aumento del metabolismo basal (Orosco & Nicolaïdis, 1996; Smith et al., 1998). Según los autores citados, el proceso de lipólisis demora la aparición de señales de hambre, lo que constituye el mecanismo fisiológico responsable de la saciedad. Por tanto, la facilitación del gasto metabólico añadiría al efecto anoréxico otro 'leptogénico' cuya duración no sería indefinida (Orosco & Nicolaïdis, 1996; Smith et al., 1998).

Menos atención se ha prestado a la idea de que la 5-HT podría ejercer su efecto actuando sobre Sistemas de Valoración Hedónica o Mecanismos de 'Palatabilidad'. Sin embargo, diferentes experimentos han mostrado que los agonistas serotoninérgicos reducen la ingesta de soluciones apetitosas –sacarina, sacarosa- en animales no privados e incluso en pruebas de 'falsa ingesta' (Cooper & Higgs, 1994; Barnfield et al., 1994; Samanin & Grignaschi, 1996; De Vry & Schreiber, 2000). Mediante el Test de Reactividad Gustativa ideado por Norgren, se ha visto que la serotonina reduce las reacciones hedónicas positivas de los estímulos gustativos, haciéndolos menos apetitosos (Treit & Berridge, 1990; Barnfield et al., 1994). Algunos autores han sugerido la posibilidad de que la activación de algún subtipo particular de receptores 5-HT provocaría este efecto adicional sobre procesos apetitivos (De Vry & Schreiber, 2000). En conexión con esta idea, se ha demostrado que el fármaco RU-24969 (agonista no específico) provoca la liberación de Dopamina en el N. Accumbens, así como la existencia de conexiones 5-HT/dopamina que activan la vía mesolímbica (Van Bockstaele et al., 1994; Samanin & Grignaschi, 1996; De Vry & Schreiber, 2000).

El sistema serotoninérgico se ha implicado finalmente en la ingesta inducida por estrés, al comprobarse la conexión de un grupo de células serotoninérgicas del N. Paraventricular con neuronas que contienen CRF (Samanin & Grignaschi, 1996): En situaciones de estrés, la excitación de estas neuronas y la subsiguiente activación de los receptores 5HT_{2A} provocaría la liberación de CRF (Samanin & Grignaschi, 1996; Pan et al., 1999) el cual, a su vez, bloquea el efecto promotor de la ingesta provocado por el Neuropeptido Y -como veremos más adelante-.

Una cuestión adicional tiene que ver con la identificación de las estructuras anatómicas donde la 5-HT ejerce su potencial anoréctico. El hipotálamo ha sido considerado una región clave en este aspecto (Leibowitz, 1992; Frazer & Hemsler, 1994; Simansky, 1996) , pero dado que la hipofagia obtenida por la administración local de agonistas 5-HT ha provocado solo efectos moderados, algunas investigaciones han dirigido su atención hacia estructuras periféricas o bien hacia los primeros relevos centrales de procesamiento de la información visceral (Li & Rowland, 1993; Leibowitz, 1992; Frazer & Hemsler, 1994; Simansky, 1996; Lee et al., 1998; De Vry & Schreiber, 2000).

El enlentecimiento del vaciado gástrico provocado por la serotonina periférica podría ser responsable del efecto de saciedad que retrasa el inicio de un nuevo episodio de ingesta y alarga el intervalo entre las comidas, al hacer que el alimento permanezca durante mas tiempo en el estómago, ya que esta sustancia tiene dificultades para cruzar la barrera hematoencefálica. Por otra parte, se ha observado que la presencia de cantidades excesivas de alimento en el Sistema Gastrointestinal provoca sensaciones de malestar, las cuales son detectadas por fibras vagales. Pero, dado que la ablación de las ramas aferentes del nervio vago no invierten completamente el efecto, la atención se ha dirigido finalmente hacia estructuras troncoencefálicas (Simansky, 1996; Rowland et al., 1996).

Grill y Kaplan han sugerido que esta zona podría disponer de los mecanismos necesarios y suficientes para que la serotonina pueda ejercer un control inhibitorio sobre la ingesta, y para ello se han basado en experimentos en los que la inyección i.c.v. de agonistas-SHT en animales descerebrados genera el esperado efecto hipofágico (Grill et al., 1997; Kaplan et al, 1998). Mediante técnicas inmunorreactivas se han logrado identificar las estructuras concretas donde se produce tal efecto, a saber, el NTS, A. Postrema y N. Parabraquial lateral, y se ha

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

comprobado como las lesiones de estos núcleos bloquean la expresión histoquímica del efecto comportamental (Li & Rowland, 1993; 1995, Li et al., 1994).

Dado que estas estructuras troncoencefálicas activadas por señales serotoninérgicas también han sido implicadas también en Condicionamiento Aversivo Gustativo (Bures et al., 1998; Mediavilla et al., 2001b) y teniendo en cuenta que los fármacos agonistas pueden inducir este tipo de aprendizaje (De Vry & Schreiber, 2000), algunos autores sugieren que un mismo mecanismo podría estar a la base de ambos efectos, o sea, de hipofagia e inducción de aversiones condicionadas. De acuerdo con esta hipótesis alternativa, una estimulación leve sería responsable de la sensación de saciedad, mientras que las dosis elevadas podrían resultar en malestar o emesis (De Vry & Schreiber, 2000).

Los sistemas anabólicos que estimulan la ingesta y promueven el almacenamiento de nutrientes, utilizan sustancias químicas como el neuropéptido Y, GABA (y benzodiazepinas) y los péptidos opiáceos (Rowland et al., 1996; Woods et al., 1998a; Pan et al., 1999). Aunque menos estudiados, tienen este mismo efecto la galanina (Rowland et al., 1996; Rada et al., 1998; Koegler et al., 1999; Pan et al., 1999), el glutamato (Maldonado-Irizarry et al., 1995; Stanley, 1996; Stratford et al., 1998), los derivados de la Proopiomelanocortina (POMC), como la 'Melanin-Concentrating Hormone'(MCH) (Woods et al., 1998a; Inui, 1999; Schwartz et al., 1999), la GHRH (Rowland et al., 1996; Inui, 1999; Pan et al., 1999), los glucocorticoides (Mercer et al., 1996; Woods et al., 1998a), las hormonas sexuales (Hirschberg, 1998) o las recientemente descubiertas orexinas (Woods et al., 1998a; Inui, 1999; Schwartz, et al., 1999) y ghrelinas (Inui et al., 2001).

Neuropeptido Y (NPY)

Una de las sustancias que mas consistentemente se ha asociado con estimulación de la ingesta y regulación homeostática es el NPY. Relacionada con ésta y de estructura química similar es el neuropéptido YY (PYY), presente en menor concentración en el cerebro (Rowland et al., 1996; Mercer et al., 1996; Corp, 1996; Levine & Billington, 1997; Hirschberg, 1998; Woods et al., 1998a, 1998b; Schwartz et al., 1999; Pan et al., 1999; Woods & Stricker, 1999).

Ambos péptidos actúan con distinto grado de afinidad, y producen diversas acciones centrales y periféricas, sobre al menos tres tipos de receptores, denominados Y1, Y2 e Y3 aunque continúan identificándose nuevos subtipos (Corp, 1996; Levine & Billington, 1997). Se han descubierto en los sistemas simpático y parasimpático así como en la musculatura lisa de la pared vascular (Corp, 1996). A nivel central, los receptores Y1 e Y2 se localizan en zonas del Tálamo, Giro Dentado (HC), Corteza, arterias cerebrales y en regiones hipotalámicas –principalmente en los N. Arqueado, Paraventricular, Dorsomedial y región Perifornical-, así como en el Cerebro Posterior –S. Gris Central, NPB lateral, NTS...-. Los receptores Y3 se han hallado en el NTS, con funciones de regulación cardiovascular (Corp, 1996; Rowland et al., 1996; Levine & Billington, 1996; Woods & Stricker, 1999).

Dada la amplia gama de funciones que estas sustancias pueden desempeñar (Corp, 1996; Pan et al., 1999), nos centraremos exclusivamente en aquellos circuitos que tienen que ver con la ingesta y el metabolismo energético: Uno de los sistemas críticos en la regulación nutritiva y homeostática lo constituyen las células del N. Arqueado, cuyos axones proyectan al NPV hipotalámico –y en menor medida a otras zonas como las áreas dorsomedial y perifornical-, que contienen NPY (Mercer et al., 1996; Corp, 1996; Levine & Billington, 1997; Hirschberg, 1998; Woods et al., 1998a, 1998b; Schwartz et al., 1999; Inui, 1999; Woods & Stricker, 1999). Se ha observado aquí que la privación crónica de alimento así como los procedimientos de ingesta restringida producen un aumento en la síntesis y utilización de este péptido (Mercer et al., 1996; Corp, 1996; Levine & Billington, 1997; Hirschberg, 1998; Woods et al., 1998b), pero también se da este incremento en otras condiciones metabólicas tales como diabetes, lactancia o tras ejercicio físico intenso (Corp, 1996; Mercer et al., 1996; Woods et al., 1998b).

La participación del NPY en el control homeostático queda probada por su capacidad para reducir el gasto energético y aumentar la actividad enzimática relacionada con el almacenamiento de grasa (Levine & Billington, 1997; Woods et al., 1998b). Además, la biosíntesis de este transmisor en la Vía N. Arqueado → NPV puede ser inhibida por las hormonas insulina y leptina, como ya se puso de manifiesto anteriormente (Woods et al., 1998a, 1998b; Elmquist et al., 1998; Hirschberg, 1998; Inui, 1999; Jéquier & Tappy, 1999).

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Por otra parte, la inyección de NPY en las zonas hipotalámicas periventricular y perifornical tiene un potente y duradero efecto orexígeno incluso en animales saciados, que algunos autores consideran específico a los carbohidratos (Corp, 1996; Levine & Billington, 1997; Hirschberg, 1998; Woods et al, 1998b; Woods & Stricker, 1999), mientras que la administración en otras zonas no tiene efecto. Una excepción se ha observado a nivel del 4° ventrículo, donde la infusión provocó una reacción ingestiva similar a la citada, debido supuestamente a la activación de zonas que conectan con el hipotálamo medial, como el Locus Coeruleus, NPB lateral externo o S. Gris Central (Corp, 1996; Xu et al., 1995; Rowland et al., 1996; Levine & Billington, 1997; Woods & Stricker, 1999).

Aunque la mayor parte de la evidencia obtenida por distintos investigadores va en apoyo de la participación del NPY en la ingesta inducida por necesidades metabólicas, hay algunos datos que sugieren la implicación de esta sustancia en motivación de incentivo. Así, las inyecciones i.c.v. de NPY estimularon la elección e ingesta de soluciones de sacarina y sacarosa en ratas saciadas, respecto a soluciones salinas (Levine & Billington, 1997). Sin embargo hay autores que encuentran efectos aversivos que podrían limitar la ingesta con dosis parecidas (Levine & Billington, 1997; Woods et al., 1998b), lo cual sugiere de nuevo la posibilidad de efectos diferentes por actuación sobre receptores y substratos diferentes.

Las investigaciones conductuales han mostrado también, que el NPY aumenta la motivación para comer afectando a la conducta exploratoria (que probablemente sea la responsable de la búsqueda de alimento) pero no a las reacciones consumatorias, pues los experimentos llevados a cabo mediante la técnica de infusión intraoral de productos no lograron observar diferencias tras la infusión de NPY en comparación con los individuos no tratados (Levine & Billington, 1997; Woods et al., 1998b).

Finalmente, se han documentado interacciones de esta sustancia respecto a otras como por ejemplo, CRF o corticosterona (Mercer et al., 1996; Levine & Billington, 1997). La administración de CRF atenúa el efecto orexígeno del NPY y viceversa, los antagonistas CRF potencian la estimulación de la ingesta dependiente del NPY (Levine & Billington, 1997). En este sentido, Leibowitz sugiere una posible conexión entre NPY, CRF e ingesta inducida por estrés tras el incremento en los niveles de corticoides provocado por este péptido (Leibowitz, 1992; Levine & Billington, 1997).

Benzodiazepinas y GABA

Las benzodiazepinas (BZP) son un grupo de fármacos que han sido ampliamente utilizados como ansiolíticos, anticonvulsivantes e hipnóticos, pero que también han demostrado ejercer un papel estimulador sobre la ingesta menos conocido, por otra parte (Cooper & Higgs, 1994; 1996; Berridge & Pecina, 1995; Berridge & Robinson, 1998). Actúan sobre un sistema de receptores específicos que se hallan incorporados a la macromolécula receptora GABA_A, donde incrementan la conductancia de los canales de cloro, los cuales se abren en respuesta a la activación de dicho receptor. El resultado es una facilitación de la transmisión inhibitoria del sistema gabaérgico en el cerebro (Cooper & Higgs, 1994; 1996; Berridge & Pecina, 1995; Stahl, 2000).

Los estudios iniciales llevados a cabo por Cooper y colaboradores así como por otros autores, en relación con las benzodiazepinas y la ingesta, mostraron que estas sustancias incrementaban el consumo de alimento en distintas especies de animales privados –los cuales comían cantidades mayores a las habituales de alimentos familiares, frente a novedosos- y no privados –que mostraron un incremento en la ingesta de una solución semilíquida azucarada-. Estos hallazgos podían ser interpretados como una consecuencia de la inhibición de señales de saciedad –por ejemplo, las benzodiazepinas podrían actuar contrarrestando las señales de saciedad provocadas por la CCK periférica- (Cooper & Higgs, 1994; 1996). Por lo tanto, los animales no necesariamente debían estar privados para que se manifestase el efecto hiperfágico. Incluso se obtuvo un aumento del consumo de una solución de sacarosa –normalmente apetitosa para los animales- en paradigmas de ‘falsa ingesta’ y, en consecuencia, un alargamiento en la duración de la conducta ingestiva (Cooper & Higgs, 1994; 1996).

Mediante el Test de Reactividad Gustativa, desarrollado por Grill y Norgren, se ha puesto de manifiesto que las benzodiazepinas facilitan las reacciones ingestivas positivas sin afectar a las negativas (Treit & Berridge, 1990; Berridge & Pecina, 1995). Y en pruebas de elección, estas sustancias químicas favorecen la ingesta de soluciones preferidas -sacarosa o sacarina frente a agua- pero también de soluciones salinas isotónicas, y mejoran la tolerancia a dietas adulteradas con quinina (Cooper & Higgs, 1994; 1996). Este efecto ha sido explicado en el sentido de que las

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

benzodiazepinas podrían actuar sobre las cualidades orosensoriales de los estímulos gustativos facilitando la ‘palatabilidad’, es decir, modulando la valoración hedónica que el individuo hace de ellas (Cooper & Higgs, 1994; 1996). Asimismo, favorecen la ejecución instrumental -presionar una palanca para obtener comida- en ratas previamente entrenadas y sometidas a una dieta restringida, lo cual sugiere, por otro lado, que este grupo de fármacos podría actuar también como incentivo, aumentando el valor motivacional de la comida (Cooper & Higgs, 1994; 1996).

Los efectos hiperfágicos son debidos, al parecer, a la actuación de estas sustancias benzodiazepínicas sobre receptores centrales GABA_A, los cuales pueden ser invertidos mediante la inyección de antagonistas como el ‘flumazenil’ (Cooper & Higgs, 1994; 1996; Berridge & Pecina, 1995; Higgs & Cooper, 1997; Stratford & Kelley, 1997; Basso & Kelley, 1999; Söderpalm & Berridge, 2000). Por el contrario, la administración de agonistas inversos –es decir, fármacos con afinidad por los receptores benzodiazepínicos pero con efectos opuestos, tales como generación de estrés y ansiedad- provoca una reducción en la ingesta (Cooper & Higgs, 1994; 1996; Stahl, 2000). Finalmente, el descubrimiento de ‘agonistas parciales’ ha permitido hacer una disociación entre los diferentes efectos de estas sustancias. Por ejemplo, los fármacos de la familia de las pirazoloquinolinas reducen la ansiedad sin afectar a la ingesta, mientras que otros, como el ‘Ro-16-628’, incrementan la conducta ingestiva sin provocar sedación (Cooper & Higgs, 1994; 1996; Berridge & Pecina, 1995; Stahl, 2000).

Se tiene poco conocimiento acerca de los sistemas neurales sobre los que tienen lugar los efectos hiperfágicos, pero algunos estudios se han centrado en estructuras del Tronco Cerebral donde se encuentran los relevos iniciales en el procesamiento de la información gustativa (Cooper & Higgs, 1994; 1996; Berridge & Pecina, 1995; Yamamoto et al., 1998) dado que el sabor parece ser una variable importante en este tipo de ingesta. Mediante el Test de Reactividad Gustativa, Berridge encontró un aumento de las reacciones ingestivas en animales descerebrados a los que administró clordiazepóxido, así como tras la inyección del fármaco en el 4º ventrículo (Berridge & Pecina, 1995).

El núcleo Parabraquial era un candidato ideal (Berridge & Pecina, 1995; Cooper & Higgs, 1996), ya que contiene células capaces de procesar las propiedades sensoriales y hedónicas de los estímulos gustativos (Yamamoto et al., 1994; 1998), contiene receptores GABA-BZP (Higgs et al., 1993) y está ampliamente conectado

con las regiones hipotalámicas implicadas en el control de la ingesta (Fulwiler & Saper, 1984; Nagai et al., 1987; Takaki et al., 1990; Krukoff et al., 1993; 1994; Moufid-Bellancourt & Velley, 1994). Su participación en la ingesta inducida por inyecciones locales de benzodiazepinas ha quedado recientemente demostrada (Söderpalm & Berridge, 2000).

Algunos de los efectos de estas sustancias en la conducta nutritiva muestran aspectos comunes con respecto a los opiáceos (Cooper & Higgs, 1996; Berridge & Peciña, 1995; Basso & Kelley, 2000). Por ejemplo, ambos grupos de fármacos estimulan la ingesta afectando a la *'palatabilidad'* (Berridge & Treit, 1990), lo que ha hecho pensar en la existencia de interacciones opiáceos/BZP en relación con este comportamiento. De hecho, se ha podido demostrar que la administración de un antagonista opiáceo –naloxona- es capaz de bloquear la hiperfagia inducida por midazolam (Cooper & Higgs, 1996; Higgs & Cooper, 1997).

Finalmente, es importante destacar, al igual que hemos hecho anteriormente en relación con otros neurotransmisores o neuromoduladores, que una misma sustancia puede afectar a distintos mecanismos de ingesta, actuando sobre circuitos cerebrales diferentes (Levine & Billington, 1997). Los datos hasta ahora recogidos y expuestos apoyaban la participación de las benzodiazepinas en modulación hedónica de las propiedades de la comida al actuar sobre estructuras troncoencefálicas (Cooper & Higgs, 1994; 1996; Berridge & Peciña, 1995; Berridge & Robinson, 1998). Pero nuevas líneas de investigación, llevando a cabo manipulaciones experimentales en el sistema Gabaérgico a niveles anteriores del Prosencéfalo, han logrado demostrar que la activación de receptores GABA en el N. Accumbens puede tener otros efectos profundos y específicos sobre la conducta ingestiva (Stratford & Kelley, 1997; Stratford et al., 1999; Basso & Kelley, 1999).

En concreto, la administración de muscimol -agonista GABA_A en el N. Accumbens-*'shell'* estimuló el consumo de carbohidratos y grasas pero tuvo escaso efecto sobre soluciones con alta palatabilidad como sacarina o salina isotónica (Basso & Kelley, 1999). Los agonistas GABA_B también produjeron un efecto hiperfágico específico que era bloqueado por la administración simultánea de antagonistas (Stratford & Kelley, 1997). Se plantea entonces, en base a estos datos, un nuevo mecanismo que potenciaría la ingesta en condiciones de déficit metabólico y operaría en estructuras del Prosencéfalo basal. Según estos autores, la activación directa de los receptores GABA_A de efecto inhibitorio, o la inhibición de células que

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

liberan glutamato, provocaría un cese temporal de la actividad de un grupo de células normalmente activas de la parte medial del N. Accumbens-Shell que conectan con el hipotálamo lateral, cuyo papel estimulador de la ingesta es ampliamente conocida (Maldonado-Irizarry et al., 1995; Stratford & Kelley, 1997; Stratford et al., 1998;1999; Basso & Kelley, 1999).

Opiáceos

El descubrimiento en la década de los 70 de la existencia de receptores cerebrales a los que se unen los *derivados del opio* (Pert & Snyder, 1973; Simon et al., 1973; Terenius et al., 1973), condujo irremediablemente a la identificación de sustancias endógenas que, de manera natural, actúan sobre estos receptores produciendo un efecto análogo (Hughes et al., 1975 -citado por Goldberg, 1989-). Y en estas tres últimas décadas, han sido halladas y reconocidas, básicamente, tres familias de péptidos endógenos con actividad opiácea, -endorfinas, encefalinas y dinorfina- así como los receptores específicos a los que se unen: μ con afinidad para encefalinas y endorfinas, δ para endorfinas, κ para la dinorfina y ϵ para la β -endorfina (Goldberg, 1989; Knapp et al., 1995; Nock, 1995).

Dichas sustancias opiáceas son importantes en tanto en cuanto su consumo conlleva riesgo de abuso -como veremos mas adelante-, pero también en la medida en que pueden participar en el control de la ingesta así como dar lugar a la aparición de trastornos del apetito y/o control del peso corporal -obesidad, anorexia, bulimia,...- (Sanger & McCarthy, 1981; Le Magnen, 1990; 1992; Meyer, 1995; Mercer & Holder, 1997).

Los receptores opiáceos μ , κ y δ han sido localizados en el SNC y en tejidos periféricos, a nivel presináptico y postsináptico, pero con escasa correlación respecto a las fibras y terminales que contienen opiáceos (Goldberg, 1989; Knapp et al., 1995; Nock, 1995).

Los receptores μ están ampliamente distribuidos por todo el cerebro, encontrándose altas concentraciones en la Neocorteza, Caudado-Putamen, N. Accumbens, Tálamo, S. Límbico, Hipotálamo, N. Tracto Solitario, N. Espinal del Trigémino y Asta Dorsal Medular, en correspondencia con su posible papel en regulación del dolor e integración sensomotora, y moderadas en la Sustancia Gris

Central, núcleos del Rafe y región Parabraquial -entre otras-. En cambio, los receptores δ tienen una distribución más restringida, hallándose en el S. olfatorio, Bulbos olfatorios, Neocorteza, Caudado-Putamen, N. Accumbens y Amígdala. Finalmente, los receptores κ se han localizado principalmente en el N. Accumbens, Caudado-Putamen, Amígdala, Hipotálamo, Eminencia Media, N. Parabraquial y NTS, habiendo sido relacionados con equilibrio hídrico, nutrición, percepción del dolor y control neuroendocrino. A nivel mesencefálico y pontino, los receptores μ y κ muestran distribuciones bastante paralelas, encontrándose en la Sustancia Gelatinosa de la Médula, N. Espinal del Trigémino, NTS, N. del Rafe, Locus Coeruleus, Colículos, N. Parabraquial y S. Gris Periacueductal (Mansour et al., 1988; Mansour et al., 1994; Simon & Hiller, 1994).

Por otra parte, las mayores concentraciones de β -endorfina se hallan en el HT basal -N. Arqueado- proyectando hacia otras áreas hipotalámicas y en el NTS proyectando a la Formación Reticular y SGPA. Las encefalinas se distribuyen ampliamente por todo el cerebro, con altas concentraciones en el Globo Pálido y Telencéfalo, Cerebro Posterior y Médula. La dinorfina está presente sobretodo en la hipófisis posterior e hipotálamo, Amígdala, Septum, Estriado, Mesencéfalo y Médula (Simon & Hiller, 1994).

Uno de los primeros autores en proponer la implicación de los opiáceos en la *conducta ingestiva* fue Le Magnen, al observar que la administración de un antagonista opiáceo reducía la preferencia por soluciones de sacarina y sacarosa (Le Magnen et al., 1980; Le Magnen, 1992), lo cual iba en apoyo de la hipótesis de que estas sustancias químicas podrían actuar modificando la ‘palatabilidad’, o lo que es lo mismo, afectando a la valoración hedónica de las cualidades sensoriales de la comida. Al mismo tiempo se encontró una estrecha coincidencia entre los receptores κ y las zonas gustativas (Lynch, 1986).

Estos resultados han sido corroborados ampliamente después por otros investigadores, mediante distintos procedimientos experimentales –test de elección, falsa ingesta, test de reactividad gustativa, ...- (Cooper & Higgs, 1994; Mercer & Holder, 1997), con diferentes estímulos gustativos –sacarosa, sacarina o soluciones salinas isotónicas- (Gosnell & Majchrzak, 1989; Doyle et al., 1993; Higgs & Cooper, 1998; Arbisi et al., 1998; etc.) y utilizando fármacos que actúan sobre el sistema opiáceo endógeno como agonistas o antagonistas (Sanger & McCarthy, 1980; 1981; Le Magnen, 1992; Cooper & Higgs, 1994; Bodnar, 1996; Gosnell & Levine, 1996;

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Carr, 1996; Nencini, 1996; Vacarino, 1996; Mercer & Holder, 1997; Levine & Billington, 1997).

Es un hecho bien sabido que se puede estimular la ingesta mediante la presentación de comida apetitosa, incluso en individuos saciados. Las cualidades orosensoriales de la comida (sabor, olor, aspecto, textura...) pueden resultar reforzantes en sí mismas, además serlo en tanto en cuanto podrían haber sido asociadas previamente con la eliminación de estados de desequilibrio metabólico – preferencias gustativas condicionadas-. Por tanto, podrían actuar como incentivos, elicitando conductas de aproximación/evitación (Le Magnen, 1990; Nencini, 1996).

En este sentido, se ha observado que el consumo de productos apetitosos tales como azúcar, sacarina, dulces y pasteles, chocolate, golosinas, etc. modifica la actividad del sistema opiáceo endógeno, provocando por ejemplo, la liberación de β -endorfina en el Hipotálamo (Dum et al., 1983) al mismo tiempo que afecta a las consecuencias conductuales que tienen estas sustancias opioides, por ejemplo, generando analgesia y/o alterando la sensibilidad hacia otros fármacos afines (Kanarek et al., 1997; 2000; D'Anci et al., 1997; Mercer & Holder, 1997), como se ha podido demostrar en distintas especies animales (Apfelbaum & Mandenoff, 1981; Oomura et al., 1986; Le Magnen, 1992; Hope et al. 1997) y en seres humanos (Drewnoski et al., 1992; Melchior et al., 1990; 1994), mediante diferentes paradigmas experimentales (Mercer & Holder, 1997).

Por otro lado, la privación de alimento así como algunos cambios y/o manipulaciones experimentales relacionados con estas condiciones de ingesta (ayuno, restricción y administración programada de alimento, privación selectiva de algún macronutriente,...) también pueden alterar los niveles de opiáceos endógenos afectando a la actividad de los receptores, principalmente del tipo μ y en menor medida, κ (Carr & Papadouka, 1994; Koch & Bodnar, 1994; Bodnar et al., 1995; Leventhal & Bodnar, 1996; Stewart et al., 1996; Ragnauth et al., 1997).

De hecho, se ha podido comprobar mediante técnicas autorradiográficas, que la privación de alimento favorece la liberación de determinados fragmentos peptídicos con afinidad por receptores μ en zonas como el N. Dorsomedial hipotalámico, Tálamo, Habénula lateral y medial, Amígdala basolateral, Parabraquial lateral externo y medial externo, y se reduce la liberación de opiáceos con afinidad por los receptores κ en localizaciones como la Comisura Anterior, BNST, Pálido

ventral, Área preóptica medial, NPBl y NPBme (Berman et al., 1994; Wolinsky et al., 1994; 1996), aunque las interacciones en distintas localizaciones cerebrales son complejas (Mercer & Holder, 1997; Carr et al., 1998). Además, ésta actividad opiácea modula la actividad de los receptores D1 y D2 de la vía mesocorticolímbica, facilitando el refuerzo (Shaeffer et al., 1994; Hobbs et al., 1994; Carr & Papadouka, 1994; Carr & Kutchukhidze, 2000).

Algunas investigaciones señalan la existencia de una actividad opiácea anormal en individuos genéticamente obesos que puede ser invertida parcialmente mediante la administración de antagonistas (Levine & Billington, 1997; Lynn et al., 1999) aunque las posibilidades de utilización terapéutica son limitadas, ya que los antagonistas –naloxona- podrían ser aversivos por sí mismos (Shippenberg et al., 1992).

Y finalmente, tenemos que hablar de participación de los opiáceos en *hiperfagia inducida por estrés*, pues la liberación de CRF en respuesta a situaciones estresantes incrementa la ingesta y los niveles de β -endorfina en ratas, efecto que es parcialmente bloqueado por la administración de antagonistas de los receptores μ (Bodnar, 1996; Levine & Billington, 1997).

Por otro lado, las *investigaciones farmacológicas* consistentes en la administración de fármacos agonistas/antagonistas de los receptores opiáceos, han mostrado que éstos pueden actuar modulando la conducta nutritiva (Mercer & Holder, 1997):

En concreto, se ha observado que los **agonistas** tienen un efecto estimulador de la ingesta de comida y soluciones apetitosas -no demasiado potente-, en diferentes paradigmas experimentales (Cooper & Higgs., 1994; Mercer & Holder, 1997), que puede experimentar sensibilización y ser condicionado (Bakshi & Kelley, 1994; Vacarino, 1996), y mediado principalmente por su actuación sobre receptores μ , δ y κ (Sanger & McCarthy, 1980; 1981; Gosnell & Levine, 1996). En el caso de algunos de estos fármacos, el efecto es bifásico, de supresión inicial y estimulación posterior, debido posiblemente a su carácter sedativo (Kunihara et al., 1983; Doyle et al., 1993; Zhang & Kelley, 1997; Peciña & Berridge, 2000).

Los **antagonistas** opiáceos ejercen un bloqueo sobre los receptores μ , κ y δ impidiendo la actuación de los péptidos opiáceos endógenos, a la vez que suprimen

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

la ingesta en distintas especies y bajo distintas condiciones (Bodnar, 1996; Mercer & Holder, 1997):

Así, los antagonistas generales μ reducen la conducta nutritiva en una amplia variedad de situaciones (ingesta espontánea a corto y largo plazo, ingesta por privación general o glucoprivación, consumo de grasas y azúcares o ingesta inducida por estrés), pero este no es el caso en el bloqueo de la ingesta de sacarina, mientras que los antagonistas μ_1 afectan a la ingesta a largo plazo, por privación y por estrés. Se ha sugerido una distinción entre los subtipos μ_1 y μ_2 , los primeros más relacionados con ingesta en condiciones de déficit metabólico y los segundos implicados en ciertos aspectos que tienen que ver con la 'palatabilidad' (Gosnell et al., 1986; Koch & Bodnar, 1994; Carr & Papadouka, 1994; Bodnar et al., 1995; Bodnar, 1996; Gosnell & Levine 1996; Kelley et al., 1996; Leventhal & Bodnar, 1996; Kanarek et al., 1997; Levine & Billington, 1997; Higgs & Cooper, 1998; Arbisi et al., 1999; Yu et al., 1999).

Los antagonistas κ_1 reducen la ingesta espontánea y por glucoprivación, así como el consumo de sacarosa y grasas, pero solo afecta marginalmente a la hiperfagia generada en condiciones de privación general, y no tiene efecto en el consumo de sacarina o azúcares complejos. Se ha propuesto que podrían mediar la ingesta de algunas clases de sustancias preferidas afectando a la 'palatabilidad' (Gosnell et al., 1986; Bodnar, 1996; Kelley et al., 1996; Kanarek et al., 1997; Higgs & Cooper, 1998; Arbisi et al., 1998). Mientras tanto, los antagonistas κ_2 reducen la ingesta espontánea a corto plazo pero no parecen afectar a la regulación energética (Bodnar, 1996).

Finalmente, los antagonistas δ parecen tener un papel marginal en nutrición. Se ha visto que los antagonistas δ_2 reducen la ingesta de edulcorantes artificiales como la sacarina (Lynch, 1986; Gosnell & Majchrzak, 1989; Bodnar, 1996; Kanarek et al., 1997), mientras que los antagonistas δ_1 afectan a la ingesta espontánea a largo plazo y a la regulación homeostática, sin influir en ninguna otra situación ingestiva (Gosnell et al., 1986; Gosnell & Levine, 1996).

Determinados estudios han mostrado que los agonistas opiáceos podrían potenciar la ingesta de un tipo específico de macronutrientes, las grasas (Marks-Kaufman & Kanarek, 1990; Ookuma et al., 1997), mientras que otro amplio grupo de investigaciones hace pensar que los opiáceos podrían actuar favoreciendo la ingesta

de una amplia gama de nutrientes y sabores en función de las preferencias previas de cada individuo (Gosnell et al, 1990; Evans & Vacarino, 1990; Drewnowski et al., 1992; Doyle et al., 1993; Koch & Bodnar, 1994; Zhang & Kelley, 1997; Sills & Vaccarino, 1998; Giraudo et al, 1999).

Por otro lado, si tenemos en cuenta el grado de *privación* de los sujetos experimentales, se ha encontrado que los antagonistas –naloxona- aunque redujeron la ingesta de comida normal en animales saciados, apenas tuvieron efecto en privados. Si se les ofrecía simultáneamente a estos animales privados ‘*pellets*’ y comida azucarada, la naloxona reducía mas eficazmente la ingesta de productos dulces (Levine & Billington, 1997). Por tanto, en condiciones de privación, la naloxona afectó solo al consumo de productos apetitosos, mientras que la inyección de agonistas tuvo un efecto facilitador amplio. En cambio, en los animales saciados, los antagonistas bloquean la ingesta en general y los agonistas tendrían un efecto más selectivo hacia un determinado grupo de macronutrientes, las grasas, que son casi universalmente aceptados como apetitosos (Levine & Billington, 1997; Zhang, et al., 1998).

Investigaciones paralelas, haciendo uso de la Estimulación Eléctrica Intracerebral para estudiar la relación entre ingesta, actividad opiácea y refuerzo, han demostrado que si se ofrece comida apetitosa a los animales experimentales disminuye el umbral de AEIC, aunque los antagonistas bloquean el efecto sobre la comida pero no sobre la conducta autoestimuladora (Oomura et al., 1986; Touzani et al., 1994; Park & Carr, 1998; Carr, 1996). Similarmente un extenso grupo de trabajos realizados en varios laboratorios, muestran cambios en actividad opiácea cerebral, comparando los efectos de la privación/alimentación ad libitum y sus interacciones con la conducta autoestimuladora (Wolinsky et al., 1994; 1996; Berman et al., 1994; Carr & Papadouka, 1994; Abrahamsen, et al., 1995; Bodnar et al., 1995; Leventhal & Bodnar, 1996; Carr et al., 1998; 1999; Carr & Kutchukhidze, 1999; 2002; Ragnauth et al., 1997; Carr, 1996). Así, por ejemplo, se ha observado un descenso en el umbral de AEIC en animales sometidos a privación crónica, que solo vuelve a la normalidad tras instaurar un patrón de ingesta ad libitum y tras la recuperación del peso corporal normal (Abrahamsen, et al., 1995; Carr, 1996).

En este sentido, Carr y colaboradores han propuesto en base a todos estos datos, un modelo de convergencia en donde las señales de refuerzo nutritivo y las inducidas por procedimientos eléctricos podrían confluir en un integrador final

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

común, aunque ambas utilicen sistemas separados (Carr, 1996; Nencini, 1996). Los opiáceos cerebrales con afinidad por receptores μ y κ de las regiones relacionadas con la ingesta y el procesamiento gustativo, pero también de señales de adiposidad, activarían un mecanismo modulador –no responsable del refuerzo en sí, sino de la modulación- sobre el que actuarían estímulos externos (características orosensoriales de los estímulos gustativos) e internos (grado de déficit) para facilitar la motivación de incentivo de la comida y las respuestas instrumentales y consumatorias, sensibilizando al organismo hacia las respuestas apropiadas (Cabanac 1971; Carr, 1996; Nencini, 1996).

Por tanto, aunque algunos de los datos de los experimentos farmacológicos citados mas arriba, se han obtenido mediante administración periférica de opiáceos (Sanger & McCarthy, 1980; 1981; Gosnell & Majchrzak, 1989; Doyle et al., 1993; Gosnell & Levine, 1996), la infusión intraventricular de agonistas ha revelado que el consumo de nutrientes y soluciones apetitosas como consecuencia de la administración de estas drogas es mas bien un efecto central (Gosnell & Majchrzak, 1989; Gosnell & Levine, 1996).

Dada la importancia del hipotálamo en la regulación nutritiva y homeostasis calórica, se han realizado numerosos estudios con el objetivo de dilucidar la participación de los opiáceos de esta zona en dichas conductas. La administración de agonistas opiáceos en los núcleos Paraventricular y Ventromedial hipotalámicos estimuló la ingesta, aunque los datos no permiten describir con certeza a los receptores involucrados específicamente (Gosnell, Morley & Levine, 1986; Gosnell & Levine, 1996). Mientras tanto, las lesiones del hipotálamo lateral parecen desinhibir un efecto estimulador de la ingesta provocado por activación de los receptores opiáceos del NPB (Moufid-Bellancourt & Velley, 1994; Moufid-Bellancourt et al., 1996).

La Amígdala recibe y proyecta eferencias gustativas y viscerales al Tronco Cerebral –NTS, NPB- y a los núcleos hipotalámicos relevantes en la ingesta, lo cual le proporciona una situación privilegiada para actuar modulando el consumo de nutrientes inducido por opiáceos, donde se ha implicado a los receptores μ (Gosnell & Levine, 1996; Giraudo et al., 1998a; 1998b).

Tanto el Área Tegmental Ventral como el N. Accumbens, que forman parte del Sistema de refuerzo, conectan también con los centros clave en la conducta

nutritiva, ya mencionados, con lo cual resultan ser áreas potenciales en donde los opiáceos podrían actuar modulando el valor hedónico de los estímulos ingestivos (Gosnell & Levine, 1996). En ambas localizaciones, los agonistas μ y δ incrementaron la ingesta de soluciones dulces y comida apetitosa (Evans y Vacarino, 1990; Gosnell & Levine, 1996; Zhang & Kelley, 1997; Peciña & Berridge, 2000). En contraste, los agonistas κ no tuvieron efectos estimuladores sobre la ingesta en tales estructuras cerebrales, pero no se descarta que puedan tenerlo en otras localizaciones (Gosnell & Levine, 1996; Zhang & Kelley, 1997).

Finalmente, encontramos que la región parabraquial contiene receptores opiáceos μ y κ , distribuidos en paralelo, y cuya participación en la ingesta ha sido reiteradamente puesta de manifiesto en diferentes investigaciones. Por ejemplo, algunos estudios han encontrado que la privación de alimento conduce a una hiper e hiposecreción, respectivamente, de fragmentos peptídicos con afinidad para receptores μ y κ , en los subnúcleos lateral y medial externo (Mansour et al. 1988; 1994; Wolinsky et al, 1994), además de demostrar que ambos tipos de receptores tienen un papel antagónico en el control de las preferencias gustativas en condiciones de no-privación (Carr et al., 1991; Moufid-Bellancourt & Velley, 1994; Moufid-Bellancourt et. al., 1996).

En resumen, se puede concluir que esta función promotora de la ingesta por parte de los opiáceos se puede deber en parte, a su capacidad para activar, mediante actuaciones indirectas, el circuito motivacional de refuerzo -del que es parte la vía dopaminérgica mesolímbica- (Taber et al., 1998; Tanda & DiChiara, 1998), a través de la unión a receptores opiáceos del Área Tegmental Ventral y N. Accumbens (Gosnell, Morley & Levine, 1986; Evans & Vacarino, 1990; Gosnell y Majchrzak, 1989; Gosnell y Levine, 1996; Vacarino, 1996; Nencini, 1996; Moufid-Bellancourt et al., 1996; Zhang & Kelley, 1997), pero cuyos primeros relevos y mecanismos básicos es preciso dilucidar mediante nuevas investigaciones.

Noradrenalina

El papel de las catecolaminas en la ingesta de alimentos es mas controvertido (Leibowitz, 1982; 1992; Rowland et al., 1996; Cooper & Clifton, 1996). Tal es el caso de la norepinefrina (NE), que se ha relacionado tanto con efectos orexígenos -estimuladores de la ingesta- como anorécticos -reductores-, especialmente en

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

estructuras hipotalámicas como el Núcleo. Paraventricular (Leibowitz, 1982; 1992; Rowland et al., 1996; Currie, 1996).

El efecto estimulador de la ingesta afecta a la duración de las comidas y a la cantidad de nutrientes ingeridos, y resulta de la activación de receptores postsinápticos α_2 , pues la administración de agonistas específicos (por ej. clonidina) estimula la ingesta en ratas saciadas y potencia el efecto en animales privados, tanto por inyección sistémica, como i.c.v. o directa en Núcleo Paraventricular (Currie, 1996). Por el contrario, el efecto inhibitor parece estar mediado por la activación de los receptores α_1 (Currie, 1996; Rowland et al., 1996).

Se ha propuesto que el efecto hiperfágico específico de la NE consiste en la inhibición de un mecanismo de saciedad, a través de la activación de fibras del Haz Noradrenérgico Dorsal al cruzar por regiones laterales hipotalámicas, el cual es especialmente efectivo al comienzo del periodo de ingesta activa -fase de oscuridad en roedores- (Leibowitz et al., 1982; 1992; Currie, 1996). Provoca un incremento selectivo de la preferencia hacia los carbohidratos –y podría afectar a la palatabilidad de este tipo de macronutrientes-, aunque no todos los autores admiten esta hipótesis como válida (Rowland et al., 1996). Se ha señalado también, que las fibras procedentes del Haz Noradrenérgico Ventral, al cruzar por zonas hipotalámicas podrían inhibir la ingesta en función de la generación de señales autonómicas, que preparan al individuo para situaciones de emergencia (Hoebel et al., 1982)

Otros hallazgos obtenidos mediante microdialisis muestran aumentos en la concentración de noradrenalina extracelular del Núcleo Paraventricular en respuesta a varios tratamientos relacionados con la provocación de estados de déficit, que alcanzan su cénit al anochecer (Rowland et al., 1996), así como interacciones con otros neurotransmisores, por ejemplo con la serotonina, pues las inyecciones de 5-HT en el Núcleo Paraventricular bloquean el efecto estimulador de la ingesta, de manera dosis-dependiente (Currie, 1996).

En definitiva, se requieren nuevas investigaciones que clarifiquen los datos relativos a interacciones así como los lugares críticos de acción (Rowland et al., 1996; 2000). No obstante, estos y otros factores podrían actuar conjuntamente para modular los aspectos temporales de la conducta ingestiva así como la regulación del apetito para macronutrientes específicos (Currie, 1996).

Dopamina

La participación del sistema dopaminérgico en la ingesta empezó a ser estudiado a partir de una serie de experimentos y ensayos clínicos en los que se pusieron a prueba varios productos utilizados terapéuticamente en problemas de obesidad, bulimia etc. Primero fueron la *dl-anfetamina* (benzedrina) y la *d-anfetamina* (dexedrina), sustancias que actúan como agonistas indirectos facilitando la disponibilidad de la dopamina en la sinapsis, y después toda una generación de derivados, que ejercen una importante acción anoréctica, además de ser estimulantes del SNC y poseer otros efectos conductuales y fisiológicos (Cooper & Higgs, 1994; Terry, 1996; Stahl, 2000). También se analizaron los efectos de los agonistas directos y antagonistas, pero solo recientemente se han identificado los receptores específicos sobre los que actúan. En la actualidad se conocen al menos cinco subtipos, agrupados en dos familias -D₁ y D₅ así como D₂, D₃ y D₄-, se estudia la contribución relativa de cada uno de ellos en la conducta de ingesta y se trabaja en el desarrollo de nuevos fármacos mas específicos (Terry, 1996; Stahl, 2000).

El papel de este sistema en la regulación de la conducta nutritiva sigue siendo controvertido por varias razones: En primer lugar, es ampliamente conocida la implicación de la dopamina en comportamiento motor, lo cual podría predisponer la aparición de patrones de conducta incompatibles con la ingesta, o bien facilitar el control oromotor en conductas como la masticación. También ha sido extensamente involucrada en procesos de motivación y refuerzo/recompensa, con lo cual las drogas que modifican la ingesta podrían hacerlo a través de la modulación sobre estos procesos hedónicos (Cooper & Higgs, 1994; Terry, 1996; Stahl, 2000; Tzschentke, 2001).

Las anfetaminas han sido consideradas tradicionalmente como agentes anoréctico -actúan aumentando la latencia y reduciendo la duración total de un episodio de comida-. Sin embargo, varios estudios han encontrado que a dosis bajas pueden tener un efecto estimulador de la ingesta, lo que lleva a considerar la dosis como factor crítico (Evans & Vaccarino, 1990; Vaccarino, 1996; Terry, 1996). No obstante, su implicación en conducta nutritiva, es difícil de dilucidar por sus interacciones con otros sistemas neuroquímicos: algunas de estas interacciones no son selectivas para la dopamina, sino que, por el contrario, actúan de forma general liberando catecolaminas. En este sentido, otros fármacos que actúan como

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

inhibidores de la recaptación –mazindol, cocaína- provocan efectos parecidos (Vaccarino, 1996; Terry, 1996).

Los agonistas directos (apomorfina) son también agentes anorécticos que actúan reduciendo la ingesta, efecto que es antagonizado por neurolépticos (pimocida, haloperidol,...) aunque las interacciones son complejas (Terry, 1996). Curiosamente, las manipulaciones en dirección opuesta han arrojado los siguientes resultados: la administración de antagonistas provoca un efecto hipofágico sobre la ingesta de sacarosa y sacarina en animales no privados y en paradigmas de elección doble y falsa ingesta, además de afectar al número de respuestas instrumentales encaminadas a la obtención de comida (Towell et al., 1987; Cooper & Higgs, 1994; Terry, 1996). Los datos son aún mas contradictorios en experimentos llevados a cabo mediante el Test de Reactividad Gustativa, pues ni los agonistas ni los antagonistas tuvieron un efecto significativo sobre la conducta consumatoria (Treit & Berridge, 1990).

Estudios recientes llevados a cabo con fármacos mas selectivos muestran que los agonistas y antagonistas D₁ producen anorexia de forma consistente, enlenteciendo la tasa de ingesta y promoviendo la aparición de saciedad, aunque no se ha podido demostrar completamente la especificidad del efecto -por ejemplo, excluyendo los efectos motores- (Terry, 1996). Los estudios realizados con agonistas y antagonistas D₂ presentan problemas interpretativos al producir efectos bifásicos de hiperfagia a dosis bajas e hipofagia en dosis mas elevadas (Terry, 1996). Se ha propuesto que el efecto estimulador de la ingesta podría explicarse en función de la facilitación oromotora, y el efecto inhibidor, especialmente de los antagonistas D₂, por su implicación en conducta motivada. Una de las hipótesis más influyentes en este campo sugiere que estos antagonistas dopaminérgicos bloquean las cualidades reforzantes de la comida, -disminuyendo su valor como incentivo o afectando a los procesos regulatorios- (Wise & Rompré, 1989; Wise, 1994).

Las áreas cerebrales específicas sobre las que actúan son importantes a la hora de determinar el efecto de estas drogas sobre la ingesta. Así, las estructuras hipotalámicas parecen mediar los efectos anorécticos de los agonistas dopaminérgicos: se ha visto que las inyecciones de dopamina (DA) y adrenalina (E) en la parte lateral perifornical del hipotálamo, inhiben la ingesta aumentando la latencia para el inicio de la conducta. Son fibras cuyos cuerpos celulares se localizan en la parte dorsal del Puente y Bulbo -para el caso de las células adrenérgicas-,

llevando información autonómica de origen periférico, y en el Mesencéfalo Ventral - en el caso de la DA- (Leibowitz, 1982; Hoebel et al., 1982). Se piensa que podrían afectar a procesos ingestivos de tipo homeostático (Leibowitz, 1982; Hoebel et al., 1982; Angel et al., 1991).

Asimismo, se han propuesto puntos de unión para sustancias como el Mazindol (agonista dopaminérgico) y la Fenfluramina (agonista serotoninérgico) en el N. paraventricular e HTVM, regulados en función del estado nutricional y los niveles de glucosa en sangre. Los autores sugirieron a partir de estos resultados, que la interacción en esta zona de glucorreceptores con diversos sistemas de neurotransmisión (DA, NE, SHT) podría modular la ingesta de carbohidratos (Angel et al, 1986; 1988; 1991).

Por otro lado, la administración de anfetaminas en los núcleos Caudado (S. Nigroestriado) y Accumbens (S. Mesolímbico) tiene un efecto estimulador de la ingesta (Vacarino, 1996). Las acciones sobre este S. dopaminérgico mesolímbico reflejan, como veremos en el siguiente apartado, acciones sobre el mecanismo de refuerzo que se aplican al contexto de la ingesta (Pothos et al., 1995; Vacarino, 1996; Carr & Kutchukhidze, 2000; Roitman et al., 2001). Por tanto, el incremento en la liberación de dopamina en el N. Accumbens podría ser el mecanismo clave por el que los fármacos psicoestimulantes incrementan la ingesta, al parecer, de productos apetitosos-dulces principalmente (Evans & Vacarino, 1990; Gosnell et al, 1990; Drewnowski et al., 1992; Doyle et al., 1993; Koch & Bodnar, 1994; Pothos et al., 1995; Vacarino, 1996; Giraudo et al, 1999; Baker, 2001). Alternativamente, la interferencia en la transmisión dopaminérgica de estas mismas zonas, hace descender la conducta ingestiva (Vacarino, 1996; Baker et al., 2001).

En síntesis, todos estos datos señalan la existencia de un elevado número de sustancias químicas implicadas en el control de la ingesta y el equilibrio homeostático, algunas de las cuales inciden sobre procesos motivacionales, y reflejan la enorme complejidad de las interacciones entre ellas. Aunque tradicionalmente las estructuras implicadas en estos procesos han sido localizadas en el prosencéfalo, las investigaciones realizadas en las últimas décadas muestran que la participación de áreas troncoencefálicas -y en concreto, del N. Parabraquial- es cada vez mas evidente, pudiendo resumirse la regulación nutritivo-homeostática en una actuación a tres niveles: en zonas hipotalámicas, en la Amígdala y otras estructuras del S.

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Límbico y a nivel del Tronco cerebral, en estructuras como el N. Parabraquial (Leibowitz, 1992; Cooper & Higgs, 1994; Rowland et al., 1996; Hirschberg 1998).

IV - SUSTANCIAS DE ABUSO Y REFUERZO/ RECOMPENSA

Se tienen pruebas de que tanto los Sistemas Neuroquímicos implicados en la nutrición como los lugares de actuación de fármacos relacionados con esta conducta, pueden estar relacionados con otros procesos motivacionales tales como la autoadministración de drogas o la autoestimulación intracerebral, lo cual vendría a reforzar la hipótesis de la existencia de mecanismos neurales comunes para la ingesta de alimento y el refuerzo (Mogenson, 1982; Wise, 1982; 1994; 1996; 2000 White, 1989; White & Milner, 1992; Carlson, 1993; Berridge, 1988; Nader & Van der Kooy, 1994; Nader et al., 1997; Shippenberg & Elmer, 1998; Di Chiara, 1998; 1999, etc.).

En este sentido, importantes aportaciones experimentales, como la desarrollada por Carroll y colaboradores, muestran que tanto la privación de alimento como la restricción calórica generan incrementos paralelos en la autoadministración de drogas de abuso, algo que se ha demostrado en distintas condiciones experimentales, con diferentes sustancias de abuso y en diversas especies animales. Asimismo, se ha comprobado que este efecto puede ser invertido en el momento en que los animales vuelven a recuperar su peso normal (Carroll et al., 1979; Carroll & Meisch, 1980a; 1980b; 1981).

Igualmente, estudios llevados a cabo por Steven Paul y colaboradores, han encontrado como diversas sustancias de abuso como la cocaína y las anfetaminas se unen a receptores dopaminérgicos y noradrenérgicos del Tronco, Hipotálamo (áreas lateral, perifornical, ventromedial...) y Cuerpos Estriados, donde podrían ejercer sus efectos anorécticos (Paul et al., 1982; Hauger et al., 1986). Concretamente se observaron altas concentraciones de tales receptores en zonas sobre las cuales también actuaban diferentes fármacos reductores del apetito, desplazando a la anfetamina marcada radiactivamente y compitiendo por su ocupación. El estado de déficit-saciación determinó la cantidad de receptores, esto es, si los sujetos estaban privados de alimento descendía el número de puntos de fijación de la anfetamina marcada, mientras que la saciación condujo a un aumento significativo de los mismos (Paul et al., 1982; Hauger et al., 1986; Angel et al., 1987).

Más recientemente y en la misma línea, hay que destacar los datos aportados por el grupo de K. Carr y colaboradores, quienes han puesto de manifiesto como la

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

restricción crónica de alimento aumenta la respuesta a drogas como la anfetaminas y la cocaína (Carr & Kutchukhidze, 2000; Carr et al., 2000; 2001).

En conjunto, estas diferentes investigaciones han puesto de manifiesto que pueden existir conexiones relevantes entre el refuerzo natural y artificial, todo ello a través de la vía dopaminérgica mesocorticolímbica (White, 1989; White & Milner, 1992; Koob, 1992; 1999; 2000; Carlson, 1993; Berridge, 1996; Wise, 1996; 2000; Nader & Van der Kooy, 1994; Nader et al., 1997; Di Chiara, 1998; 1999; Spanagel & Weiss, 1999; Koob & Le Moal, 2001).

De hecho, en la actualidad se piensa que no existe un sistema anatómico propio para la conducta adictiva, sino que por el contrario, esta conducta podría reflejar como determinadas sustancias de abuso pueden usurpar el control de circuitos cerebrales que, desde el punto de vista evolutivo, han servido para satisfacer necesidades biológicas específicas de la especie, y este podría ser el caso de la Vía Dopaminérgica Mesocorticolímbica (Wise & Rompré, 1989; Koob, 1992; Wickelgren, 1997; Leshner, 1997; Nesse & Berridge, 1997; Shippenberg & Elmer, 1998; Tassin, 1998; Spanagel & Weiss, 1999; Nicola et al., 2000; Berke & Hyman, 2000; Wise, 2000; Nestler, 1999; 2001; Hyman, 1999; Koob & Le Moal, 2001). Sin embargo, los puntos de vista existentes acerca del papel exacto que desempeña la liberación de dopamina en este sistema han evolucionado desde una hipótesis inicial que la consideraba un correlato neuroquímico del refuerzo hasta ideas de una participación más amplia, concretamente en procesos relacionados con el aprendizaje y el condicionamiento, y/o también atribuyéndosele una función de intermediario o *'interface'* entre los sistemas límbico y motor, como ya se discutió en el primer apartado de esta Introducción.

Se tiene el convencimiento de que las sustancias adictivas actúan directamente sobre las neuronas que liberan DA con mucha mayor potencia y duración que los reforzadores naturales, estos últimos podrían ejercer su acción de manera indirecta. Si el efecto agudo de las drogas de abuso se prolonga durante un margen de tiempo suficiente, puede modificar de una manera crítica la función cerebral (Tassin, 1998; Hyman, 1999). Más aún, el uso crónico de estas sustancias de abuso puede provocar cambios persistentes en el cerebro, que se mantienen mucho tiempo después de que el individuo haya dejado de ingerirla. En efecto, el cerebro de un individuo adicto sufre cambios en la actividad metabólica, disponibilidad de receptores, expresión génica y responsividad a señales ambientales que lo hacen

diferente del cerebro de individuos no adictos (Leshner, 1997; Koob & Le Moal, 2001; Nestler, 2001; Hyman, 1999). Por tanto, para muchos autores, la adicción o la búsqueda de droga puede plantearse dentro del contexto de los circuitos cerebrales que controlan la conducta motivada y entendida en relación con los aspectos positivos y/o negativos incondicionados o condicionados que conlleva la ingesta de estas sustancias (Akil et al., 1997; Koob & Le Moal, 2001). Ambos efectos, agudos y crónicos, serán desarrollados a continuación.

El principal mecanismo cerebral que se ha propuesto para el refuerzo son las neuronas del S. Mesocorticolímbico cuyos cuerpos celulares se originan en el Área Tegmental Ventral y proyectan al prosencéfalo basal, principalmente al N. Accumbens. Este núcleo no puede ser considerado como una estructura homogénea, sino que se ha dividido estructural y funcionalmente en dos compartimentos, denominados '*core*' y '*shell*', respectivamente (Di Chiara, 1998; Koob & Le Moal, 2001). Área Tegmental Ventral y Núcleo Accumbens, forman parte de un circuito motivacional más complejo, que controla una amplia variedad de conductas, tales como planificación motora, ingesta compulsiva -'*binge*'- y aprendizaje, funciones ligadas a su amplia *inervación dopaminérgica* cuyas conexiones alcanzan también a otras zonas cerebrales como el Tubérculo Olfatorio, Amígdala, Cortezas Frontales, y Límbicas, y a la presencia en este sistema, de células que contienen ARNm y receptores *opiáceos* implicados en procesamiento emocional y dolor (Koob, 1992; 1999; Self & Nestler, 1995; Nestler, 1999; 2001; Koob & Le Moal, 2001), así como *GABA* (Koob, 1992; Berke & Hyman, 2000).

El Área Tegmental Ventral (ATV) recibe aferencias desde regiones prosencefálicas tales como el córtex prefrontal, N. Accumbens, N. Lecho de la Estría Terminal, Banda diagonal de Broca, Sustancia Innombrada, Área Preóptica lateral e Hipotálamo Lateral. Al mismo tiempo, las proyecciones troncoencefálicas que finalizan en el ATV incluyen el Colículo Superior, Sustancia Nigra, Rafe Dorsal, N. Dentado del Cerebelo y N. Parabraquial (Ikemoto & Panksepp, 1999). Por su parte, el Núcleo Accumbens recibe aferencias *serotonérgicas* procedentes del Rafe y *glutamaérgicas* de la Corteza, S. Límbico y Tálamo, que podrían ejercer un papel excitador del sistema ATV-NAC (Self & Nestler, 1995; Koob, 1999; Ikemoto & Panksepp, 1999; Tassin, 1998; Berke & Hyman, 2000; Hyman, 1999; Koob & Le Moal, 2001; Nestler, 1999; 2001). En función de los datos existentes en la actualidad, frente a los autores que defienden un papel crítico de la dopamina en el circuito del refuerzo, hay quienes hacen un mayor énfasis en una organización modular de

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

sistemas coordinados en paralelo, donde el N. Accumbens funcionaría como elemento común de estos múltiples circuitos neuroquímicos implicados en el refuerzo (Koob, 1992; Koob & Le Moal, 2001; Self & Nestler, 1995; Nestler, 1999; 2001).

Las conexiones dopaminérgicas eferentes de este sistema que conecta el Área Tegmental Ventral con el Núcleo Accumbens (Mesoaccumbens) tienen una organización modular en paralelo, donde es posible distinguir dos grupos de estructuras: 1) Las conexiones con el Accumbens 'Shell' y la 'Amígdala extendida', al parecer involucradas funcionalmente en los efectos reforzantes agudos de las sustancias psicoestimulantes y en la generación de neuroadaptaciones tras los cambios neuroquímicos asociados con el síndrome de retirada (Koob, 1999; Di Chiara, 1999; Ikemoto & Panksepp, 1999; Koob & Le Moal, 2001). 2) El complejo Estriado-Pálido-Talámico, relacionado con el circuito Córtico-Frontal-Cingulado, podría estar involucrado más bien con el funcionamiento cognitivo activando mecanismos centrales de '*drive*', repetitivos y de búsqueda compulsiva de droga, los cuales pueden quedar bajo el control de procesos de condicionamiento secundario, como se ha podido comprobar mediante técnicas de neuroimagen (Berke & Hyman, 2000; Fowler, et al., 1999; Koob & Le Moal, 2001). Este último circuito Córtico-Frontal-Cingulado podría depender también de la 'Amígdala Extendida', pero dado que mantiene importantes conexiones con el N. Accumbens 'core', parece estar más relacionado con el segundo sistema, Estriado-Pálido-Talámico (Koob & Le Moal, 2001).

En ausencia de drogas, estos sistemas parecen actuar como mediadores entre señales biológicas/ variables motivacionales y la conducta, de modo que determinadas sustancias como cocaína, nicotina, opiáceos o alcohol facilitarían la acción de los neurotransmisores presentes esta región. Aunque cada una de estas sustancias probablemente utilice un mecanismo diferente, al parecer todas actúan sobre este substrato común interaccionando con él a diferentes niveles sinápticos (Koob & Bloom, 1988; Wise & Rompré, 1989; Parker, 1991; Ramos Atance, 1993; Meyer, 1995; Self & Nestler, 1995; Wise, 1996; Koob, 1999; Tassin, 1998; Hyman, 1999).

Varios han sido los procedimientos que se han desarrollado para estudiar algunos de los distintos aspectos del comportamiento adictivo (Wise, 1999): El modelo más obvio de adicción es el de autoadministración de drogas, que muestra

que los animales son capaces de aprender una *Conducta Instrumental* con objeto de autoadministrarse varios tipos de sustancias de abuso. Es probable que el ‘*feedback*’ interno de la acción de la droga sea asociado con los estímulos externos para generar un trazo de memoria. O bien el modelo de *Condicionamiento de Preferencia Espacial*, en que se asocia la administración de una droga con un compartimento de un laberinto y la ausencia de droga con otro. Tras varias asociaciones se permite al animal elegir libremente y se contabiliza el tiempo empleado en uno y otro ambiente. Para ello se basa en un paradigma de Condicionamiento Pavloviano puesto que la administración de droga es independiente de la conducta del animal. Finalmente otros modelos utilizan híbridos de aprendizaje clásico e instrumental, por ejemplo enseñar al animal a responder instrumentalmente a un Estímulo que previamente ha sido asociado con una droga mediante Condicionamiento Clásico (Wise, 1999; Tzschentke, 1998; Schechter & Calcagneti, 1998).

Existe la creencia general de que las drogas adictivas producen neuroadaptaciones en el circuito del refuerzo, cuyos mecanismos aún no son bien conocidos. Algunas de estas transformaciones biológicas se manifiestan a través de la aparición de tolerancia (necesidad de aumentar progresivamente la dosis para obtener el mismo efecto) y dependencia, física (estado adaptativo que se manifiesta por trastornos físicos cuando la administración de droga se suspende) o psíquica (síntomas emocionales y motivacionales de retirada –disforia, incapacidad para experimentar placer, etc.-), así como sensibilización (aumento de la actividad exploratoria, tras administración intermitente, etc.) (Koob & Bloom, 1988; Koob, 1999; Hyman, 1999).

También parece que se generan huellas de memoria en relación con el uso de una droga, de manera que los lugares, personas, sensaciones corporales, etc. asociadas con el consumo de estas sustancias, elicitán los cambios fisiológicos, deseos compulsivos y conductas automáticas que hemos descrito anteriormente (Wise, 2000; Hyman, 1999). De hecho, diferentes estudios han puesto de manifiesto que el contexto puede ser un factor clave para las recaídas (Sell et al., 1999; Wise, 2000; Hyman, 1999) al dar lugar a modificaciones en la plasticidad de las estructuras involucradas en aprendizaje y condicionamiento, las cuales pueden darse, además de en el sistema ATV-NAC, en la Amígdala y la C. Prefrontal (Nestler, 1999; 2001).

Estas dos estructuras, Amígdala y Corteza, podrían estar implicadas también en la transformación los estímulos reforzantes en respuestas adaptativas, aunque

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

algunos autores han hecho una distinción funcional entre ellas: Mientras que la Amígdala estaría involucrada en regular la respuesta al refuerzo condicionado, la Corteza Prefrontal podría tener un papel importante en la integración de los trazos de memoria a corto plazo con la respuesta conductual al refuerzo (Kalivas & Nakamura, 1999). Así, las investigaciones con primates han mostrado que las lesiones neurotóxicas de la amígdala producen deterioro en las conductas controladas por un programa de reforzamiento de segundo orden, sin afectar a la ejecución en programas de refuerzo primario (Parkinson et al., 2001). Del mismo modo, estudios de neuroimagen realizados con sujetos humanos han puesto de manifiesto que el Córtex Orbitofrontal tiene un papel importante en la representación neural de las magnitudes de refuerzos y castigos abstractos como ganar o perder dinero (O'Doherty et al., 2001; 2002).

Actuación de las drogas sobre el S. Mesocorticolímbico

Psicoestimulantes

Desde el punto de vista neurobiológico, se ha demostrado que la cocaína eleva los niveles sinápticos de DA en el N. Accumbens, bloqueando la acción de las proteínas transportadoras que se encuentran en las terminales nerviosas monoaminérgicas de dopamina, serotonina y noradrenalina, mientras que las anfetaminas potencian la transmisión dopaminérgica favoreciendo su liberación en el espacio sináptico (Koob & Bloom, 1988; Woolverton & Johnson, 1992; Berke & Hyman, 2000; Koob & Le Moal, 2001).

La dopamina a su vez actúa básicamente sobre dos tipos de receptores, D1 y D2 provocando una serie de reacciones moleculares:

Dentro del primer grupo se incluyen receptores D1 y D5. Están asociados a proteínas G_s y G_{olf} , que estimulan a la Adenil Ciclasa para producir AMPc, un segundo mensajero cuyas acciones se traducen activación de PKA cuya función es la de fosforilar proteínas asociadas a los canales de calcio así como a canales de sodio y potasio y factores de transcripción. Sus efectos sobre el disparo de las células son complejos, dependiendo del grado de activación de la neurona (Self & Nestler, 1995; Wise, 2000). Los receptores D2 -incluyendo a los subtipos D2, D3 y D4- asociados

a proteínas G_i/G_o inhiben a la Adenil Ciclasa y activan canales rectificadores de potasio. Se encuentran tónicamente –continuamente– activados por los niveles basales de dopamina, necesarios para la conducta motora normal (Woolverton & Johnson, 1992; Self & Nestler, 1995; Wise, 2000; Berke & Hyman, 2000; Koob & Le Moal, 2001).

Estas sustancias estimulantes tienen efectos incondicionados y condicionados sobre la conducta: así las dosis moderadas de cocaína aumentan la actividad locomotora y mantienen la conducta de autoadministración en animales y facilitan ligeramente la ejecución de una tarea aprendida en humanos, además de producir euforia. Finalmente, actúan como estímulos discriminativos señalando la aparición de consecuencias positivas (Woolverton & Johnson, 1992).

La administración continuada de psicoestimulantes da lugar a *tolerancia*, mientras que la ingesta intermitente produce *sensibilización*. Estos síntomas motivacionales dan lugar a adaptaciones en las regiones cerebrales relacionadas con el circuito del refuerzo, como la vía ATV-NAC (Woolverton & Johnson, 1992; Self & Nestler, 1995; Berke & Hyman, 2000).

Así, la estimulación prolongada de los receptores D1 como consecuencia del efecto de anfetaminas o cocaína da lugar a una serie de respuestas celulares: 1) Disminución de la síntesis de AMPc e internalización de los receptores D1 estriatales, que podría ser responsable del efecto de tolerancia aguda. 2) A más largo plazo, estas acciones podrían conducir a un aumento en la expresión de dinorfina en las células estriatales, que a su vez activaría a los receptores opiáceos κ en las terminales dopaminérgicas presinápticas y a un descenso en la liberación de dopamina por debajo de los niveles de línea base. La activación de estos receptores tiene efectos aversivos que podrían contribuir a la aparición de reacciones emocionales negativas durante el síndrome de retirada. 3) Además, estos receptores D1 en otras zonas cerebrales participan en aprendizaje, por lo cual se ha hipotetizado que, en el Estriado podrían actuar de forma paralela modificando la fuerza de las sinapsis relacionadas con la señalización del refuerzo. 4) Finalmente, podrían actuar induciendo modificaciones genéticas (*'Inmediates Early Genes'*), cuyas funciones aún no se conocen bien (Koob & Bloom, 1988; Woolverton & Johnson, 1992; Kalivas et al., 1998; Berke & Hyman, 2000; Wise, 2000).

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

También puede ocurrir sensibilización inducida por estrés, sobretodo si los agentes estresores son incontrolables e impredecibles. Pero este efecto de sensibilización conductual no parece estar mediado por la dopamina puesto que se da incluso en animales con lesiones mediante 6-OH-DA (Wise, 2000; Berke & Hyman, 2000).

Otros estudios muestran cambios estructurales en el Sistema VTA-NAC, que incluyen descenso en los niveles de neurofilamentos y disminución del calibre de estas neuronas, así como en el transporte axonal que podrían explicar el hallazgo de niveles reducidos de DA en esta región (Self & Nestler, 1995).

Opiáceos

A partir de la demostración, en los años setenta, de la existencia de receptores opiáceos cerebrales para la morfina, los estudios posteriores han hallado y reconocido básicamente, tres familias de péptidos endógenos con actividad opiácea, -encefalinas, endorfinas y dinorfina- así como los receptores específicos a los que se unen: μ con afinidad para encefalinas y endorfinas, δ para endorfinas, κ para la dinorfina y ϵ para la β -endorfina (Goldberg, 1989; Knapp et al., 1995; Nock, 1995; Akil et al., 1997).

Las mayores concentraciones de β -endorfina se hallan en el HT basal -N. Arqueado- proyectando hacia otras áreas hipotalámicas y en el NTS proyectando a la Formación Reticular y SGPA. Las encefalinas se distribuyen ampliamente por todo el cerebro, con altas concentraciones en el Globo Pálido y Telencéfalo, Cerebro Posterior y Médula. La dinorfina está presente sobretodo en la hipófisis posterior e hipotálamo, Amígdala, Septum, Estriado, Mesencéfalo y Médula (Simon & Hiller, 1994). Por otra parte, a nivel mesencefálico y pontino, los receptores μ y κ muestran distribuciones bastante paralelas, encontrándose en la Sustancia Gelatinosa de la Médula, N. Espinal del Trigémino, NTS, N. del Rafe, Locus Coeruleus, Colículos, N. Parabraquial y S. Gris Periacueductal (Mansour et al., 1988; Mansour et al., 1994; Simon & Hiller, 1994).

Los efectos motivacionales centrales de los opiáceos parecen estar estrechamente relacionados con el sistema dopaminérgico mesolímbico, ya que la infusión de neurotoxinas (6-OHDA) en el N. Accumbens, el lugar de finalización de las fibras procedentes del Área Tegmental Ventral (ATV), eliminó el efecto

producido por la inyección de agonistas o antagonistas sobre los distintos receptores opiáceos del SNC (Shippenberg et al., 1993). Su actuación tiene lugar a dos niveles: desinhibiendo neuronas dopaminérgicas del VTA lo cual da como resultado la liberación de DA en el Accumbens, y también mediante un mecanismo en el NAC independiente de la liberación de dopamina en esta zona (Koob & Bloom, 1988; Di Chiara & North, 1992; Koob, 1999; Tassin, 1998; Shippenberg & Elmer, 1998; Hyman, 1999).

Los estudios funcionales mediante agonistas y antagonistas selectivos, muestran paralelismos entre receptores μ y δ , que han sido relacionados con regulación del dolor e integración sensomotora, pero diferencias importantes respecto a los receptores κ , implicados en equilibrio hídrico, nutrición, percepción del dolor y control neuroendocrino (Mansour et al., 1988; Mansour et al., 1994; Simon & Hiller, 1994; Akil et al., 1997). Por tanto, dependiendo del tipo de receptor sobre el que actúen, las sustancias opiáceas pueden tener efectos reforzantes o aversivos: La administración de agonistas μ y posiblemente δ genera preferencias, mientras que los que actúan sobre el receptor κ , generan aversiones, que son invertidas por naloxona. (Herz & Spanagel, 1995). Recientemente se ha podido clonar un nuevo tipo de receptores, denominados ‘orfanina FQ’ o también ‘nociceptina’, dado que en ciertas condiciones hacen descender los umbrales de dolor (Akil et al, 1997).

Así se ha visto que la administración de agonistas μ –Ej.: DAMGO- generaba preferencias si se inyectaba en el ATV, mientras que los agonistas κ provocaron aversiones en toda la vía (incluyendo el ATV, N. Accumbens, C. Prefrontal Medial e Hipotálamo lateral), (Bals-Kubik et al., 1993; Shippenberg & Bals-Kubik, 1995). Del mismo modo, mediante técnicas de microdiálisis se ha puesto de manifiesto que la inyección de agonistas μ en el ATV incrementa la liberación de dopamina en el N. Accumbens mientras que no tuvieron efecto los agonistas κ (Spanagel et al., 1992). Resultados opuestos se obtuvieron cuando la inyección tenía lugar en el N. Accumbens -los agonistas κ hicieron disminuir el flujo de neurotransmisor-(Spanagel et al., 1992), lo que sugiere que la tasa de dopamina basal está controlada tónicamente por la acción recíproca y combinada de ambos sistemas opiáceos.

Algunos autores (Spanagel et al., 1992; Herz & Spanagel, 1995) han propuesto un modelo explicativo de la interacción entre opiáceos y sistema dopaminérgico mesolímbico, según el cual las encefalinas del Área Tegmental

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Ventral (y posiblemente la beta-endorfina procedente del Núcleo Arqueado) actuarían sobre receptores μ hiperpolarizando interneuronas inhibitoras gabaérgicas de esta zona (Johnson & North, 1992), y dando como resultado una excitación de las células dopaminérgicas. En la región del Núcleo Accumbens, la dinorfina podría actuar presinápticamente sobre las terminales dopaminérgicas produciendo una inhibición. Luego el mantenimiento de la liberación de dopamina basal en el Núcleo Estriado Ventral parece depender, según estos autores, del equilibrio entre un sistema facilitador μ/δ , y otro inhibidor, mediado por activación de receptores κ .

Pero los opiáceos también pueden ejercer sus efectos motivacionales independientemente de la vía mesoestriada (ATV-N.Accumbens), pues lesiones localizadas en el Estriado Ventral reducen la eficacia reforzante de estas sustancias autoadministradas por vía intra-venosa pero no la eliminan (Zito et al., 1985). Además son capaces de mantener conductas de autoadministración en la región CA3 del Hipocampo y en el HT Lateral (Stevens et al., 1991; Self & Nestler, 1995).

La administración crónica de morfina, de manera similar a lo que ocurría en el caso de las drogas psicoestimulantes, da lugar a una hiporregulación en sus receptores así como a una disminución en la síntesis y almacenamiento de opiáceos endógenos, intensificando el valor negativo del síndrome de retirada: se ha visto que los receptores μ y δ están asociados a proteínas G y tienen como efecto la inhibición de la Adenil Ciclasa y la reducción en los niveles de AMPc, pero hay menos acuerdo respecto a los efectos de la actuación sobre receptores κ (Nestler, 1999; Akil et al., 1997).

Los efectos de tolerancia aguda serían producidos por fosforilación de receptores μ y δ , mientras que la tolerancia crónica se debería a un incremento en la actividad de la Adenil Ciclasa, para contrarrestar el descenso en AMPc tras ingesta aguda y a la internalización de receptores. (Nestler, 1999; Akil et al., 1997).

Otras sustancias de abuso

El Sistema Dopaminérgico Mesolímbico puede ser activado también por otras drogas de abuso (Koob & Bloom, 1988; Koob, 1999; Tassin, 1998; Wise, 1999; Koob & Le Moal, 2001; Hyman, 1999; Fernández-Espejo, 2002): Así, la nicotina imita la acción de la acetilcolina actuando sobre receptores nicotínicos presentes en

neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, aunque sus acciones son complejas e implican además interacciones con otros sistemas (Picciotto & Corrigall, 2002). Por otro lado, los efectos adictivos del alcohol se han relacionado con su actuación sobre receptores GABA-A, NMDA y 5-HT₃, que tienen como resultado la desinhibición en las neuronas del Sistema Mesolímbico y una elevación de las concentraciones de dopamina en el Núcleo Accumbens. Y tras el consumo crónico de esta sustancia, se genera una hipofunción en el sistema Mesolímbico que sería responsable del mantenimiento de la conducta adictiva, aunque también se ha observado que podría ejercer sus efectos reforzantes a través de la interacción con otros sistemas, como por ejemplo con el sistema opiáceo (Weiss & Porrino, 2002). Finalmente, se han estudiado las propiedades motivacionales y reforzantes de las sustancias cannabinoideas mediante procedimientos como el de autoadministración intravenosa y/o condicionamiento espacial y se ha constatado recientemente la inducción de tolerancia y sensibilización así como el efecto facilitador de la liberación de dopamina en el Núcleo Accumbens (Maldonado & Rodríguez de Fonseca, 2002).

En definitiva, se ha sugerido que opiáceos, anfetaminas, cocaína, etanol, etc. comparten la capacidad para incidir sobre un mismo mecanismo de refuerzo -la vía dopaminérgica mesolímbica- (Koob & Bloom, 1988; Wise & Rompré, 1989; Parker, 1991; Ramos Atance, 1993; Meyer, 1995; Self & Nestler, 1995; Wise, 2000) actuando a diferentes niveles sinápticos, a la vez que, como ya se ha expuesto, ejercen efectos importantes sobre la ingesta. Aunque hay distintas opiniones con respecto a si activan diferentes subsistemas de refuerzo organizados en paralelo o bien actúan sobre un único sistema con diferentes estructuras funcionando en serie, en lo que sí hay acuerdo en gran parte a través de la evidencia disponible en este momento, es en la hipótesis de un mecanismo compartido con respecto a los reforzadores naturales (Wise, 1996, 1998, 2000; Kelley & Berridge, 2002; Robinson & Berridge, 2003). A pesar de todo, hay datos que resultan discrepantes, pues algunos autores sostienen lo contrario, basándose fundamentalmente en el hallazgo de que las manipulaciones en los niveles de déficit-saciación de alimento solo produjeron efectos inespecíficos en la conducta de autoestimulación (Angyán, 1984).

En las décadas de los setenta y ochenta se formularon dos teorías que intentaban explicar la conducta adictiva: Una de ellas, la 'Teoría de los Procesos Oponentes', desarrollada por Solomon y Corbitt (Solomon & Corbitt, 1973 –citado

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

por Robinson & Berridge, 2003-), propone que las sensaciones placenteras provocadas inicialmente por la droga dan origen a sensaciones de malestar posterior –por adaptación fisiológica del organismo-, que se expresan lentamente, tanto mayores cuanto mas alta ha sido la cantidad de esta sustancia ingerida previamente. Esta hipótesis propone que la droga es buscada y considerada reforzante porque acaba con un estado aversivo, como puede ser aliviar un dolor, enfermedad, pobreza, aislamiento social, depresión, estrés, etc., pero no explica el fenómeno de establecimiento de hábito a menos que se den previamente problemas de depresión, estrés o discapacidad. Además, la mayor parte de los estudios que apoyaban esta idea se centraban en el efecto de los opiáceos, cuya supresión da lugar a síntomas de dependencia física, pero los estimulantes no tienen este efecto, aunque sí provocan una fuerte dependencia psíquica (Tassin, 1998; Wise, 1999; Koob et al., 1997; Koob & Le Moal, 2001; Robinson & Berridge, 2003).

Según el modelo de refuerzo positivo –placer, incentivo- propuesto por Stewart y posteriormente por Wise (Stewart & Wise, 1992 ; Stewart, 2000 –citados por Robinson & Berridge, 2003), los individuos tratan de conseguir un efecto que eleve el estado emocional ordinario y repetirlo. En función de este modelo, la droga sería adictiva porque produce un estado de ‘euforia’, suficiente para explicar la adquisición de la conducta, el mantenimiento y las recaídas, pero no explica por qué estos hábitos se vuelven compulsivos (Tassin, 1998; Wise, 1999). Otros autores posteriores como Schultz han señalado la capacidad de la droga para actuar como incentivo, mientras que Robinson y Berridge (Robinson & Berridge, 2003) proponen que solo la búsqueda de droga está bajo control dopaminérgico pero no sus efectos hedónicos, con lo cual explicarían la conducta compulsiva pero no darían razón de por qué consumir droga aporta placer al toxicómano (Tassin, 1998; Schultz et al., 1998; Schultz, 1997; 2002).

Sin embargo, más recientemente se ha formulado una teoría que engloba ambos aspectos, basada en el concepto de ‘*alostasis*’, por contraposición a ‘*homeostasis*’. La homeostasis es el mecanismo que mantiene la estabilidad de los sistemas fisiológicos dentro de unos límites que hacen posible la supervivencia. En el ciclo de la adicción, la ingesta de droga se mantiene porque es reforzada, pero también genera activación de respuestas de estrés ante nuevas demandas del organismo que le llevan a un estado de sobreactivación emocional y de arousal nocivos y al reclutamiento de nuevos sistemas neurobiológicos y neuroendocrinos relacionados con el estrés que llegan a resultar patológicos. Es, por tanto, un proceso

que mantiene la estabilidad dentro de unos parámetros que ya no son homeostáticos, sino que se sitúan en un nuevo punto equilibrio para hacer frente a las demandas crónicas (Koob & Le Moal, 2001).

Según el grupo de Koob y colaboradores, tres serían los circuitos implicados en la transición al estado alostático: los sistemas cerebrales de refuerzo, los mecanismos involucrados en el estrés y el circuito córtico-talámico-estriatal. En individuos no dependientes el sistema de refuerzo funcionaría normalmente, las demandas ambientales estresantes son mínimas y el circuito córtico-estriado-talámico de estrés no se ve involucrado, pero durante la transición al estado de dependencia todos los circuitos se ven comprometidos: el sistema de refuerzo estaría hipoactivado mientras que los otros dos mecanismos se encontrarían altamente activados, lo cual haría que durante los periodos de abstinencia se mantenga una hiperactivación residual de los sistemas de estrés e hipoactivación residual de los sistemas de refuerzo (Koob & Le Moal, 2001).

La mayoría de los autores están de acuerdo en admitir la implicación de la vía Mesocorticolímbica como sustrato fundamental en la explicación de los efectos positivos de las drogas de abuso así como su participación en el refuerzo negativo asociado con el estado de 'alostasis' durante la adicción (Hitchcott & Phillips, 1997; Koob & Le Moal, 2001), pero se tiene poco conocimiento de cuales son las estructuras implicadas en el procesamiento de estos aspectos en los niveles mas básicos, a saber, en el Tronco Cerebral y Mesencéfalo.

De estos estudios, la mayor parte de los que implican a estructuras caudales se han centrado en el Núcleo Tegmental Pedunculopontino (NTPP), una estructura formada por células colinérgicas y no colinérgicas, cuyos axones discurren en sentido tanto descendente como ascendente. Los axones descendentes conectan el S. Límbico (Pálido Ventral, Hipotálamo y ATV) con la vía extrapiramidal y otras estructuras motoras, sirviendo de intermediarios o '*interface*' entre ambas (Bechara & Van der Kooy, 1989; Dunbar et al., 1992; Rugg et al., 1992; Koch et al., 1994; Steckler et al., 1994). Las fibras ascendentes conectan la Formación Reticular con estructuras del Prosencéfalo basal y talámicas, involucradas en cognición; con el Hipotálamo y zonas mesencefálicas relacionadas con procesos motivacionales (Área Tegmental Ventral y Sustancia Negra), y con el colículo superior, relacionado con

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

mecanismos atencionales (Dunbar et al., 1992; Yeomans et al., 1993; Steckler et al., 1994).

Se ha observado que las lesiones de esta zona Tegmental Pedúnculo Pontina bloquean las preferencias inducidas por la administración morfina, anfetaminas o comida (Bechara & Van der Kooy, 1989; 1992a; 1992b; Bechara et al., 1992; Nader et al., 1997; Trojnar & Staszewska, 1995) en animales no adictos (*'naïve'*) y no privados de alimento, lo cual ha sido interpretado por Van der Kooy y colaboradores en el sentido de que este núcleo podría formar parte de un circuito de refuerzo en el que la influencia del desequilibrio homeostático es mínima e irrelevante para la conducta, que operaría en paralelo con otros sistemas de refuerzo (Nader et al., 1997). Sin embargo, otro grupo de datos obtenidos por Olmstead y colaboradores no apoyan esta distinción de redes motivacionales en función del estado de privación, sino que las lesiones del NTPP afectarían a los efectos motivacionales incondicionados/condicionados de drogas como la heroína o las anfetaminas (Olmstead & Franklin, 1993; 1994; Olmstead et al., 1998).

Recientes hallazgos neuroanatómicos han permitido identificar nuevas conexiones neuroanatómicas de relevo de la vía mesocorticolímbica con la 'Amígdala Extendida', una macroestructura que está compuesta por varias estructuras prosencefálicas basales similares en morfología, inmunohistoquímica y conexiones, que incluyen: el Núcleo Lecho de la Estría Terminal, Núcleo Central Amigdaloides y Sustancia Innominada (Hitchcott & Phillips, 1997; Cassell et al., 1999; Koob & Le Moal, 2001). Cada una de estas estructuras recibe aferencias procedentes del Complejo Parabraquial, y en concreto, del Subnúcleo Parabraquial Lateral Externo (Fulwiler & Saper, 1984; Bernard et al., 1991, 1993; Alden et al., 1994; Halsell, 1992; Jia, et al., 1994), con lo cual cabe pensar en la posibilidad de que esta estructura participe en el procesamiento de diversos tipos de estimulación cuyas consecuencias serían reforzantes, pero aún es necesario llevar a cabo nuevas investigaciones para probar esta hipótesis.

V - AUTOESTIMULACION INTRACEREBRAL Y MECANISMOS DE REFUERZO/RECOMPENSA

El fenómeno de la AEIC fue observado por primera vez en 1954, cuando Olds y Milner, que estaban investigando el efecto de la estimulación eléctrica de la Formación Reticular sobre el 'arousal' y el aprendizaje, encontraron que uno de los animales repetía la conducta realizada inmediatamente antes de la estimulación. La zona donde se encontró este efecto de forma más consistente fue a lo largo del Fascículo Proencefálico Medial, aunque después se ha obtenido en muchas otras regiones cerebrales (Milner, 1989).

Este descubrimiento de la Autoestimulación Intracerebral (AEIC) supuso una aproximación al estudio de los mecanismos cerebrales de la recompensa, pues constituye una prueba anatómicamente selectiva, que permite activar directamente estos circuitos cerebrales. De hecho, se ha estimado que su potencia decrece con el cuadrado de la distancia respecto al extremo del electrodo y decae hasta niveles despreciables en un radio de fracciones de milímetro, pero es indiscriminada respecto al tipo de neuronas que activa (Wise & Rompré, 1989). Sin embargo, aunque se trata de un modelo útil para el estudio del refuerzo, la AEIC posee características peculiares (Geen et al., 1984; Markou & Koob, 1993):

Una de ellas es la persistencia, que lleva a los organismos a repetir la conducta durante horas e incluso días, hasta el agotamiento, ignorando cualquier otra actividad. Por tanto, no se observa saciación, ni tampoco requiere un estado de privación para la ejecución de esta conducta.

Los animales comienzan realizando la conducta instrumental con una tasa inferior durante los primeros ensayos, pero el proceso de adquisición es rápido, puesto que la AEIC actúa como un potente reforzador. Se ha observado un descenso nocturno en las tasas de respuesta.

Otra característica es su extremada labilidad, que adopta varias formas: a) Extinción rápida del comportamiento cuando la estimulación deja de ser administrada: el animal se olvida completamente de la conducta cuando presiona la palanca y no obtiene estimulación, en vez de mostrar el patrón típico de extinción, caracterizado por un ligero incremento seguido de un descenso progresivo. b)

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Ejecución errática cuando la estimulación es controlada por un programa de reforzamiento parcial. c) Deterioro de la ejecución cuando los intervalos entre ensayos son largos.

Este comportamiento ha sido documentado en multitud de especies e incluso en el hombre (Heath, 1963; 1972: -citados por Wise, 1996-; Geen et al., 1984). Además, los estudiosos del tema mantienen la convicción de que no se trata de un mero artefacto de laboratorio, sino más bien de un fenómeno que implica la activación de un sistema endógeno de recompensa (Hoebel, 1976; Wise & Rompré, 1989).

Una cuestión a tener en cuenta se refiere al modo en que la estimulación eléctrica genera cambios en la conducta. Paralelamente a lo que se ha venido señalando en esta introducción respecto a reforzadores naturales tales como estímulos gustativos y sustancias de abuso, diversos autores (Wise & Rompré, 1989; White, 1989; White & Milner, 1992) han sugerido que la AEIC tiene dos tipos de efectos: elicit conductas de aproximación y permite el fortalecimiento de conexiones entre un estímulo y sus consecuencias, es decir, permite el aprendizaje. Ambas propiedades son independientes, como se ha podido demostrar en experimentos en que los animales son capaces de aprender una conducta operante con objeto de conseguir estimulación de su propio cerebro, a la vez que facilita la adquisición de respuestas de signo contrario, como escape o evitación, -por ejemplo, huir de un compartimento cada vez que se enciende una luz- (Capdevila-Ortiz et al., 1988).

Por otra parte, la AEIC se puede controlar de forma bastante precisa, manipulando determinados parámetros: Normalmente se utilizan pulsos rectangulares de corriente negativa, cuya frecuencia puede oscilar entre 20 y 200 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. También se puede manipular la duración de cada pulso eléctrico, aunque se recomienda que sea en torno a 0,1 milisegundo (Yeomans, 1990).

En cuanto a la variable a registrar (VD), los investigadores han venido contabilizando la tasa de respuestas que el sujeto realiza en un período de tiempo arbitrario, aunque pronto se observó que esta medida podía estar contaminada por diversos factores (por ej. de tipo motor) y se empezaron a buscar alternativas para

paliar esta problemática. Una posibilidad consiste en analizar la función que relaciona la tasa de presión de la palanca con la intensidad, frecuencia o duración de la estimulación, manteniendo constantes los demás parámetros. Se obtiene una curva con forma de 'S', a partir de la cual se suelen hacer inferencias acerca de la potencia y/o eficacia de la estimulación, y su posible alteración mediante sustancias psicoactivas (Miliaressis et al., 1986).

La delimitación anatómica de los circuitos implicados en AEIC ha sido posible mediante la combinación de distintos procedimientos y técnicas. Los estudios de cartografía/mapeado cerebral han implicado a una serie de estructuras distribuidas a lo largo de la franja comprendida entre el Prosencéfalo basal y el Tronco Cerebral:

En posiciones anteriores, las zonas más consistentemente asociadas con AEIC incluyen los Bulbos Olfatorios, Corteza Prefrontal, Amígdala e Hipocampo, y una región comprendida entre el Globo Pálido y el Núcleo Accumbens (Wise & Rompré, 1989; Olds & Fobes, 1981; Gallistel et al., 1996; Robbins & Everitt, 1999; Kandel et al., 2000).

No obstante, como se indicaba anteriormente, es a lo largo del Haz Prosencefálico Medial, -un conjunto de fibras orientadas en dirección rostro-caudal desde el mesencéfalo al prosencéfalo basal-, donde se han encontrado tasas más altas y umbrales más bajos de AEIC. Sus límites se extienden ventralmente desde la 'zona incierta' hasta la base del cerebro y lateralmente desde el fórnix a la parte medial de la cápsula interna (Routtenberg, 1976; Wise & Rompré, 1989; Gallistel et al., 1996; Kandel, et al., 2000).

En localizaciones posteriores del Mesencéfalo y Tronco, se ha encontrado este efecto reforzador en una zona comprendida entre el Acueducto Cerebral y el N. Interpeduncular, continuándose con otra región en la parte dorsal de la Sustancia Gris Central y porción ventral del Tegmento (incluyendo la Sustancia Negra y el Área Tegmental Ventral). Por último, se ha descrito AEIC en los Núcleos Pontinos, sobretudo en la parte ventral del Rafe Dorsal, cerca del Locus Coeruleus, Núcleo Tegmental Pedunculopontino y Región Parabraquial Medial, algo que, por otra parte, ha sido corroborado por métodos inmunohistoquímicos (Routtenberg, 1976; Wise & Rompré, 1989; Gallistel et al., 1996; Arvanitogiannis et al., 1997; Kandel et al., 2000; Nakahara et al., 2001), además de en el Núcleo del Tracto Solitario,

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Médula Dorsolateral, Núcleo Motor del Trigémino y Núcleos Cerebelosos Profundos (Routtenberg, 1976; Wise & Rompré, 1989).

Mediante el empleo de estrategias lesivas consistentes en interrumpir y bloquear fibras o núcleos, observando a continuación su efecto sobre la conducta instrumental, se ha comprobado que las lesiones electrolíticas del Haz Prosencefálico Medial apenas producen deterioro si son realizadas en zonas anteriores al Hipotálamo Lateral –donde se está estimulando–, mientras que las posteriores a la localización del electrodo producen un importante deterioro de la AEIC, interpretándose este hecho como indicio de que los impulsos generados en esta vía siguen una ruta descendente (Stellar & Neeley, 1982).

Con el uso de neurotoxinas, que permiten realizar lesiones específicas de cuerpos celulares, o bien de neuronas que contienen un determinado neurotransmisor, se ha observado que la destrucción de terminales catecolaminérgicas causa decrementos moderados en la tasa de AEIC, lo cual apoya la participación de estos sistemas neuroquímicos en procesos de AEIC. Por otra parte, mediante el desarrollo de las técnicas de Histología Fluorescente que permitieron identificar la distribución anatómica de las vías catecolaminérgicas, se pudo constatar la existencia de una importante superposición con respecto a los lugares donde la estimulación resulta reforzante (Wise & Rompré, 1989; Carlson, 1993; Baucó & Wise, 1994; Salamone et al., 1997; Sokolowski et al., 1998).

En el caso de la dopamina, se ha comprobado que tres de las principales vías -mesocortical, mesolímbica y nigroestriada- se superponen con las fibras del Haz Prosencefálico Medial (Weiner & Molinoff, 1994; Wise, 1994). En relación con la Noradrenalina, inicialmente se implicó a dos de las principales vías en refuerzo: los haces dorsal y ventral, pero investigaciones posteriores arrojaron resultados contradictorios pues por ejemplo, la AEIC del Locus Coeruleus, el lugar de origen de estas vías, no se ve afectada por su destrucción mediante neurotoxinas (Clavier, 1976; Crow, 1976).

Estos datos fueron complementados con estudios neurofarmacológicos, en los que se muestra una atenuación de la conducta tras la administración de neurolépticos. Estos fármacos producen, con bajas dosis, desplazamientos hacia la derecha en la curva tasa-frecuencia, que ha sido interpretada como reflejo de una acción antagónica sobre el refuerzo, y a dosis altas generan un cambio hacia abajo en la

curva, lo que puede ser índice de la aparición de alteraciones motoras. Tras la inyección de agonistas indirectos, -como por ej. anfetaminas-, se produce un desplazamiento de la curva hacia la izquierda (Gallistel & Karras, 1984; Milliaressis et al, 1986; Wise & Rompré, 1989). Finalmente se ha puesto de manifiesto la implicación de los péptidos opiáceos: la morfina facilita la AEIC en el Área Tegmental Ventral incrementando la tasa de disparo de sus células (Olds & Fobes, 1981). Dado que estas sustancias modulan la actividad de las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas a diferentes niveles sinápticos, se ha sugerido que sus efectos sobre la estimulación podrían ser indirectos y estar mediados por su actuación sobre este neurotransmisor (Wise & Rompré, 1989; Wise, 1994; 1996).

Una tercera aproximación al estudio de los circuitos cerebrales implicados en refuerzo, ha hecho uso de planteamientos neurofisiológicos. La estimación de los períodos refractarios -tiempo que necesita una neurona para volver a responder una vez que ha sido despolarizada- ha permitido determinar las características de las células y fibras del Haz Prosencefálico Medial, donde hay al menos dos subpoblaciones de neuronas: unas con períodos refractarios muy breves y, por tanto, muy rápidas en la conducción de los impulsos nerviosos y otras que lo hacen con mayor lentitud. La estimulación eléctrica actúa despolarizando fibras gruesas, mielinizadas, que descienden, al parecer, hacia el Área Tegmental Ventral y zonas caudales del mesencéfalo y tronco, cuyos cuerpos celulares se sitúan probablemente en estructuras como el Núcleo Caudado, Banda Diagonal de Broca, Área Preóptica e Hipotálamo Lateral (Gallistel, 1976; Yeomans, 1982; Wise & Rompré, 1989; Konkle et al., 1999) mientras que los axones dopaminérgicos son más delgados y siguen una ruta ascendente. Es posible entonces, que las fibras mielinizadas descendentes interaccionen a niveles mesencefálicos y troncoencefálicos y activen indirectamente a la Vía Mesolímbica a través de conexiones con interneuronas desde la zona Pedunculopontina -NTPP y NTL- hasta el Área Tegmental Ventral, las cuales podrían ser dopaminérgicas, acetilcolinérgicas o, como se ha señalado recientemente, gabaérgicas (Gallistel, 1976; Yeomans, 1982; Wise & Rompré, 1989; Yeomans et al., 1993; Yeomans & Baptista, 1997; Nakahara et al., 2001).

Finalmente, una cuestión relevante y que ha atraído la atención de numerosos autores es la referida a la relación de esta conducta con los reforzadores naturales. Muchos de los datos existentes parecen apoyar la idea de que el refuerzo inducido por estimulación eléctrica coincide con el substrato biológico de los reforzadores naturales (Wise & Rompré, 1989; White & Milner, 1992; Wise, 1996).

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Algunos de los primeros experimentos en esta línea fueron realizados por Hoebel (Hoebel, 1976), quien observó que la tasa de autoestimulación intracraneal en el hipotálamo lateral podía ser facilitada por privación de comida, o disminuida tras la ingesta, infusión intragástrica de nutrientes y otros eventos post-ingestivos como la distensión gástrica. También podía ser modulada por eventos externos como por ejemplo, estímulos gustativos y olfatorios. Además, la obesidad inducida experimentalmente redujo la tasa de AEIC y la ingesta voluntaria, mientras que la inyección de adrenalina produjo el efecto contrario. No obstante, la tasa de AEIC de otras regiones cerebrales no relacionadas con la ingesta -Área Septal- permaneció inalterada tras las manipulaciones del sistema de hambre-saciedad.

En este sentido, y mediante Registros Unicelulares, el grupo de Rolls (Burton, et al., 1976; Rolls, 1994) encontró que algunas neuronas del Hipotálamo Lateral que normalmente se activaban ante la visión de comida cuando los monos estaban hambrientos, fueron activadas también por autoestimulación eléctrica, lo cual es un dato a favor de la convergencia anatómica entre los efectos motivacionales provocados por los reforzadores naturales y la autoestimulación.

VI - MECANISMOS DE REFUERZO, ANALGESIA Y DOLOR

Tanto las Sustancias de Abuso como la Estimulación Eléctrica, son utilizadas también para el alivio del dolor en situaciones clínicas, como es el caso de la morfina –uno de los analgésicos mas potentes que se conocen y contra el cual se comparan los nuevos productos farmacológicos-, anfetaminas, cocaína, cannabis, etc. o mezclas de éstas, que potencian el efecto analgésico, reducen la sedación y mejoran el funcionamiento cognitivo de los pacientes (Melzack, 1990; Franklin, 1998; Dalal & Melzack, 1998; Altier & Stewart, 1999). En base a estos efectos, algunos autores han sugerido la hipótesis de que estas drogas producen un estado afectivo de indiferencia al dolor, o ‘analgesia afectiva’ en la que la estimulación nociceptiva no puede en provocar el estado aversivo o estresante que en condiciones normales genera (Franklin, 1998; Dalal & Melzack, 1998).

Los mecanismos clásicos de supresión del dolor –mediados por opiáceos– actúan en sentido descendente, sobre niveles troncoencefálicos y espinales. Una primera región se localiza en la Sustancia Gris Central, donde la Estimulación Eléctrica o la administración de Agonistas opiáceos, tendría como resultado la activación de un haz de fibras descendentes hacia el Rafe Magnus, que liberan neurotensina, las cuales a su vez activan conexiones serotoninérgicas descendentes en el Funículo Dorsolateral, que proyectan a las Astas Dorsales Medulares generando un efecto inhibitorio sobre las células que transmiten la información dolorosa hacia los centros superiores (Melzack, 1990, 1992; Basbaum & Besson, 1991; Proudfit & Yeomans, 1995; Fields & Basbaum, 1999). Sin embargo, este sistema, que desempeña un papel importante en la supresión del dolor breve, transitorio y bien localizado (fásico), resulta menos relevante en el dolor persistente e inescapable (tónico), ya que éste último conlleva al parecer, un componente afectivo y requiere la participación de mecanismos adicionales situados a niveles mas rostrales, como la activación de las neuronas de la Vía Mesocorticolímbica (Franklin, 1998; Pavlovic & Bodnar, 1998; Altier & Stewart, 1999; Gear et al., 1999). Esto ha llevado a formular la hipótesis anterior en términos neurofarmacológicos, planteando que el substrato neural para la ‘analgesia afectiva’ y el refuerzo se solaparían parcialmente (Le Magnen, et al., 1980; Franklin, 1998).

Los estudios llevados a cabo con animales han sido claves en este punto, aunque uno de los principales problemas planteados es la adecuación de los modelos

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

animales para reproducir el dolor clínico en humanos. Muchas investigaciones han hecho uso de estímulos nocivos que actúan a corto plazo y cuya finalización es llevada a cabo por el sujeto, dependiendo fundamentalmente de mecanismos espinales, como ocurre en el '*Tail Flick*' o 'Test del desplazamiento de la cola', en que se mide la latencia con la que el animal retira su cola, previamente introducida en un recipiente con agua caliente o respecto de alguna otra señal térmica. Puesto que el mecanismo responsable de esta conducta refleja parece estar situado a nivel medular, puede ser modulado por drogas que actúan localmente o activan el sistema descendente (Franklin, 1998; Besson, 1999; Altier & Stewart, 1999; Wall & Melzack, 1998).

Conocidas estas limitaciones, se han desarrollado otros modelos de dolor inflamatorio y neuropático, como el 'Test de la Plancha Térmica' ('*Hot Plate*') o el 'Test de la formalina'. Este último consiste en inyectar en la pata delantera del animal una solución diluída de formaldehído, que produce una reacción inflamatoria aguda de unos 5 o 10 minutos de duración, fácilmente reconocible por la aparición de repuestas estereotipadas de lamido y flexión del miembro afectado, las cuales se evalúan en una escala ordinal. Sigue después una fase de dolor tónico, de una hora de duración aproximadamente, en la que reaparecen estas conductas como consecuencia de la descarga prolongada de las fibras ascendentes de tipo A δ y C, las cuales pueden dar lugar a cambios plásticos en el SNC (Franklin, 1998; Dalal & Melzack, 1998; Porro et al., 1999; Altier & Stewart, 1999; Wall & Melzack, 1998; Besson, 1999; Lapeyre et al., 2001). Estos test son sensibles a influencias locales a nivel troncoencefálico y a modulaciones procedentes del prosencéfalo hacia el tronco y la médula espinal. Permiten poner de manifiesto el efecto de analgésicos que actúan a nivel prosencefálico y/o troncoencefálico (Franklin, 1998), como se expondrá a continuación.

Las investigaciones farmacológicas han puesto de relieve que sustancias como la dopamina, anfetaminas, cocaína y apomorfina son eficaces para inducir analgesia en el test de la formalina, pero no en paradigmas de dolor 'fásico' –'*tail flick*'–, y que este efecto puede ser bloqueado por antagonistas dopaminérgicos generales o específicos para los receptores D1 y/o D2 (Franklin, 1998; Dalal & Melzack, 1998; Altier & Stewart, 1999). En cambio, los opiáceos tienen capacidad para inducir efectos analgésicos en ambos modelos de dolor, tanto tónico como fásico: se ha visto que dosis bajas de morfina son efectivas para inhibir reacciones dolorosas en el test de la formalina mediante un mecanismo que implica a la

dopamina pero no a la serotonina y sin pasar por el Funículo dorsolateral (Franklin, 1998; Altier & Stewart, 1999). Finalmente, se han demostrado efectos analgésicos de fármacos agonistas de los receptores α_2 -adrenérgicos, cannabinoides y antagonistas NMDA. Por otro lado, el alcohol etílico es capaz de inducir analgesia moderada debido a sus interacciones con el sistema dopaminérgico mesolímbico, aunque por otro lado podría aumentar las reacciones dolorosas al interactuar con receptores GABA_A (Franklin, 1998; Altier & Stewart, 1999).

Por su parte, otras investigaciones muestran que las neuronas que se originan en el Área Tegmental Ventral y proyectan sus axones hacia el Núcleo Accumbens, además de tener un papel clave en el refuerzo, parecen formar parte de un sistema de supresión del dolor 'tónico' (Le Magnen et al., 1980; Matthes et al., 1996; Franklin, 1998; Altier & Stewart, 1999; Lapeyre et al., 2001) cuya activación puede ser provocada por microinyecciones de Sustancia P y opiáceos en el Área Tegmental Ventral, por administración de morfina a nivel sistémico, o bien por anfetaminas, que aumentan los niveles extracelulares de DA en el N. Accumbens (Franklin, 1998; Altier & Stewart, 1999).

Asimismo, diversos estudios con animales lesionados han mostrado una doble disociación en los mecanismos analgésicos a nivel del Tronco Cerebral, de modo que los animales descerebrados a nivel de la protuberancia a los que se inyecta morfina muestran analgesia en paradigmas de dolor fásico pero este no es el caso de los resultados observados en el test de la formalina. Por el contrario, las lesiones del Rafe Magnus, Sustancia Gris Central –parte caudal- o Funículo Dorsolateral eliminan el efecto en el paradigma de 'Tail Flick' pero no tienen efecto en el Test de la Formalina (Franklin, 1998; Altier & Stewart, 1999).

Pero si los estímulos reforzantes son capaces de alterar las reacciones a sensaciones dolorosas, deben de existir conexiones entre los sistemas de refuerzo prosencefálicos y los núcleos troncoencefálicos que modulan las conductas relacionadas con la estimulación dolorosa (Olmstead & Franklin, 1993; Pavlovic & Bodnar, 1998; Porro et al., 1999). Una estructura que mantiene conexiones con el Área Tegmental Ventral y el Núcleo Accumbens así como con el Bulbo Raquídeo Ventro-medial, y a su vez está ampliamente relacionada con los mecanismos de refuerzo no homeostático es el Núcleo Tegmental Pedunculopontino (Bechara & Van der Kooy, 1989; 1992a; 1992b; Bechara et al., 1992; Nader et al., 1997), pero su participación en la inducción de analgesia medida con el test de la formalina ha

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

quedado descartada (Olmstead & Franklin, 1993), lo que significa, por otra parte, que a este nivel los mecanismos de refuerzo y analgesia pueden ser disociados.

En otra serie de estudios recientes se han identificado diversas estructuras cerebrales implicadas en los mecanismos del dolor y la analgesia tales como la Formación Reticular Bulbar, Tálamo medial y lateral, Ganglios Basales, así como estructuras corticales y límbicas. A nivel del tronco se ha destacado la participación del Locus Coeruleus y áreas Pretectal Anterior y Parabraquial Lateral (Chen-Yu-Chiang et al., 1995; Porro et al., 1999). De hecho, algunas investigaciones realizadas en sujetos humanos, mostraron que la Estimulación Eléctrica de la Región Parabraquial es efectiva en el alivio de los dolores resistentes a otros tratamientos (Katayama et al., 1985; Young et al., 1992).

El Área Parabraquial, a su vez, formaría parte de un haz ascendente de transmisión de información nociceptiva, el S. Espino-(Trigémico)-Pontoamigdalóide, que se origina en diversas poblaciones neuronales procedentes de las láminas I y II de la sustancia gris medular, así como de las zonas trigeminal y paratrigeminal hasta alcanzar diversos subnúcleos parabraquiales: lateral dorsal, central, interno, 'crescent' y N. de Kolliker para las aferencias medulares y estos mismos, junto con el medial externo y otras zonas mediales para las aferencias procedentes del Trigémico (Bernard et al., 1991, 1994, 1995; Light et al., 1993; Wang et al., 1994; Saper, 1995a; Jasmin et al., 1997; Buritova et al., 1998; Craig & Dostrovsky, 1999), para proyectar finalmente hacia la Amígdala, Tálamo e Hipotálamo (Bernard et al., 1991; 1994; Saper, 1995a; Bester et al., 1995, 1997; Jasmin et al., 1997; Craig & Dostrovsky, 1999). La mayoría de estas fibras aferentes sobrepasan el Núcleo Parabraquial lateral externo -muy pocas llegan a la porción interna de este subnúcleo, solo algunas lo hacen en la parte más externa y un grupo más numeroso finaliza en la parte más ventral de este subnúcleo-, a pesar de que desde este subnúcleo parten nuevas conexiones de relevo hacia la Amígdala (N. Central), N. Lecho de la Estría Terminal, Tálamo (núcleos intralaminares) e Hipotálamo (división lateral, y ventromedial y retroquiasmática para las fibras procedentes del NPBme) (Bernard et al., 1991, 1994, 1995; Bester et al., 1995, 1997; Saper, 1995a; Jasmin et al., 1997; Craig & Dostrovsky, 1999).

Se trataría, en fin, de un sistema, o más bien, de múltiples sistemas que arrancan en paralelo desde distintas poblaciones neuronales de las astas dorsales medulares y trigeminales, transmitiendo información termorreceptiva y nociceptiva

cutánea y visceral hacia centros del prosencéfalo, involucrados en el procesamiento afectivo-emocional, autonómico y visceral de estímulos nocivos (o aversivos) mediante vías que emergen desde distintos subnúcleos parabraquiales (Bernard et al., 1991; 1994; Light et al., 1993; Saper, 1995a).

Para terminar, se ha observado que, en condiciones naturales, los eventos estresantes provocan la liberación de opiáceos endógenos y Sustancia P dando lugar a la activación del Sistema Mesolímbico (Le Magnen et al., 1980; Franklin, 1998; Altier & Stewart, 1999; Lapeyre et al., 2001), lo cual ha llevado a plantear la hipótesis de que tanto los eventos apetitivos (comida, sexo, ...) como los aversivos (estrés), -aunque opuestos en su valencia-, podrían activar mecanismos comunes que promueven la adaptación al ambiente, mediante conductas de aproximación y/o consumatorias en el caso de los primeros, o bien mediante la inhibición de respuestas ante estímulos nocivos que facilitarían el afrontamiento de situaciones de lucha o huida en el caso de los segundos (Le Magnen et al., 1980; Franklin, 1998; Altier & Stewart, 1999).

VII - IMPLICACIÓN DEL SISTEMA MESOCORTICOLÍMBICO EN LA MOTIVACION AVERSIVA

Aunque la mayoría de los estudios revisados en esta introducción apoyan la participación del Sistema Mesocorticolímbico en la motivación apetitiva, o sea, en la mediación del efecto hedónico de los reforzadores positivos (comida, agua, sexo, analgesia, drogas de abuso, AEIC,...), considerable evidencia se ha acumulado también en favor de la participación de estos sistemas cerebrales en procesos motivacionales aversivos (conductas de escape/ evitación, estrés, dolor...) (Hoebel & Novin, 1982; Salamone, 1994; Turenne et al., 1996; Besson & Louilot, 1997; Louilot & Besson, 2000; Ikemoto & Panksepp, 1999).

En efecto, los estudios realizados con técnicas de microdiálisis y voltametría muestran también un incremento en la liberación de DA del Accumbens en situaciones aversivas (Salamone, 1994; Kalivas & Duffy, 1995; Ikemoto & Panksepp, 1999; Ge et al., 1997; Besson & Louilot, 1997; Rada et al., 1998; Louilot & Besson, 2000) y, por el contrario, el descenso de los niveles de dopamina en el Núcleo Accumbens provoca un deterioro en conductas de evitación activa (Salamone, 1994). En cambio, es más controvertida su participación en paradigmas de evitación pasiva (Salamone, 1994; Ikemoto & Panksepp, 1999). Pero no es éste el único neurotransmisor implicado sino que debemos hablar de interacciones con otros sistemas neuroquímicos, pues estudios adicionales muestran que en el N. Accumbens se produce una elevación en los niveles de metabolitos resultantes de la degradación de serotonina (Ge et al., 1997) o incrementos en la liberación de acetilcolina endógena en respuesta a estimulación aversiva (Mark et al., 1995; Rada & Hoebel, 2001). Los opiáceos, como ya se ha señalado en apartados anteriores, provocan efectos aversivos cuando actúan sobre receptores κ , situados en distintas localizaciones cerebrales, incluida la vía mesocorticolímbica (Bals-Kubik et al., 1993; Shippenberg & Bals-Kubik, 1995; Herz & Spanagel, 1995).

La estimulación eléctrica del Hipotálamo puede tener efectos reforzantes o aversivos en función de la localización del extremo del electrodo, habiéndose encontrado reacciones positivas y conducta autoestimuladora en posiciones laterales, o bien, signos de aversión e incremento en las respuestas de escape de la estimulación en localizaciones mediales (Hoebel, 1976; Brandão et al., 1999).

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Por tanto, éstos y otros hallazgos favorecen la hipótesis de la participación del S. Mesocorticolímbico en procesos motivacionales apetitivos y aversivos (Hoebel & Novin, 1982; Salamone, 1994; Ikemoto & Panksepp, 1999). Sus efectos son, en parte paralelos, ya que los antagonistas dopaminérgicos deterioran ambos tipos de conductas motivadas en un rango de dosis parecidas y con un patrón temporal muy similar, independientemente del paradigma utilizado, pero sin afectar al control discriminativo de los estímulos externos. Además afecta a conductas preparatorias o de evitación más que a reacciones consumatorias/ de escape. Sin embargo, es lógico y asumible pensar que no todos los aspectos de las conductas apetitiva y aversiva sean idénticos, así como que pueden existir circuitos o subregiones específicamente involucradas en unos u otros efectos de manera independiente (Salamone, 1994).

Algunos autores han interpretado estos datos como reacciones adaptativas del organismo y han reconceptualizado estos hechos en sentido positivo, como ‘alivio respecto a situaciones de peligro/aversivas’, ‘búsqueda de seguridad’ y facilitación de respuestas flexibles de aproximación / huída (Rada et al., 1998; Ikemoto & Panksepp, 1999). En definitiva, el refuerzo negativo ocurre por desaparición o alivio de un estado aversivo preexistente, que puede ser provocado por distintos motivos: por ejemplo, una historia de circunstancias ambientales adversas, estrés, etc. que podrían aumentar el riesgo de abuso de drogas, o bien la dependencia de estas sustancias en individuos adictos; todo ello conllevaría la aparición de cambios fisiológicos tales como activación del Eje Hipotalámico-Hipofisiario-Adrenal, liberación de glucocorticoides en la sangre, activación del S.N. Simpático y sobreactivación patológica de los Sistemas cerebrales de ‘arousal’, emoción y refuerzo (Sinha, 2001; Kreek & Koob, 1998; Koob & Le Moal, 2001).

Se tiene conocimiento de que las situaciones de estrés producen co-activación de mecanismos cerebrales relacionados con esta conducta –algunos de los cuales han sido citados anteriormente- y sistemas involucrados en refuerzo/recompensa, de manera simultánea, proporcionando un substrato neural común que podría explicar la vulnerabilidad para el abuso de drogas, la búsqueda compulsiva de estas y la tendencia a las recaídas (Kalivas & Duffy, 1995; Salamone, 1994; Salamone et al., 1997; Kreek & Koob, 1998; Sinha, 2001; Koob & Le Moal, 2001).

Adicionalmente, los experimentos de condicionamiento que hacen uso de sustancias psicoactivas muestran que estas drogas son capaces de inducir preferencias en paradigmas de aprendizaje espacial -‘Place Preference’- y aversiones

en tareas de aprendizaje interoceptivo -‘*Conditioned Taste Aversion*’-, pero aun no se sabe ciertamente el por qué de la predisposición para estos tipos de asociaciones (Turenne et al., 1996; Grigson, 1997). Por otro lado, los estudios que pretenden investigar los substratos neurales que median estos efectos condicionados de las drogas y otros estímulos naturales han puesto de manifiesto que algunos componentes clave del sistema de Refuerzo/Recompensa cerebral como la Amígdala, el N. Accumbens y sus conexiones con el Hipotálamo lateral, están involucrados en procesos de Condicionamiento de estímulos tanto apetitivos como aversivos (Salamone, 1994; Salamone et al., 1997; Sinha, 2001; Parkinson et al., 1999; Louilot & Besson, 2000; Fenu et al., 2001). Aunque los primeros estudios que pretendían estudiar la posible relación de estos mecanismos con aprendizajes de tipo asociativo no fueron del todo concluyentes -a pesar de la revisión de la hipótesis hedónica de la DA cerebral para incluir aspectos de incentivo- (Mark et al., 1989), recientes investigaciones han implicado a estas estructuras en Condicionamiento Aversivo Gustativo (Fenu et al., 2001).

El Aprendizaje Aversivo Gustativo (AAG) es un paradigma de aprendizaje y memoria dado a conocer inicialmente por el psicobiólogo norteamericano John García en 1955, pero que hoy día es considerado como una modalidad adquisitiva ‘especial’. Consiste básicamente en el hecho de que los sujetos aprenden a evitar la ingestión de una sustancia previamente asociada con la administración de un producto generador de malestar -de carácter visceral principalmente-, como por ejemplo, cloruro de litio, o bien con tratamientos eméticos tales como irradiación o rotación corporal (Yamamoto et al., 1992; Yamamoto & Fujimoto, 1991; Yamamoto, 1993; Spector et al., 1992; Reilly et al., 1993; Gu et al., 1993; Gallo y Puerto, 1986; Gallo et al., 1991; Agüero et al. 1993a; 1993b; Sakai & Yamamoto, 1997; 1998). Sin embargo, -como antes se ha mencionado-, también pueden funcionar como estímulos nocivos algunas drogas que actúan directamente sobre el substrato cerebral del refuerzo -anfetaminas, cocaína apormorfina, etanol, nicotina, morfina, etc...- (Molina & Puerto, 1981; Puerto & Molina, 1980a; Bechara et al., 1993; Parker & Carvell, 1986; Parker, 1991; Gamzu, et al., 1985; Sakai & Yamamoto, 1997; Bures et al., 1998; Welzl et al, 2001).

En este tipo de aprendizaje, que ha sido ampliamente estudiado en nuestro laboratorio, convergen una serie de características que lo hacen especial y

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

diferenciable de los modelos conductistas E-R o de Condicionamiento Clásico: 1) Se suele adquirir en un solo ensayo y es muy resistente a la extinción, 2) Admite largas demoras entre los estímulos, y 3) establece asociaciones preferentes de determinados estímulos con determinadas consecuencias -Estímulos gustativo-olfatorios / malestar gastrointestinal- violando el principio de equipotencialidad estimular (Molina & Puerto, 1981; Puerto & Molina, 1980a; García et al., 1985; Domjan, 1985; Bures et al., 1998; Welzl et al, 2001; Mediavilla et al., 2001b).

El hecho de que se pueda adquirir en un *único ensayo* no es una característica exclusiva de esta modalidad de aprendizaje. También se ha logrado en tareas de Condicionamiento Clásico de Evitación -por ej. en miedo condicionado- (Domjan, 1985; Domjan & Burkhard, 1990; Bures et al., 1998; Welzl et al, 2001), aunque casi siempre suelen ser conductas específicas de la especie. O sea, en manifestaciones comportamentales por las cuales existe predisposición biológica. Lo peculiar y exclusivo de este aprendizaje es que puede ser inducido cumpliendo aquellas características, es decir, cuando todas ellas están presentes simultáneamente.

Así, es posible conseguirlo cuando se intercala al mismo tiempo una amplia *demora* entre los estímulos (Gallo et al., 1990), al contrario de lo que sucede en la mayoría de los modelos de aprendizaje. Se han propuesto varias hipótesis para explicar estos hallazgos relacionados con la variable temporal:

-Según la Teoría de la Interferencia Concurrente, el establecimiento de asociaciones depende de la ausencia de estímulos interfirientes durante el intervalo de demora, que puedan llegar a ser asociados con el estímulo Visceral. Sin embargo, no permite explicar por qué los animales siguen ingiriendo su alimento diario, introducido entre el estímulo gustativo y el aversivo (Puerto & Molina, 1980a; Molina & Puerto, 1981; Domjan, 1985).

-Para los defensores de la Teoría Periférica de los Post-Efectos Gustativos, el estímulo gustativo permanece durante largo tiempo estimulando el Sistema Orofaringeo y Gastrointestinal, con lo cual no existiría tal demora. Diversos estudios experimentales han refutado este planteamiento: por ejemplo, se han logrado aversiones tras aspirar los restos de comida (Deutsch, et al., 1976). Más aún, la manipulación de ciertas estructuras cerebrales interrumpe específicamente aquellos aprendizajes en los que se introducen largas demoras entre los estímulos (Gallo &

Puerto, 1986; Gallo et al., 1990; Agüero et al., 1993a), contrariamente a lo que postulan las hipótesis basadas exclusivamente en señales de índole periférica.

-Otros autores han desarrollado la idea de 'memoria de huella'. Según esta hipótesis, el establecimiento de asociaciones viscerogustativas ocurre dentro de un gradiente de aprendizaje que está en relación inversa con respecto al intervalo inter-estimular, retomando la idea clásica de 'decaimiento de los trazos de memoria'. La presentación de un sabor da lugar a la formación de una representación neural o trazo de memoria que decae lentamente con el paso del tiempo, pero ciertos eventos (por ejemplo, toxicidad del estímulo nocivo) pueden actuar como claves de recuperación para este trazo de memoria asociado al estímulo gustativo. Por tanto, el condicionamiento depende de la fuerza de los trazos de memoria, del momento de la recuperación y de la efectividad de un evento como clave de recuperación para la representación neural del estímulo gustativo (Domjan, 1985).

-Por otro lado, en el medio natural, resultan especialmente adaptativos aquellos mecanismos de adquisición de asociaciones gustativo-visceral que permiten a los animales transferir este aprendizaje a nuevas situaciones estimulares, pues posibilita que éstos puedan anticiparse a situaciones potencialmente peligrosas. Pero en otras ocasiones, la supervivencia podría depender principalmente de la rapidez con que se detecta la presencia de una sustancia tóxica, para poner en marcha reacciones reflejas y automatizadas de evitación. En este sentido, actualmente la mayoría de los autores defienden la idea de que existen diferentes modalidades de aprendizaje y memoria, que podrían funcionar en paralelo respecto a un mismo tipo de material, dependiendo de las circunstancias en las que tiene lugar la adquisición / retención de información acerca de determinados estímulos (Reber et al., 1996; Eichembaum, 2002). En este sentido, las investigaciones realizadas en nuestro laboratorio por Mediavilla y colaboradores proponen la existencia de dos tipos de aprendizaje interoceptivo, denominados respectivamente, secuencial y concurrente, que permiten operar en circunstancias diferentes y adquirir distintos tipos de información, los cuales se corresponderían con las situaciones anteriormente descritas, a saber, el aprendizaje secuencial es flexible y admite demoras, mientras que el concurrente supone que el animal debe dar una respuesta en las mismas condiciones en las que aprendió y requiere contigüidad (Mediavilla et al., 2001b). Estos autores, además, aportan datos respecto a la participación diferencial de estructuras cerebrales y conexiones neurales en uno y otro tipo (Agüero et al., 1993a; 1993b; 1997; Arnedo et al., 1990; 1991;

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

1993; Gallo et al., 1988; 1990; 1991; Mediavilla, 1995; Mediavilla et al., 1999; 2000; 2001a; 2001b).

Finalmente, con respecto a la *especificidad estimular*, se ha observado que los animales poseen predisposiciones genéticas para establecer ciertos tipos de asociaciones con más facilidad que otras, sobretodo si son esenciales para la supervivencia (Bures et al., 1998; Welzl et al, 2001). En este sentido, algunos investigadores han propuesto que la organización cerebral en los vertebrados revela la existencia de dos mecanismos defensivos especializados, que han evolucionado en función de presiones selectivas: uno tendría como función proteger la periferia corporal de los ataques externos, según el cual los individuos tienden a asociar selectivamente estímulos nociceptivos con daño externo. Por otra parte, el AAG serviría para preservar el sistema gastrointestinal de la acción de productos nocivos, que tiende a relacionar sabores con malestar visceral. Otros sistemas como el visual y olfatorio podrían participar de ambos (García et al., 1985).

Por otro lado, aunque no todos los estímulos son igualmente condicionables, una característica relevante del estímulo gustativo que facilita su asociación con el malestar –aunque no resulta imprescindible- es la 'novedad' (Dogteron & Van Hoff, 1988; Bures et al., 1998; Welzl et al, 2001). En este sentido, es bien conocido que los animales muestran ciertos reparos a la hora de ingerir sustancias nuevas, y este hecho tiene un significado adaptativo claro, que evitaría que se ingieran grandes cantidades de sustancias potencialmente peligrosas.

Si nos centramos en las consecuencias motivacionales de este tipo de aprendizaje, no se tiene conocimiento cierto sobre cuales son las razones específicas que llevan al organismo, tras haber experimentado malestar gástrico, a rechazar el estímulo gustativo en posteriores encuentros con él, ni qué cambios concretos produce este aprendizaje, aunque por razones filogenéticas podemos deducir que todos los productos que generan malestar gástrico, han sido ingeridos y saboreados previamente por los individuos, con lo cual, la asociación entre ambos eventos es estrecha (Bolles, 1985).

-Una posibilidad apunta a que las reacciones post-ingestivas del estímulo visceral podrían compartir elementos comunes con los mecanismos responsables del cese de la ingesta en condiciones normales, dado que hay autores que sostienen que la saciedad es, en cierto sentido, una forma de malestar (Toates, 1989; Booth, 1985).

-Sin embargo, Deutsch aporta pruebas a favor de que, mientras en el caso de los alimentos familiares, el estómago desempeña un papel clave en la inducción de saciedad, con respecto a los estímulos gustativos novedosos, hay un predominio de los factores orosensoriales (Deutsch & González, 1980; citado por Deutsch, 1990). Además, investigaciones recientes han mostrado que los animales saciados pueden manifestar preferencia por lugares asociados con la presencia de comida, aunque no la ingieren (Bechara & Van der Kooy, 1992a). Por tanto, es ésta una argumentación concluyente en contra de la equiparación de saciedad y malestar / aversión.

-En relación con la idea anterior, hay autores que sugieren que, tras el aprendizaje se produce un cambio en la 'palatabilidad' del estímulo gustativo. Mediante el Test de Reactividad Gustativa ideado por Norgren y en pruebas de aprendizaje aversivo, se observó una reducción progresiva de las reacciones ingestivas y un aumento de las respuestas de rechazo hacia el sabor (Parker & Carvell, 1986; Parker, 1991). A la base de estos cambios en 'palatabilidad' se han observado fluctuaciones de la actividad opiácea endógena, que, también, dentro de un '*contínuum*', se han relacionado con reacciones al dolor, malestar, agresión y estimulación aversiva (Le Magnen, 1992). Finalmente, toda esta serie de manifestaciones conductuales pueden ser inducidas mediante estimulación eléctrica intracerebral (Carlson, 1993).

En conclusión, la adquisición de aversiones gustativas se extiende hacia una amplia gama de productos tóxicos y no tóxicos y en múltiples especies (García et al., 1985; Bielavska & Bures, 1994; Sakai & Yamamoto, 1997; Bures et al., 1998; Welzl et al., 2001). Requieren la puesta en marcha de procesos fisiológicos centrales específicos de la especie, generalmente de carácter adaptativo (García et al., 1985; Bures et al., 1998; Welzl et al., 2001). Y no parecen constituir un fenómeno aislado, sino que pueden ser integradas dentro del amplio contexto de la selección de la dieta, balance energético, regulación calórica y refuerzo nutritivo (Bolles, 1985; Salamone, 1994).

Desde un punto de vista teórico, se ha postulado que para el establecimiento del Aprendizaje Aversivo Gustativo se requiere la convergencia anatómica de información gustativa y visceral en algún lugar del SNC (García et al., 1985). Posiblemente no se trate de un único centro, sino más bien de una red de estructuras

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

interconectadas entre sí y especializadas en la formación de asociaciones, cada una de las cuales podría hacer aportaciones específicas al aprendizaje (Mishkin & Appenzeller, 1987). Pero, el SNC debe contar con información sensorial procedente de la periferia, que sigue una ruta similar a la descrita para el Aprendizaje de Preferencias Gustativas, tratada en un capítulo anterior de esta Introducción:

La información gustativa procedente de la cavidad bucal y la lengua alcanza la zona gustativa del Núcleo del Tracto Solitario (NTS) a través de los Nervios Craneales Facial, Glossofaríngeo y Vago (VII, IX y X). Proyecta fundamentalmente a la parte rostral de este núcleo (NTSr), cuyo siguiente relevo anatómico es el Núcleo Parabraquial medial (NPBm) y se dirigen hacia posiciones más rostrales siguiendo dos trayectorias distintas (Norgren & Leonard, 1971; Norgren, 1990; Kiefer, 1985; Bures et al., 1998; Reilly, 1999; Welzl et al., 2001): Una parte de estos haces pasa a través de estructuras diencefálicas y límbicas, como el Hipotálamo Lateral (HTL) y la Sustancia Innomiada (SI) (Fulwiler & Saper, 1984; Halsell, 1992; Bures et al., 1998; Welzl et al., 2001). Otras fibras se dirigen al Tálamo Medial, para después finalizar en la corteza gustativa -parte facial de la corteza somatosensorial y zona ventral de la corteza insular agranular- (Fulwiler & Saper, 1984; Norgren, 1990; Dunn & Everitt, 1988; Bures et al., 1998; Welzl et al., 2001). Adicionalmente se ha comprobado la existencia de conexiones directas NPB-Corteza Insular (Di Lorenzo & Monroe, 1992).

Por su parte, las señales viscerales son transmitidas al SNC a través dos posibles rutas alternativas, corriendo después en paralelo respecto a la información gustativa en varios niveles –NTS, NPB, Tálamo Medial, Amígdala y Corteza Insular- (Welzl et al., 2001):

El sistema digestivo posee receptores de diversa naturaleza -mecánicos, químicos, etc.- (Grundy et al., 1994; 1995), inervados por el Vago (aunque también por algunos nervios de la Cadena Simpática -espláncnicos-), cuyo primer relevo se sitúa en el NTS medial y caudal (Yuan & Barber, 1991), enviando proyecciones hacia el NPB (Fulwiler & Saper, 1984; Halsell, 1992). La otra vía de detección y transmisión de información visceral al SNC es el sistema circulatorio, de acción más lenta. El Área Postrema, zona privilegiada por la presencia de receptores especializados en la detección de sustancias tóxicas circulantes en la sangre y donde la Barrera Hematoencefálica es débil, recibe estas señales y las transmite al NPB lateral (Kiefer, 1985; Lança & Van der Kooy, 1985; Papas y Ferguson, 1990).

El *Tálamo medial* recibe también fibras que procesan información visceral (Halsell, 1992; Saleh & Cechetto, 1993). Sin embargo, aunque las lesiones de esta zona producen deterioros importantes en el procesamiento de las señales gustativas, su participación en el aprendizaje no parece fundamental (Lasiter, 1985; Bures et al., 1998; Welzl et al., 2001).

La *Corteza Insular* es una zona receptiva de información gustativa y visceral (Fulwiler & Saper, 1984; Di Lorenzo & Monroe, 1992; Bures et al., 1998), que posee conexiones recíprocas con la amígdala, el tálamo dorsomedial y la corteza prefrontal, pero los resultados respecto a su participación en AAG han sido poco concluyentes: Lesiones neuroquímicas o por aspiración atenúan la adquisición del Condicionamiento (Dunn & Everitt, 1988; Kiefer & Orr, 1992), que fue bloqueado mediante depresión propagada (Gallo y Bures, 1991) -no obstante, este último tratamiento puede resultar aversivo, obscureciendo los resultados (Dunn & Everitt, 1988)-. Algunos autores han sugerido que tras las lesiones de la Corteza Insular, los animales pueden aprender la asociación sabor-malestar, pero no son capaces de realizar el cambio hedónico del estímulo gustativo. Y al no percibirlo como desagradable, su rechazo les resulta muy dificultoso (Kiefer & Orr, 1992; Bures et al., 1998; Welzl et al., 2001).

En lo que se refiere al Sistema Límbico, la *Amígdala* ha sido la estructura más consistentemente asociada con AAG, y, de forma específica, la zona Basolateral, ya que mediante la realización de lesiones electrolíticas se logró interrumpir la adquisición y retención del aprendizaje así como la conducta neofóbica (Gaston, 1978; Dunn & Everitt, 1988). Posteriormente, el uso de neurotoxinas ha generado resultados contradictorios: en unos casos apenas produce deterioro en el condicionamiento (Dunn & Everitt, 1988) mientras que en otros experimentos se ha observado una interrupción (Yamamoto & Fujimoto, 1991). Estas discrepancias podrían ser explicadas en función de diferencias metodológicas relativas a la amplitud de la zona destruida y/o al intervalo temporal, pues, en el procedimiento demorado empleado por Yamamoto, se intercala un período de 20 minutos entre el estímulo gustativo y el visceral, a diferencia del primer estudio citado, en que el estímulo visceral podría hacer uso de una ruta alternativa, vagal. En cualquier caso, se ha sugerido que el papel de esta estructura podría ser indirecto, modulando las respuestas emocionales (Dunn & Everitt, 1988; Yamamoto, 1993).

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Estudios recientes, usando técnicas de voltametría, han logrado demostrar un aumento en los niveles de DA extracelular del *N. Accumbens shell* en respuesta a estímulos aversivos gustativos u olfatorios tras un procedimiento de Aprendizaje Interoceptivo (Besson & Louilot, 1995; Louilot & Besson, 2000), así como un deterioro en la formación de este tipo de Aprendizaje tras la administración de antagonistas de los receptores D1 en esta misma localización cerebral (Fenu et al., 2001), conocida por su participación clave en el Circuito de Refuerzo/Recompensa cerebral (Di Chiara, 1998; Koob & Le Moal, 2001). El Núcleo Accumbens '*shell*', - que mantiene conexiones con las zonas Basolateral y Central de la Amígdala-, recibe información gustativa procedente de la Corteza Insular agranular y hace uso de esta información para modular el efecto que esta estructura ejerce sobre las proyecciones descendentes hacia el NPB y NTS, con lo cual, según la interpretación que hacen Di Chiara y su grupo, podría ser el substrato por el cual el trazo de memoria para el Estímulo Gustativo quedaría disponible para ser asociado con las consecuencias biológicas (post-ingestivas) que de él se derivan, independientemente de la valencia motivacional (Fenu et al., 2001).

A nivel del *Tronco Cerebral* se produce cierto grado de convergencia entre la información gustativa y visceral. Los estudios clásicos realizados por Grill y Norgren pusieron de manifiesto que los animales descerebrados a nivel supracolicular fueron capaces de mostrar patrones elementales de integración gustativa respecto al estado calórico, aunque no lograron adquirir aprendizaje de aversión al sabor (Grill & Norgren, 1978a;1978b; Grill, 1985; Kiefer, 1985), lo cual subscribe una vez mas la importancia de estructuras prosencefálicas como por ejemplo, la Amígdala y la Corteza Gustativa en este tipo de aprendizaje asociativo (Sakai & Yamamoto, 1998; Reilly, 1999). Según el principio básico de organización jerárquica del SNC, los componentes reflejos del gusto y el malestar visceral se localizarían en los niveles inferiores, mientras que las estructuras rostrales tendrían la capacidad de aportar nueva información que permita al organismo elaborar una respuesta más compleja y adaptativa ante una comida particular.

La administración de diversos productos aversivos -CILi, CINa- ha dado lugar a la activación de diversas áreas troncoencefálicas (Hochstenbach et al., 1993; Yamamoto et al., 1992; Kobashi et al., 1993; Gu et al., 1993; Swank & Bernstein, 1994). Aunque los resultados no han sido explícitos con respecto a si esta activación se lleva a cabo a través de una ruta nerviosa y/o humoral, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que el eje vagal y el Área Postrema no

son sistemas redundantes en la inducción de AAG (Arnedo et al., 1990; 1991; 1993). La participación de uno u otro, depende de las características del estímulo visceral, de la ruta de administración y de las demandas temporales de la tarea: El Vago (eje gástrico-vagal-NTSc-NPBm) es crítico cuando la asociación víscero-gustativa requiere del rápido procesamiento de ambos estímulos, mientras que el Área Postrema (AP-NPBl) lo es siempre que haya importantes demoras temporales. De este modo, puede darse el caso de que una misma sustancia -CINa, CILi- actúe siguiendo rutas alternativas (Gallo et al. 1988; 1989; 1991; Arnedo et al., 1990; 1991; 1993).

De forma paralela, diversas drogas de abuso (cocaína, morfina, anfetaminas, etanol...) son capaces de inducir inmunorreactividad c-fos en determinadas zonas del Tronco, y, por ejemplo, en el NPB lateral externo (Li & Rowland, 1993; 1995; Sakai & Yamamoto, 1997), de forma parecida a como lo hacen otras sustancias eméticas y/o tratamientos generadores de malestar, en un rango de dosis similar a las que generan conducta de autoadministración, habiéndose planteado la posibilidad de que activen zonas de procesamiento visceral concomitantemente a su efecto sobre mecanismos de refuerzo (Sakai & Yamamoto, 1997).

Por tanto, la controversia se ha centrado particularmente en el Área Parabraquial, la cual, además de recibir información gustativa procedente del NTS rostral (Norgren, 1990; Norgren & Leonard, 1971), constituye el segundo relevo de la información visceral antes de ser procesada por estructuras mesencefálicas y diencefálicas (Fulwiler & Saper, 1984; Halsell, 1992; Kiefer, 1985; Lança & Van der Kooy, 1985; Papas y Ferguson, 1990). Es un substrato cerebral crítico en la mediación de los efectos aversivos de la morfina en AAG (Bechara et al., 1993), además de poseer receptores δ y κ (Wolinsky et al., 1994), cuya activación –en el caso de estos últimos-, por parte de opiáceos endógenos, se sabe que provoca efectos aversivos relacionados con su interacción con los mecanismos de refuerzo (Bals-Kubik et al., 1993; Shippenberg & Bals-Kubik, 1995; Herz & Spanagel, 1995).

Además, investigaciones anatómicas y fisiológicas han comprobado de forma específica que una zona intersticial de este Complejo -denominada '*waist*'- recibe fibras superpuestas procedentes de ambas divisiones del NTS (rostral-caudal). Mas aún, se ha sugerido que a través de tales neuronas, el 'input' visceral podría ejercer un papel modulador sobre las percepciones gustativas (Hermann & Rogers, 1985). En este sentido, distintas lesiones de la región parabraquial y sus conexiones alteran la

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

adquisición de las diversas modalidades de Aprendizaje Aversivo Gustativo (Agüero et al., 1993a; 1993b; Mediavilla, 1995; Mediavilla et al., 2000; Yamamoto, 1993).

VIII- EL COMPLEJO PARABRAQUIAL: CITOARQUITECTURA Y CONEXIONES

El Área Parabraquial es un complejo neuronal que rodea al Pedúnculo Cerebeloso Superior (PCS) a lo largo del Puente, el cual lo divide en dos partes: medial y lateral. Junto a éstas, la extensión ventrolateral conocida como "Núcleo de Kolliker" también se considera parte integrante de tal estructura (Ver Figs. 1 y 2 de este apartado).

Se han logrado distinguir hasta catorce subnúcleos diferentes en función de la forma y distribución de las células así como de sus conexiones aferentes y eferentes y del tipo de neurotransmisores que liberan en dichas sinápsis (Fulwiler & Saper, 1984; Paxinos & Watson, 1996).

Área Parabraquial Medial:

Las células del *Núcleo Parabraquial Medial* (NPBm) son heterogéneas en tamaño y morfología, pero se pueden distinguir fácilmente de las neuronas colinérgicas más grandes que forman el núcleo Pedúnculo-Pontino. Ocupan una posición ventral y medial respecto al PCS, bordeadas en su parte inferior por el Tegmento Pontino y lateralmente por el Lemnisco Lateral (Ver figs. 1 y 2).

Morfológicamente se pueden distinguir tres tipos de células: una población de neuronas, pequeñas y redondeadas de unas doce micras de diámetro, se localiza en los 2/3 caudales del núcleo, las cuales se distinguen bien de otro cúmulo menor de células fusiformes o multipolares de mayor tamaño, en una posición horizontal. Estas últimas también se han encontrado en los 2/3 caudales pero concentradas principalmente en el borde ventro-lateral. Finalmente, otra población de neuronas poligonales se encuentra diseminada por el tercio rostral. Una excepción a esta heterogeneidad lo constituye el subnúcleo medial externo, de neuronas multipolares con largos axones orientados horizontalmente. Forma una estrecha banda que se interpone entre el núcleo de Kolliker y el Pedúnculo Cerebeloso Superior (Fulwiler & Saper, 1984; Davis, 1991).

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

El NPBm, junto con la región conocida como '*waist*' ('cintura') y el NPBm externo reciben fibras aferentes (Ver fig. 3) procedentes fundamentalmente del polo rostral del NTS, constituyendo el principal relevo de la información gustativa hacia estructuras más rostrales (Fulwiler & Saper, 1984; Norgren & Pfafmann, 1975; Herbert et al, 1990; Di Lorenzo & Monroe, 1997; Nishijo & Norgren, 1997; Halsell & Travers, 1997).

El NPBm es también lugar de terminación de fibras vagales, implicadas en el procesamiento rápido de sustancias tóxicas, tal como se ha puesto de manifiesto en estudios electrofisiológicos (Hermann & Rogers, 1985) y conductuales (Agüero & Puerto, 1986; Agüero et al., 1993a; 1993b) .

Estas neuronas mediales mantienen una organización funcional estructurada respecto a su sensibilidad gustativa (Halsell & Frank, 1992; Nishijo & Norgren, 1997; Halsell & Travers, 1997). En efecto, los grupos celulares con patrones de respuesta similares ante estímulos gustativos simples o complejos se disponen unos a continuación de otros, a lo largo de un '*continuum*', para facilitar las funciones de integración. Asimismo tienden a preservar el patrón temporal de los impulsos aferentes (Yamada et al., 1990; Halsell & Frank, 1992; Halsell & Travers, 1997) lo cual es indicativo de que se está llevando a cabo un procesamiento de tipo sensorial. Estos hallazgos no resultan sorprendentes a la luz de los conocimientos actuales en materia de arquitectura y funciones cerebrales, que van en apoyo de un modelo de procesamiento en paralelo o en cascada, como ha sido propuesto para otros sistemas sensoriales -por ejemplo la visión (Zeki, 1995)-.

El NPBm también es lugar de finalización de haces nerviosos aferentes con origen en diversas áreas del prosencéfalo basal -N. Central de la Amígdala, S. Innominada y N. Lecho de la Estría Terminal-, así como de la Corteza Insular posterior (Moga et al., 1990; DiLorenzo & Monroe, 1992).

Las fibras eferentes se dirigen hacia diversas estructuras mesencefálicas y diencefálicas (Fig. 4):

Las conexiones con el Hipotálamo son amplias y extensas, con la única excepción de los Cuerpos Mamilares, pero es a la zona posterior del Hipotálamo Lateral a donde van a terminar, fundamentalmente, las fibras parabraquiales mediales (Fulwiler & Saper, 1984; Ferssiwi et al., 1987; Bester et al., 1997).

Prácticamente toda la parte medial envía fibras nerviosas hacia el Complejo Ventrobasal del Tálamo, -que ha sido identificado como área receptiva gustativa-, sobre todo a la parte más ventral (Fulwiler & Saper, 1984; Halsell, 1992; De la Calle & Saper, 2000).

Otros haces procedentes de la región parabraquial medial así como del área conocida como '*waist*' (cintura) -una zona que comprende la parte dorsal del NPBm y el NPB lateral ventral, solapándose parcialmente con el PCS- terminan en la Amígdala Basolateral (BLA), Corteza Amigdalina (CoA) y parte medial del Núcleo Central de la Amígdala (CeM) (Bernard et al., 1993), aunque otros autores han observado que el número de proyecciones mediales hacia las divisiones lateral (CeL) y Medial (CeM) de la zona central amigdalina es prácticamente similar (Halsell, 1992).

Es significativo el grupo de axones procedentes de neuronas multipolares caudo-mediales así como del subnúcleo medial externo (NPBme), que se dirige a la corteza lateral frontal, insular e infralímbica y que además establecen conexiones con regiones septo-olfatorias (Fulwiler & Saper, 1984; Halsell, 1992; Bernard et al., 1991; De la Calle & Saper, 2000).

Finalmente, otras zonas de proyección eferente incluyen la Sustancia Innominada, Globo Pálido ventral, Área Subestriada, Fundus Striatum y Zona Incierta (Fulwiler & Saper, 1984; Bernard et al., 1993; Alden et al., 1994). En sentido descendente, se han encontrado proyecciones desde el NPBm hacia el NTS, Formación Reticular Bulbar dorsal al Núcleo Ambiguo y Parte medial del N. Espinal Trigeminal (Hayakawa et al., 1999).

Área Parabraquial Lateral:

Por su parte, el *Núcleo Lateral* comienza rostralmente con un grupo de células pequeñas y diseminadas, dorsales al PCS y ventrales al núcleo Cuneiforme (figuras 1 y 2). En el punto en el que el Acueducto de Silvio se ensancha para formar el IV Ventrículo estas neuronas se abren hacia los bordes colindando con el núcleo dorsal del Lemnisco Lateral (Fulwiler & Saper, 1984; Moga et al., 1990; Herbert & Bellintani-Guardia, 1995).

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Consta de varios grupos homogéneos de células, fácilmente distinguibles por su morfología y/o distribución espacial (Figuras 1 y 2):

a) La subdivisión principal es el Núcleo Parabraquial Lateral Superior, formado por neuronas multipolares o piramidales de tamaño mediano, las cuales se extienden dorsalmente en el nivel en que el Colículo Superior se separa del puente.

b) El Núcleo Parabraquial Lateral Interno, de células redondeadas ocupa una posición más medial y caudal que el anterior.

c) El Subnúcleo Parabraquial Lateral Central es el de mayor tamaño y ocupa la mayor parte de la superficie dorsal del PCS en los dos tercios rostrales del Parabraquial (NPB). Está compuesto por neuronas ovoides o fusiformes, ventrolaterales a la Sustancia Gris Central y cuyo límite caudal es la zona en que el ensanchamiento lateral del Pedúnculo Cerebeloso Superior hace contacto con el lado dorsal de la Protuberancia. El extremo más ventrolateral de este subnúcleo ha sido denominado NPB lateral '*crescent*' ('creciente').

d) La División Parabraquial Lateral Ventral consiste en una banda de células situadas en el límite dorsal del PCS, solapándose parcialmente con él, y extendiéndose hacia la superficie ventral del núcleo lateral central, de gran densidad.

e) Otro cúmulo neuronal más pequeño, lo constituye el Núcleo Parabraquial Lateral Dorsal, limitado dorsalmente por el Tracto Espinocerebelar ventral y ventralmente por el núcleo Central.

f) y g) Finalmente, en el extremo más lateral se sitúan, según Fulwiler y Saper, otros dos agrupamientos: los subnúcleos parabraquiales laterales Externo y Extremo, de células multipolares algo mayores en tamaño (Fulwiler & Saper, 1984). A pesar de estar constituidos por neuronas del mismo tipo, los límites entre ambos son fácilmente distinguibles ya que el conjunto 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 & Saper, 1984; Moga et al., 1990). Sin embargo, otros neuroanatomistas no establecen tal distinción, considerando a ambos como un solo agrupamiento (Paxinos & Watson, 1996; Swanson, 1992).

En relación con el Núcleo Parabraquial Lateral Externo (NPBLE), investigaciones recientes han considerado a su vez tres subregiones: una porción Externa y otra Interna, ambas, orientadas en paralelo respecto al Pedúnculo Cerebeloso superior, y formadas por neuronas cuyas dendritas, en gran parte, se extienden en posición dorsomedial-ventrolateral respetando los límites del subnúcleo, aunque las ramas más distales exceden estos límites haciendo contacto

con otros subnúcleos parabraquiales adyacentes localizados en posición dorsal o ventrolateral. Un segundo tipo de células presentes en esta zona estaría formado por neuronas cuya arborización dendrítica se sitúa en esta misma dirección dorsomedial-ventrolateral, pero es más reducida, circunscribiéndose a los límites del subnúcleo PBI externo. Finalmente, una tercera división la constituye la porción Ventral del NPBI externo cuyas neuronas extienden sus ramificaciones perpendicularmente a las anteriores, conectando medialmente con el NPBme, lateralmente con el NPB lateral central '*crescent*', y dirigiéndose ventralmente hacia el Núcleo de Kolliker (Herbert & Bellintani-Guardia, 1995). Sin embargo, no se ha podido precisar totalmente si la triple división realizada por Herbert y Bellintani-Guardia se establece en la región abarcada por el Núcleo Parabraquial Lateral Externo descrita por Fulwiler y Saper y reflejada en la Figura 1, o bien incluiría además a la zona que aquellos autores llaman NPBI extremo y que para otros neuroanatomistas como Paxinos y Watson constituiría un solo agrupamiento, según se observa en la Figura 2 –núcleo coloreado en verde oscuro-.

Esta división parabraquial lateral, y de manera específica los subnúcleos externo y central –junto con las áreas dorsal, ventral y '*waist*', aunque en menor grado- son el lugar de finalización de haces nerviosos procedentes del Núcleo del Tracto Solitario caudal (Fulwiler & Saper, 1984; Hermann & Rogers, 1985; Herbert et al., 1990; Kobashi et al., 1993; Jia et al., 1994; Saper, 1995b) y el Área Postrema (Herbert et al., 1990; Papas & Ferguson, 1990; Lança & Van der Kooy, 1985; Yamamoto et al., 1992; Saper, 1995b), que han sido trazados con técnicas tanto anatómicas como fisiológicas (figura 3).

El polo caudal del NTS es el primer relevo de las vías que transmiten información visceral general a través del Vago y de algunos nervios de la rama Simpática -esplácnicos-, aunque un grupo reducido de fibras vagales terminan directamente en la zona lateral del NPB (Herbert et al., 1990; Yuan & Barber, 1991; Yamamoto et al., 1992; Saleh & Cechetto, 1993; Gieroba & Blessing, 1994; Karimnamazi et al., 2002). (Figura 3).

La otra conexión aferente importante parte del Área Postrema, una estructura localizada en la superficie dorsal del Bulbo y caudal al IV ventrículo. Aquí la barrera hematoencefálica es débil, lo que la convierte en una zona quimiorreceptora privilegiada para detectar cambios en la composición de la sangre y elicitar reflejos automáticos –vómito- (Lança y Van der Kooy, 1985). (Figura 3).

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Pero este complejo pontino no solo recoge aferencias procedentes de estructuras bulbares, sino que además recibe conexiones directas desde la médula (Láminas I y II), encargadas de transmitir información nociceptiva y termorreceptiva, las cuales establecen sinapsis en el NPBI interno y NPBI central, principalmente (Light et al., 1993; Yamada & Kitamura, 1992; Slugg & Light, 1994; Saper, 1995a). (Figura 3).

Las conexiones del Complejo Parabraquial Lateral con estructuras troncoencefálicas y espinales son recíprocas, pues un grupo de fibras eferentes siguen una trayectoria descendente hacia el NTS, Formación Reticular Bulbar y Bulbo Ventrolateral, Núcleos del Rafe, Complejo Nuclear Sensorial del Trigémino y Astas Dorsales Espinales –estas dos últimas reciben proyecciones procedentes casi exclusivamente del N. de Kolliker- (Fulwiler & Saper, 1984; Herbert et al., 1990; Yoshida et al., 1997). También existen proyecciones descendentes hacia motoneuronas faríngeas procedentes de la porción ventrolateral del NPB -N. de Kolliker, NPB lateral crescent y NPB lateral externo- (Hayakawa et al., 1999).

Por tanto, es ésta zona terminal del NPB (subnúcleos lateral externo y medial externo) una región de convergencia de información viscerosensorial y nociceptiva, en función de las conexiones con el NTS, A. Postrema y Astas Dorsales Medulares – ver figura 3- (Fulwiler & Saper, 1984; Herbert et al., 1990; Bernard et al., 1994; Chen-Yu-Chiang et al., 1995; Yoshida et al., 1997; Gauriau & Bernard, 2002), donde se puede encontrar una gran variedad de sistemas químicos de neurotransmisión tanto excitadores como inhibidores:

El *glutamato* es el prototipo de neurotransmisor excitador. Se han encontrado receptores del tipo GluR1 α en los subnúcleos PBI central, PBI ‘*crescent*’, N. de Kolliker y área de ‘*waist*’, y GluR2/3 en el NPBI externo, donde podrían desempeñar un papel importante en las reacciones conductuales y emocionales ante estímulos dolorosos (Chamberlin & Saper, 1995; Guthmann & Herbert, 1999).

Otros estudios recientes han puesto de manifiesto que la inyección de un marcador retrógrado en la zona Parabraquial Lateral provoca inmunorreactividad para los neurotransmisores inhibidores *GABA* y *Glicina*, en las neuronas de las láminas I, II y III de la sustancia gris medular (Wang et al, 2001). En base a estos resultados, los autores del citado estudio han propuesto la hipótesis de que estos

neurotransmisores podrían tener un papel regulador inhibitorio sobre la transmisión la información nociceptiva ascendente.

Además, se han localizado receptores *opiáceos* μ en cuerpos celulares y ramificaciones dendríticas de ambas subdivisiones parabraquiales, lateral y medial, relacionados, posiblemente, con la modulación del dolor, pero 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). Por otra parte, la distribución de ARN mensajero relacionado con la síntesis de opiáceos endógenos como la dinorfina y encefalinas en estas neuronas parabraquiales sigue un patrón complementario, encontrándose Pre-pro-encefalina en los subnúcleos parabraquiales laterales externo, ventral, interno y N. de Kolliker, y Pre-pro-dinorfina en los subnúcleos PBI dorsal y PBI central principalmente (Hermanson & Blomqvist, 1997; Hermanson et al., 1998), lo cual apoya la existencia de heterogeneidad funcional y química entre los distintos subnúcleos parabraquiales.

Por otro lado, se han identificado células *colinérgicas* en las vías descendentes desde el NPB lateral hacia estructuras inferiores del Tronco Cerebral, que funcionalmente, se han relacionado con regulación cardiovascular y respiratoria (Katayama et al., 1984; Herbert et al., 1990; Yoshida et al., 1997; Kubo et al., 1998).

La distribución de fibras que presentan inmunorreactividad en relación con la *dopamina* es mas extensa (Kitahama et al., 2000) de lo que en un principio se pensaba (Hunt & McGregor, 1998). En efecto, se han identificado células marcadas en el Locus Coeruleus y la S. Gris Central adyacente, pero también en el N. Parabraquial lateral -formando un plexo denso de axones-, N. Espinal del Trigémino, N. Dorsomotor del Vago, NTS y Formación Reticular Bulbar, que, al igual que en el caso anterior, podrían tener un papel regulador de funciones autonómicas y cardiovasculares.

Algunos haces de fibras que establecen sinapsis en el Núcleo Parabraquial, procedentes del Área Postrema, liberan *serotonina* como neurotransmisor (Lança y Van der Kooy, 1985). Del mismo modo, se ha visto que la Fenfluramina –un agonista serotoninérgico que se utilizó en el pasado para el tratamiento de la obesidad- es procesado principalmente en el NPBI externo -y en menor grado en el NPB medial, lateral dorsal, N. de Kolliker y N. Cuneiforme- donde podría interactuar con el Sistema Opiáceo (Li & Rowland, 1993; 1995; Li et al., 1994).

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Finalmente, se ha detectado la presencia de otros neurotransmisores en el NPBI tales como *CGRP*, *sustancia P*, *somatostatina*, *neurotensina*, *colecistoquinina*, etc. (Saleh & Cechetto, 1993; Kainu et al., 1993; De Lacalle & Saper, 2000).

Del mismo modo, se ha comprobado que determinadas estructuras localizadas a nivel diencefálico y prosencefálico son también origen de otras tantas aferencias parabraquiales:

Desde el Hipotálamo, y específicamente desde las áreas Preóptica lateral y medial, Paraventricular, Dorsomedial y Ventromedial, Lateral y N. Retroquiasmático, se envían fibras nerviosas hacia los núcleos PBI central y PBI dorsal (Moga et al., 1990; Krukoff et al., 1994), que por otra parte reciben conexiones procedentes de la corteza prefrontal lateral e infralímbica (DiLorenzo & Monroe, 1992; Moga et al., 1990).

El Núcleo Central Amigdaloides mantiene conexiones recíprocas con diversos subnúcleos parabraquiales, descendentes –hacia PBle, PBlc, PBlv, PBm y ‘waist’- y ascendentes, estableciéndose un bucle de retroalimentación entre el procesamiento de información viscerosensorial y nociceptiva ascendente así como de las reacciones emocionales, que puede ser clave en procesos de condicionamiento. (Petrovich & Swanson, 1997; De Lacalle & Saper, 2000).

Por otro lado, las *vías eferentes* (figura 4), que parten del Núcleo Parabraquial Lateral se dirigen hacia diversas estructuras anteriores como el Hipotálamo, el Tálamo y la Amígdala –anteriormente citada- (Fulwiler & Saper, 1984; Bernard et al., 1991; Alden et al., 1994; Bernard et al., 1993; Krukoff et al., 1993; Halsell, 1992; Petrov et al., 1992a; 1992b).

Concretamente, se ha podido comprobar que las fibras parabraquiales laterales proyectan a diversas zonas hipotalámicas: 1) Al Núcleo Paraventricular hipotalámico, procedentes de los subnúcleos PBI superior y PBI externo; 2) al Hipotálamo Ventromedial desde el NPBI superior, y en menor medida desde los núcleos laterales dorsal y central; 3) al Área Preóptica Medial partiendo del NPBI central –principalmente- y del NPBI externo y NPBI dorsal, en menor grado; 4) al Hipotálamo Lateral desde el NPBI superior, NPBI central y NPBI extremo, aunque también desde el NPBI dorsal y NPBI externo; 5) a la Zona Incierta, procedente del

NPBl ventral; 6) al Área Retroquiasmática, desde el NPBl superior y dorsal. 7) Finalmente, se pueden observar conexiones mas difusas entre los núcleos parabraquiales laterales y otras dos áreas hipotalámicas: las zonas Subfornical Tuberal y Dorsomedial (Fulwiler & Saper, 1984; Bernard et al., 1991; Alden et al., 1994; Bernard et al., 1993; Krukoff et al., 1993; Halsell, 1992; Bester et al., 1997). Asimismo, se han reconocido algunas de las implicaciones funcionales de estas conexiones: Un grupo de proyecciones Parabraquiales a la Zona Ventromedial, y en menor grado al Área Retroquiasmática, Tuberal-Subfornical y Dorsomedial podrían estar relacionadas con conductas emocionales aversivas, de defensa y reacciones viscerales nociceptivas, pero también con conductas motivadas como ingesta y balance energético corporal (Bester et al., 1997). Por su parte, el grupo de fibras que conecta con el Área Preóptica Medial, Anteroventral y Núcleo Paraventricular, podría relacionarse con respuestas de regulación autonómica y neuroendocrina, de nuevo en relación con eventos nocivos o sensaciones viscerales de alteración de la homeostasis (Bester et al., 1997).

Las conexiones con el Tálamo son mas extensas de lo que en un principio se había puesto de manifiesto mediante técnicas de marcaje anterógrado y retrógrado (Kroust & Loewy, 2000). Así, se han descubierto proyecciones al Núcleo Paraventricular -en toda su extensión- y Reuniens desde los núcleos parabraquiales laterales Dorsal y Externo (Fulwiler & Saper, 1984; Halsell, 1992; Saleh & Cechetto, 1993; Krukoff et al., 1993; Kroust & Loewy, 2000); hacia los Núcleos Intralaminares, partiendo principalmente del NPBl interno, aunque también -en menor medida- desde otros subnúcleos parabraquiales mediales y laterales (Fulwiler & Saper, 1984; Halsell, 1992; Saleh & Cechetto, 1993; Krukoff et al., 1993; Kroust & Loewy, 2000). Y con el N. Caudal Ventromedial -nociceptivo- desde el NPBl lateral ventral, lateral externo y medial externo (Kroust & Loewy, 2000). Finalmente, las conexiones con el Núcleo Ventral Posterior parvicelular (VPpc) talámico, que procesa información gustativa, se realizan desde las células que rodean al Pedúnculo cerebeloso superior, incluyendo los subnúcleos mediales, 'waist', lateral ventral y lateral externo (Kroust & Loewy, 2000). En definitiva, los núcleos talámicos Intralaminares y de la Línea Media son inervados por varias subdivisiones parabraquiales, que transmiten distintos tipos de información (nociceptiva, gustativa y visceral general), como parte de un sistema sensorial ascendente que conecta con áreas corticales y límbicas, cuyas funciones exactas no se conocen, pero representan un sistema por el cual la información sensorial afecta a las funciones cerebrales de orden superior (Reilly, 1999; Kroust & Loewy, 2000).

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Tanto el complejo Central Amigdalino como el Núcleo Lecho de la Estría Terminal (NLET) son áreas de recepción de axones procedentes principalmente del NPBl externo y además del NPBl central y NPBL dorsal (Fulwiler & Saper, 1984; Bernard et al., 1991; Alden et al., 1994; Bernard et al., 1993; Halsell, 1992; Jia, et al., 1994; De Lacalle & Saper, 2000).

La Sustancia Innombrada, por su parte, recibe los haces procedentes del NPBl ventral y NPBl externo (Fulwiler & Saper, 1984; Alden et al., 1994; Bernard et al., 1993). Por otro lado, la Corteza Insular, fronto-lateral y Área Septo-Olfatoria reciben información del NPBl ventral y NPBl externo (Fulwiler & Saper, 1984; Halsell, 1992; De Lacalle & Saper, 2000).

En general, distintos autores coinciden en señalar que las aferencias viscerales generales, antes de dirigirse hacia estructuras superiores, establecen sus primeros contactos sinápticos en los núcleos PBl externo, PBl central y PBl ventral, conectando, posteriormente, con el Hipotálamo anterior, Tálamo Ventral Postero-medial, Núcleo Central de la Amígdala y NLET dorsal (Fulwiler & Saper, 1984; Halsell, 1992). Por otro lado las fibras que parten desde el NPBL externo (parte interna) y NPBl dorsal hacia estructuras caudales hipotalámicas, porción capsular de la amígdala (CeLC) y NLET lateral, forman parte del Fascículo Espino(Trigémico)-Ponto-Amigdaloides, encargado de transmitir información nociceptiva (Bernard et al., 1991; Bernard et al., 1993; Alden et al., 1994; Bester et al., 1995; Gauriau & Bernard, 2002).

Existen otras varias áreas cerebrales que conectan con las divisiones lateral y medial, del complejo Parabraquial, mediante fibras aferentes y eferentes: la Estría Terminal (Alden et al., 1994), Formación Reticular y Núcleos del Rafe (Gang et al., 1993; Petrov et al., 1992a; 1992b; Krukoff et al., 1993) o el Cerebelo (Supple & Kapp, 1994), además de las ya mencionadas. Esto indica que la división anatómica y funcional de ambos subnúcleos es incompleta y no tan radical como en un principio se pensaba.

Figura 1: Estructura del Núcleo Parabraquial: De arriba abajo y de izquierda a derecha se puede apreciar la localización del subnúcleo Parabraquial Lateral Externo así como la distribución de los diferentes subnúcleos que forman este Complejo (Adaptado de: Fulwiler & Saper, 1984) .



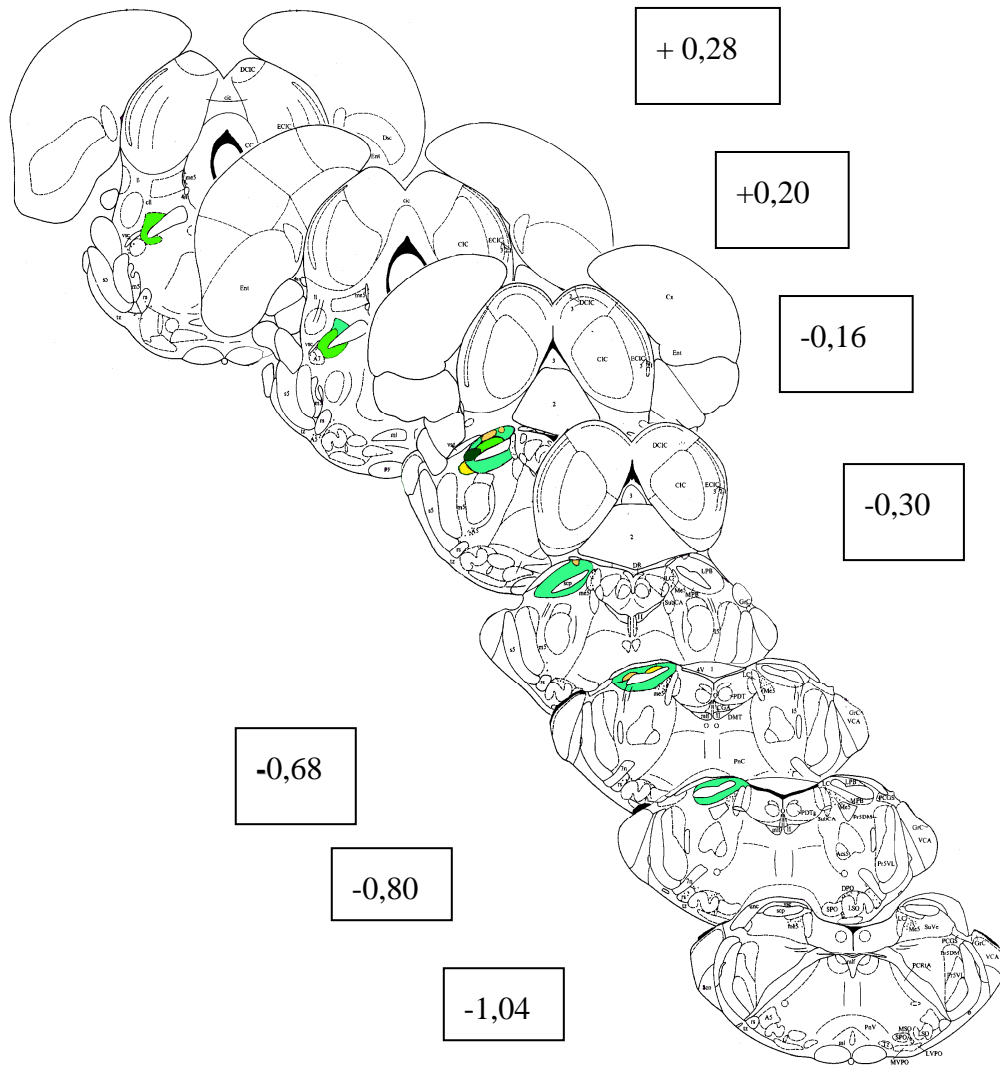


Figura 2: Secciones transversales del Área Parabraquial y Núcleo de Kolliker en dirección rostro-caudal. A la derecha se indica la distancia en mm. respecto al Plano interaural (Adaptado de Paxinos & Watson, 1996).

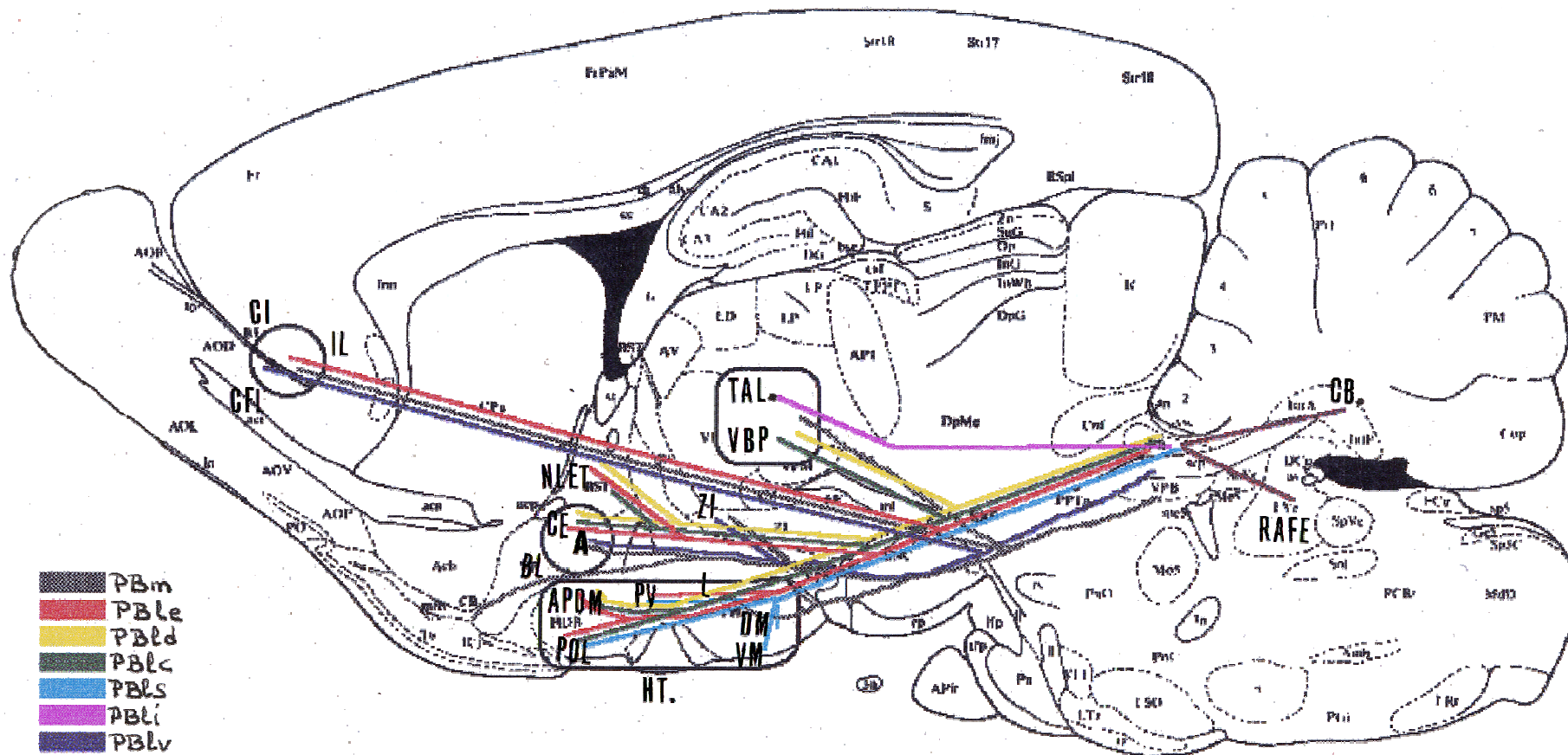


Figura 4: Fibras eferentes desde el Complejo Parabraquial

IX- HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las investigaciones analizadas en esta Introducción han puesto de manifiesto la relevancia que las dos divisiones principales del Complejo Parabraquial -medial y lateral- desempeñan en el procesamiento de la información gustativa, viscerosensorial y nociceptiva, siguiendo, en gran parte, rutas ascendentes paralelas (Norgren & Leonard, 1973; Hill, 1987; Herbert et al., 1990; Moga et al., 1990; Edwards & Johnson, 1991; Halsell, 1992; Di Lorenzo & Monroe, 1992; 1997; Davis, 1993; Krukoff et al., 1993; Bernard et al., 1993; Saleh & Cechetto, 1993; Slugg & Light, 1994; Alden et al., 1994; Jia et al., 1994; Saper, 1995b; Yoshida et al., 1997; Bester et al., 1997; Nishijo & Norgren, 1997; Halsell & Travers, 1997; Tkacs & Li, 1999; De la Calle & Saper, 2000; Krukoff & Loewy, 2000, etc.). De estos dos componentes, ha sido la parte medial, la más relacionada con el procesamiento gustativo, mientras que a la zona lateral se la ha asociado fundamentalmente con el procesamiento de información visceral (Agüero et al., 1993; 1997 a; 1997b; Halsell & Travers, 1997; De Lacalle & Saper, 2000; Mediavilla et al., 2000), aunque recientemente también se han encontrado en ella zonas de convergencia para ambos tipos de información (Herman & Rogers, 1985; Yamamoto et al., 1994; Karimnamazi et al., 2002).

El Núcleo Parabraquial Lateral Externo, situado en el extremo dorsolateral de este Complejo (Fulwiler & Saper, 1984; Herbert & Bellintani-Guardia, 1995), ha sido implicado en el procesamiento de información gustativa y visceral relevante para una gran variedad de conductas. De hecho, es una importante zona receptiva de información visceral humoral, a través de haces de procedentes del Área Postrema (Lança & Van der Kooy, 1985), así como vagales, a través del NTS caudal (Fulwiler & Saper, 1984; Herbert et al., 1990; Moga et al., 1990; Halsell, 1992; Krukoff et al., 1993; 1994; Saleh & Cechetto, 1993; Kobashi et al., 1993; Saper, 1995b; Krout & Loewy, 2000; De Lacalle & Saper, 2000; Karimnamazi et al., 2002). Por otro lado, mantiene un importante conjunto de conexiones recíprocas con la Amígdala Extendida, que incluyen el Núcleo Central de la Amígdala, N. Lecho de la Estría terminal y S. Innominada (Fulwiler & Saper, 1984; Bernard et al., 1991; Cassell et al., 1999; Petrovich & Swanson, 1997; De la Calle & Saper, 2000).

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

Al ser un importante relevo de la información viscerosensorial, el NPBlé ha sido relacionado con procesos de Aprendizaje Aversivo Gustativo, inducidos por diferentes manipulaciones viscerales –administración de sustancias irritantes abdominales, agentes eméticos, o drogas de abuso (Yamamoto et al., 1992; Sakai & Yamamoto, 1997). Asimismo, las lesiones parabraquiales que incluyen a este subnúcleo, interrumpen el aprendizaje cuando los estímulos gustativo-viscerales son presentados en tareas de tipo implícito, pero no secuencial o explícito (Mediavilla et al., 2000).

Por otro lado, esta región es un lugar de procesamiento de la información nociceptiva procedente de la periferia, que establece contactos sinápticos aquí antes de ser trasladada hacia centros autonómicos y superiores del cerebro, donde tiene lugar el procesamiento afectivo-emocional, autonómico y visceral de estos eventos negativos (Bernard et al., 1991; 1994; 1995; Bester et al., 1995; 1997; Light et al., 1993; Saper, 1995a; Jasmin et al., 1997; Craig & Dostrovsky, 1999).

Sin embargo, el NPBlé también ha sido relacionado con procesos motivacionales de carácter reforzante, que tienen que ver, por ejemplo, con el procesamiento de sustancias innatamente preferidas por los animales y otras apetitivas -adquiridas después de una experiencia de condicionamiento-, así como con mecanismos relacionados con la conducta nutritiva (Yamamoto et al., 1994; Monroe & Dileozenzo 1995; Wang et al., 1999; Hoebel, 1997; Reilly et al., 1993; Reilly & Trifunovic, 2000a; 2000b; Yamamoto & Sawa, 2000a, 2000b).

En relación con este tema, investigaciones previas realizadas en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que la alimentación enteral, por infusión directa de alimentos naturales en el estómago, produce reacciones aversivas semejantes a las desencadenadas por la administración de productos tóxicos (Puerto et al., 1976a; 1976b; Molina et al., 1977; Puerto & Molina, 1977; Molina & Puerto, 1986; Zafra, 2000), mientras que este no es el caso si los nutrientes administrados son alimentos predigeridos, sometidos a la denominada ‘fase cefálica’ (Pavlov, 1910; Puerto et al., 1976a; 1976b; Tordoff & Friedman, 1989; Zafra, 2000).

Más aún, se ha comprobado también, que la región PBlé es una zona de actuación de diversas sustancias endógenas, como la CCK implicada en la generación de señales de saciedad a ‘corto plazo’ (Li & Rowland, 1995; Trifunovic & Reilly, 2001a; 2001b), hormonas como la leptina, que ha sido relacionada con el

control a largo plazo, de la ingesta y el metabolismo corporal (Elmqvist et al., 1997; 1998; Friedman, 1998; Friedman & Halaas, 1998; Ahima & Flier, 2000; Elias et al., 2000) o bien fármacos relacionados con el control de la ingesta, como por ejemplo la Fenfluramina (Li & Rowland, 1993; 1995; Li et al., 1994), las anfetaminas (Sakai & Yamamoto, 1997) o los opiáceos (Carr et al., 1991; Bechara et al., 1993; Jaeger & Van der Kooy, 1993; 1996; Wolinsky et al., 1996).

Los opiáceos, en efecto, desempeñan un importante papel en la ingesta, al parecer, modulando la valoración hedónica de las cualidades sensoriales de la comida y/o incrementando su valor como incentivo (Le Magnen, 1992; 1999; Apfelbaum & Mandenoff, 1981; Drewnowski et al., 1992; Carr & Papadouka, 1994; Papadouka & Carr, 1994; Cooper & Clifton, 1996; Hoebel, 1997), aunque también podrían actuar reduciendo las sensaciones provocadas por los estados de ‘desequilibrio homeostático’ (Carr & Papadouka, 1994). Asimismo, diversas investigaciones, han puesto de manifiesto que los receptores opiáceos de la zona Parabraquial Lateral Externa y Medial Externa podrían ser modulados por la restricción de alimento (Wolinsky et al., 1996) y que esta zona podría participar de un circuito relacionado con la ingesta, cuyos efectos son modificados por la administración de diversas sustancias opiáceas (Carr et al., 1991; Moufid-Bellancourt & Velley, 1994; Moufid-Bellancourt et al., 1996).

En este contexto, estudios previos realizados por nuestro Grupo de Investigación, han logrado disociar dos sistemas neuroanatómicos diferentes implicados en las distintas modalidades de Aprendizaje Interoceptivo, que han sido denominadas ‘a corto plazo’, ‘concurrente’ o ‘implícito’ y ‘a largo plazo’, ‘secuencial’ o ‘explícito’, las cuales difieren fundamentalmente en los requisitos adquisitivos –temporalidad, flexibilidad, etc.- necesarios para llevar a cabo la tarea (Arnedo et al., 1990; 1993; Gallo et al., 1990; 1991; Agüero et al., 1993a; 1993b; 1994; Cubero et al., 2001; Mediavilla, 1995; Mediavilla et al., 1999; 2000). Como se ha señalado anteriormente, las lesiones de esta estructura PBL interrumpen únicamente la modalidad ‘concurrente’ de este Procedimiento adquisitivo y regulatorio (Mediavilla et al., 2000).

La serie experimental que se presenta a continuación se enmarca en el contexto previamente expuesto. Dicha serie tiene por objetivo, en primer lugar, provocar la activación de esta zona Parabraquial Lateral externa mediante Estimulación Eléctrica Intracerebral, para observar sus consecuencias motivacionales

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

cuando es asociada a distintos tipos de índices sensoriales, -gustativos y espaciales-. Estudios previos realizados por nuestro laboratorio han permitido demostrar que esta técnica puede ser utilizada como sustituto del estímulo visceral en procedimientos de Aprendizaje Aversivo Gustativo (Gallo et al., 1988; Agüero et al., 1993a; Cubero & Puerto, 2000a) y podría serlo también en aprendizajes de tipo reforzante. Asimismo, se pretende examinar si esta asociación es específica hacia una determinada modalidad estimular como puede ser el gusto o se establece equipotencialmente hacia cualquier tipo de señal externa.

Por otra parte, en el estudio de los mecanismos cerebrales implicados en el refuerzo/recompensa inducido por estimulación eléctrica, una cuestión relevante es la relacionada con el tipo de procesos fisiológicos activados. Estas posibilidades serán examinadas en esta Tesis Doctoral. Se comprobarán, en su caso, si se trata de mecanismos generales de recompensa cerebral similares a los que, mediante tareas de condicionamiento instrumental, tienen como finalidad la auto-administración de pulsos de corriente que despolarizan fibras del Haz Prosencefálico Medial (Olds y Fobes, 1981; Wise & Rompré, 1989; Milner, 1989) y excitan indirectamente neuronas de la Vía Mesocorticolímbica. También puede ocurrir que, se esté actuando sobre circuitos cerebrales independientes, o bien, con estructuras compartidas (Waraczynski & Shizgal, 1995). Así, algunos estudios han demostrado que en ciertas regiones del Complejo Parabraquial se pueden generar conductas de autoestimulación, aunque esto se ha logrado en el tercio medio de la parte medial, y por tanto lejos del subnúcleo PBle (Ferssiwi et al., 1987).

Por otro lado, si la región PBle está implicada en el procesamiento del refuerzo, manipulaciones opuestas, como la destrucción de esta zona mediante técnicas electrolíticas, podrían bloquear el efecto reforzante inducido por sustancias naturales, como puede ser la administración de nutrientes en condiciones fisiológicas, tal y como se ha demostrado previamente mediante la realización de diversas manipulaciones a nivel periférico (Puerto et al., 1976 a; 1976b; Molina & Puerto, 1986; Zafra, 2000).

Será importante explorar, finalmente, la modalidad de aprendizaje en las que podría estar implicado el refuerzo inducido por estimulación eléctrica del NPle, aunque existen precedentes con respecto al Aprendizaje Aversivo Gustativo, de que podría estar relacionado con procesos adquisitivos y regulatorios 'concurrentes' o 'a corto plazo' (Mediavilla et al., 2000).

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Con todo ello, se pretenden llevar a cabo una serie de estudios que, continuando con las líneas de investigación desarrolladas en nuestro laboratorio, o bien abriendo nuevas vías, permitan arrojar nuevos resultados y contribuyan al esclarecimiento de los mecanismos fisiológicos implicados en procesos de aprendizaje y/o sistemas regulatorios de carácter homeostático o de ingesta no homeostática.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

CAPÍTULO I

**PREFERENCIAS GUSTATIVAS INDUCIDAS POR ESTIMULACIÓN
ELÉCTRICA DEL NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL EXTERNO
EN UNA TAREA DE APRENDIZAJE DISCRIMINATIVO GUSTATIVO**

EXPERIMENTO 1

Preferencias Gustativas inducidas por Estimulación Eléctrica del Núcleo Parabraquial Lateral Externo en una tarea de Aprendizaje Discriminativo Gustativo

El Complejo Parabraquial está compuesto por un conjunto de subnúcleos neuronales que rodean al Pedúnculo Cerebeloso Superior a lo largo de la parte dorsolateral del Puente. Se acepta por convención la división en dos grandes áreas, medial y lateral, en función de su localización relativa respecto al PCS (Fulwiler & Saper, 1984; Paxinos, 1995; Paxinos & Watson, 1996). La parte medial ha sido implicada en procesamiento gustativo (Norgren & Leonard, 1973; Hill, 1987; Herbert et al., 1990; Halsell, 1992; Davis, 1993; Krukoff et al., 1993; Bernard et al., 1993; Di Lorenzo & Monroe 1992; 1997; Nishijo & Norgren, 1997; Halsell & Travers, 1997; Krukoff & Loewy, 2000; Reilly & Trifunovic, 2000a; 2000b;...) mientras que la división lateral es un importante relevo de información viscerosensorial y nociceptiva, por lo que ha sido relacionada con una amplia variedad de funciones: nutrición, sed, control de la respiración, regulación cardiovascular y endocrina, dolor y analgesia, conducta emocional, locomoción, ciclo sueño-vigilia, etc. (Herbert et al., 1990; Moga et al., 1990; Edwards & Johnson, 1991; Krukoff et al., 1993; Bernard et al., 1993; Saleh & Cechetto, 1993; Slugg & Light, 1994; Alden et al., 1994; Jia et al., 1994; Saper, 1995a; 1995b; Yoshida et al., 1997; Bester et al., 1997; Tkacs & Li, 1999; Krukoff & Loewy, 2000; De la Calle & Saper, 2000; Reilly & Trifunovic, 2000a; 2000b, etc...), aunque también se acepta la existencia de áreas donde convergen ambos tipos de información, gustativa y visceral (Herman & Rogers, 1985; Yamamoto et al., 1994).

Muchas de las fibras implicadas en el procesamiento de la información viscerosensorial y nociceptiva proceden del NTS, AP, Laminas I y V de la Médula Espinal, así como de diversas estructuras bulbares y hacen relevo en los subnúcleos parabraquiales laterales, para proyectar a diversas estructuras mesencefálicas, diencefálicas y prosencefálicas –Hipotálamo, Tálamo, Córtex y Amígdala, principalmente- (Fulwiler & Saper, 1984; Herbert et al., 1990; Light et al, 1993; Slugg & Light, 1994; Yoshida et al., 1997; Moga et al., 1990; Krukoff et al., 1993;1994; Bernard et al., 1993; Halsell, 1992; Saleh & Cechetto, 1993; Alden et al., 1994; Bester et al., 1997; Krout & Loewy, 2000...). Por su parte, la región parabraquial gustativa recibe aferencias de la parte rostral del NTS, proyectando

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

hacia estructuras anteriores, siguiendo una ruta ascendente en gran parte paralela a la que realizan las señales viscerales, como el Complejo Ventrobasal del Tálamo –área gustativa-, Corteza insular, Hipotálamo y Amígdala extendida (Halsell, 1992; Bernard et al., 1993; Krukoff et al., 1993; Di Lorenzo & Monroe 1992; 1997; Nishijo & Norgren, 1997; Halsell & Travers, 1997; Cassell et al., 1999; Reilly & Trifunovic, 2000a).

La conducta nutritiva implica la participación de una serie de mecanismos que requieren intercambio de información acerca de factores orosensoriales y postingestivos (Davis, 1999; Smith, 2000; Schwartz, 2000). En este sentido, el Núcleo Parabraquial ocupa un lugar privilegiado para detectar la presencia/ausencia de nutrientes a nivel periférico, puesto que recibe información tanto vagal como humoral (Fulwiler & Saper, 1984; Herman & Rogers, 1985; Papas & Ferguson, 1990; Mediavilla et al., 2001b). A su vez, estudios llevados a cabo en diversos laboratorios, han relacionado a esta región Parabraquial con mecanismos ingestivos de carácter reforzante (Edwards & Ritter, 1989; Calingasan & Ritter, 1993; Hoebel, 1997; Söderpalm & Berridge, 2000; Reilly & Trifunovic, 2000a; 2000b; Yamamoto & Sawa, 2000a; 2000b).

En efecto, algunos autores han concluido que los lípidos, por ejemplo, son procesados por el NPBI dorsal-central, al comprobar que lesiones selectivas de cuerpos celulares en esta zona eliminaron la ingesta inducida por Mercaptoacetato -un agente causante de lipoprivación- (Calingasan & Ritter, 1993). Por otro lado, aunque la destrucción del NPBI no redujo la ingesta de carbohidratos (Calingasan & Ritter, 1993), la administración periférica de productos generadores de glucoprivación (2,5-AM) así como la administración intraduodenal de glucosa indujeron inmunorreactividad en los subnúcleos PBI externo y central (Ritter et al., 1994; Wang et al., 1999). Asimismo, se ha comprobado que el subnúcleo Parabraquial Lateral es una zona de actuación de diversas sustancias presentes en el tracto digestivo, como la Galanina o el neuropéptido-Y, relacionadas con la ingesta de grasas y carbohidratos, respectivamente (Smith et al., 1982; Petrov et al., 1992a; 1992b; Krukoff et al., 1992; Hoebel, 1997), tal y como se ha puesto de manifiesto mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Además, dadas las amplias conexiones parabraquiales-hipotalámicas (Fulwiler & Saper, 1984; Moga et al., 1990; Halsell, 1992; Krukoff et al., 1994)

existe la posibilidad de que esta región pontina pudiese desempeñar un papel modulador sobre la actividad neural hipotalámica en relación con la ingesta.

En este sentido, se han identificado fibras que, partiendo de la zona lateral del NPBl dorsal, finalizan en el Hipotálamo Ventromedial y contienen colecistoquinina, un neurotransmisor implicado en nutrición (Inagaki et al., 1984). La administración i.p. de derivados sintéticos de la CCK redujo la ingesta, mientras que inyecciones intrahipotalámicas la eliminaron completamente (Takaki et al., 1990). Además, la estimulación eléctrica de la misma zona (PBld) provocó hiperglucemia como consecuencia del concurrente incremento en la secreción de glucagón y decremento en la liberación de insulina, más acusados durante la fase diurna (Ino et al., 1987). Dichos cambios están bajo control del N. Supraquiasmático, a través de sus conexiones indirectas por vía hipotalámica, y autonómicas (Fujiwara et al., 1988). En definitiva, estos datos apoyan la idea de que el NPB latero-dorsal es capaz de modular la ingesta haciendo uso de señales circadianas.

Esta región parabraquial –y en concreto los subnúcleos laterales superior y externo- es también, blanco de actuación de la leptina, una hormona que ha sido implicada en regulación de la ingesta y el peso corporal (Elmqvist et al., 1997; 1998; Elias et al., 2000; Ahima et al., 2000), pero también en otras funciones relacionadas con ella, como por ejemplo en modulación del circuito de refuerzo en relación con la conducta nutritiva (Ahima & Flier, 2000). Esta proteína, liberada en su mayor parte por el tejido adiposo blanco, actuaría informando al cerebro acerca del estado nutricional y energético del organismo, y promoviendo las respuestas adecuadas a través de la integración de sistemas neuroendocrinos, autonómicos y conductuales (Friedman & Halaas, 1998; Elmqvist et al., 1998; Elias et al., 2000).

Finalmente, se ha comprobado que ésta es una zona de actuación de diversos fármacos relacionados con el control y modulación de la ingesta, como por ejemplo, la Fenfluramina –un agonista serotoninérgico que actúa como anoréctico y es procesado por el NPBl y en menor medida por los subnúcleos PBme y PBld- (Li & Rowland, 1993; 1995; Li et al., 1994; Rowland et al., 2000) o los opiáceos –que actúan prolongando la duración de las comidas y se ha demostrado que pueden actuar sobre receptores μ y κ presentes en los subnúcleos PBl y PBme- (Bechara et al., 1993; Jaeger & Van der Kooy, 1993; Lynch et al., 1985; Wolinsky et al., 1996; Chamberlin et al., 1999; Abbadie et al., 2000). Asimismo, otros autores han observado que microinyecciones de midazolam en la división lateral del NPB

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

estimulan la ingesta de alimento, al parecer, potenciando las cualidades hedónicas, tal y como se ha demostrado mediante el test de reactividad gustativa de Norgren (Söderpalm & Berridge, 2000).

El subnúcleo Parabraquial Lateral Externo rodea al PCS por su borde dorsolateral a lo largo de toda su extensión, limitando con neuronas pertenecientes al NPBm, que lo bordean por la parte ventrolateral (Fulwiler & Saper, 1984). Estudios recientes han puesto de manifiesto que aunque una parte de las neuronas que forman este subnúcleo tienen una estructura neuroanatómica que queda circunscrita dentro de los límites de éste, algunas otras poseen ramificaciones dendríticas que se extienden más allá de sus límites, invadiendo otras regiones adyacentes y funcionando posiblemente como integradores de diversos tipos de información (Herbert & Bellintani-Guardia, 1995). A su vez, desde el NPBl externo surge un importante haz de proyecciones, organizadas topográficamente, hacia la Amígdala Extendida, incluyendo el CeA, N. Lecho de la Estría terminal y S. Innominada (Fulwiler & Saper, 1984; Bernard et al., 1991; Cassell et al., 1999), y recibe aferencias recíprocas desde estas mismas estructuras (Petrovich & Swanson, 1997; De la Calle & Saper, 2000), lo que le convierte en candidato idóneo para participar en diversos procesos motivacionales.

Mediante técnicas inmunohistoquímicas se ha observado que este subnúcleo puede ser activado a través de diversas manipulaciones de índole visceral, como por ejemplo estimulación eléctrica del nervio Vago (Gieroba & Blessing, 1994) o administración de productos tales como CINA hipertónico (Kobashi et al., 1993) o CILi (Gu et al., 1993; Swank & Bernstein, 1994; Yamamoto et al., 1992), aunque también recibe información visceral procedente del A. Postrema (Lança & Van der Kooy, 1985; Papas & Ferguson, 1990; Cubero et al., 2001). De hecho, tras haber sido activado por administración de CILi, su respuesta no desaparece completamente después de la ablación del Vago (Yamamoto et al., 1992).

Igualmente, haces de fibras que hacen sinapsis en el NPB procedentes del Área Postrema, liberan serotonina como neurotransmisor (Lança & Van der Kooy, 1985). Podría plantearse la hipótesis de que a través de él, y al menos en parte, pueda ejercer su acción farmacológica la Fenfluramina, -una sustancia que estimula la liberación de serotonina, utilizada en el pasado para el tratamiento de la obesidad-, que es procesada por la zona PBle, aunque también, en menor grado, por los núcleos PBld, PBm, KF y N. Cuneiforme (Li & Rowland, 1993; Li et al., 1994).

A su vez, las lesiones del NPBl reducen drásticamente la activación de algunas estructuras prosencefálicas previamente marcadas por fenfluramina -NLET y CeA- a la vez que atenúan el efecto supresivo del fármaco sobre la ingesta (Li et al., 1994). En este sentido, se han propuesto dos posibilidades para su acción anoréctica: que pueda deberse a la interacción con fibras colecistoquinérgicas, o bien con el Sistema Opiáceo (Li & Rowland, 1995).

Respecto a la primera posibilidad, dado que se han hallado diferencias en el patrón de activación mostrado por CCK y Fenfluramina, y dado que el efecto de aquella puede ser eliminado mediante vagotomía, se ha sugerido que la interacción podría tener lugar a nivel central, en aquellas estructuras que pueden ser co-activadas por ambos productos (Li & Rowland, 1995), a saber, el NPBl, cuyas fibras ascienden dorsalmente hacia otros subnúcleos laterales, que proyectan al hipotálamo ventromedial (Inagaki et al., 1984).

La segunda posibilidad apunta a una interacción con el sistema opiáceo, cuyos efectos varían posiblemente en función del tipo de receptor sobre el que actúen y de la localización central o periférica (Li & Rowland, 1995). La región parabraquial contiene elevadas concentraciones de receptores opiáceos μ y moderadas de k , que muestran una distribución casi paralela. Los primeros se concentran fundamentalmente en los núcleos PBl externo, PBl central y PB medial. Los del tipo k han sido localizados tanto en la zona PBl dorsal como en la parte ventral -NPBlv- (Mansour et al., 1988; Mansour et al., 1995; Lynch et al., 1985; Ding et al., 1996).

El papel de estas sustancias en la nutrición tiene que ver, sobretudo, con una modulación de las propiedades motivacionales de la comida, ya que actúan incrementando su valor como incentivo (Le Magnen, 1992; Apfelbaum & Mandenoff, 1981; Drewnowski et al., 1992), pero también reduciendo estados de 'disconfort', como es el caso del hambre (Carr & Papadouka, 1994). Se ha implicado a receptores específicos, μ y k en ambos efectos y en lugares cerebrales específicos (Carr & Papadouka, 1994; Papadouka & Carr, 1994). Concretamente, la restricción de alimento genera hiperactividad de los receptores k en el NPBl e hipoactividad de los μ en el NPBl y NPBlme (Wolinsky et al., 1996). Por otro lado, se ha visto que la administración sistémica de fenfluramina, provoca la liberación de opiáceos, que inhiben la motilidad gástrica (Majeed et al., 1986; Robert et al., 1991).

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

Finalmente, la administración de Naloxona en el N. Parabraquial elevó el umbral de ingesta inducida por estimulación del Hipotálamo lateral (Carr et al., 1991), mientras que inyecciones de morfina en la subdivisión medial no siempre facilitan la preferencia por soluciones de sacarina -solo lo hicieron en animales con lesión del HT lateral- (Moufid-Belancourt & Velley, 1994).

El Aprendizaje Interoceptivo de carácter reforzante ha sido un paradigma útil en el estudio de la conducta nutritiva, pues se ha visto que en ciertas circunstancias, los animales experimentales suelen manifestar preferencia por estímulos gustativos asociados con beneficios metabólicos (Puerto et al., 1976a; 1976b; Puerto & Molina, 1977; Le Magnen, 1992; 1999; Elizalde & Sclafani, 1990; Azzara & Sclafani, 1998; Perez et al., 1998; Spector, 2000). El procedimiento experimental más utilizado consiste en comparar el consumo de dos estímulos gustativos novedosos, uno que es emparejado con la infusión de nutrientes en el Tracto Gastrointestinal y otro con la administración de un vehículo, habitualmente, suero fisiológico. De este modo, el animal aprende en sucesivos ensayos a discriminar entre los dos sabores, que van modificando su valor hedónico en función de la experiencia y siendo situados en algún punto dentro de un '*continuum*' que va desde la preferencia hasta la aversión (Bures et al., 1998).

Pero se ha observado también, que la capacidad para asociar estímulos gustativos con señales viscerales no se limita a la reducción de estados naturales de necesidad –mediante la obtención de beneficios metabólicos, sino que los animales son capaces de establecer preferencias condicionadas bajo estados no naturales de necesidad, o sea, cuando se han convertido en adictos y manifiestan síndrome de abstinencia (Parker et al., 1973; Yeomans, 2000). En esta línea, Van der Kooy y su grupo han sugerido que la capacidad de la morfina para actuar como estímulo discriminativo en la generación de adicción, puede ser mediada por su actuación en el Núcleo Parabraquial (Jaeger & Van der Kooy, 1993).

De acuerdo con los datos presentados, existe amplia evidencia de que el NPBl procesa información gustativa y visceral relevante en una gran variedad de conductas relacionadas con nutrición y refuerzo inducido por sustancias de abuso. Varios subnúcleos han sido citados reiteradamente por su participación en el procesamiento de aspectos tanto de carácter motivacional como sensorial (NPBl, NPBlc, NPBlc...). Nuestra investigación se centrará en la exploración del NPBl,

planteando la hipótesis de que en esta estructura exista un sistema implicado en el procesamiento de estímulos positivos, apetitivos o recompensantes, además del ampliamente conocido y estudiado sistema aversivo, observado en ésta y otras estructuras parabraquiales, por parte diversos laboratorios (Agüero et al., 1993a; 1993b; Spector et al., 1992; Yamamoto et al., 1992; 1993; Swank & Bernstein, 1994; Mediavilla et al., 2000; Cubero et al., 2000b; 2001; Reilly & Trifunovic, 2000a; 2000b; Yamamoto & Sawa 2000a; 2000b).

Una manera de poner a prueba esta hipótesis sería mediante estimulación eléctrica de este núcleo pontino. Esta técnica ha demostrado ser eficaz como sustituto adecuado del estímulo visceral en procedimientos de AAG (Gallo et al., 1988; Agüero, 1993a), y podría serlo también en un Condicionamiento de Preferencias Gustativas, de manera que la activación neuronal, al modificar su funcionamiento neurofisiológico normal, nos permita investigar el papel que desempeña en el procesamiento de aspectos relacionados con las cualidades sensoriales y/o motivacionales de estas células.

MÉTODO

SUJETOS:

Se utilizaron 14 ratas macho de la raza Wistar, procedentes del animalario de la Universidad de Granada, cuyos pesos estaban comprendidos entre los 270 y 300 grs. al inicio del experimento. Los animales fueron instalados en jaulas de plexiglás, de 30x30x30 cm., cuyo suelo fue recubierto por una fina capa de serrín. Las paredes laterales eran de color negro y transparentes la anterior y posterior. Un panel separador central de plexiglás de color negro dividía cada jaula en dos habitáculos de 30x15x30 cm. Finalmente, el techo estaba constituido por una rejilla metálica. La pared frontal de cada habitáculo poseía dos orificios de 1,6 cm de diámetro colocados a igual distancia del centro y los extremos, así como del techo y suelo de la jaula.

De estos 14 animales, dos tuvieron que ser eliminados antes de finalizar el procedimiento experimental al desprendérseles el implante, de modo que análisis de los resultados fue llevado a cabo con 12 animales.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

Otros 10 animales de las mismas características fueron utilizados como Grupo Control.

CIRUGÍA E INSTRUMENTAL:

Hasta el inicio del protocolo experimental, las ratas fueron mantenidas en jaulas, cuya pared separadora central había sido retirada, formando grupos de cuatro, donde permanecieron durante una semana con comida y agua "ad libitum". Concluido este período se les sometió a una intervención quirúrgica consistente en el implante crónico de un electrodo monopolar en el Núcleo Parabraquial Lateral Externo (NPBLE).

Implante del electrodo de estimulación en el NPBLE:

La cirugía para el implante de electrodos fue realizada bajo dosis controladas de Pentotal Sódico (Thiopental Sódico, Laboratorios Abbot S.A., Madrid), administrado intraperitonealmente en una concentración de 50 mg/Kg.

Tras rasurar la cabeza, cada animal anestesiado fue inmovilizado mediante la introducción de unas barras metálicas en los meatos auditivos y la colocación en un aparato estereotáxico, Stoelting (USA), Mod. 51600, donde fueron fijadas estas barras así como los incisivos del animal.

Se realizó un pequeño corte longitudinal de unos 2 cm. de largo, retirando posteriormente todo el tejido perióstico conjuntivo adyacente a ambos lados y raspando ligeramente hasta dejar el cráneo completamente limpio y seco. Seguidamente, con un torno se trepanaron 4 orificios en una posición anterior (cerca de bregma), dos a cada lado de la línea media, en los que se insertaron cuatro tornillos pequeños de acero inoxidable, alrededor de los cuales se fijó el electrodo de referencia (sección de unos 5 cm. de longitud de acero inoxidable de uso odontológico, de 0,9 mm. de diámetro).

A continuación se perforó un nuevo orificio de mayor diámetro que los anteriores, a través del cual se introdujo un electrodo monopolar de 200 micras de diámetro hasta el lugar de localización del NPBLE (Coordenadas: AP=-0,16; V=3,0; L= \pm 2,5 , a partir del punto 0 interaural, con una inclinación del cráneo de -3,3 mm. según el atlas de Paxinos & Watson (1996).

Los electrodos monopolares intracerebrales fueron fabricados con alfileres entomológicos de acero inoxidable (nº 00) a los que se soldaba una sección de hilo dental de unos 3 cm. de largo (igualmente de acero inoxidable) curvado en ángulo recto. Se aisló toda la longitud del electrodo con INSL-X hasta el punto de unión de ambas secciones y se cortó el extremo sobrante.

Una vez situado en la zona delimitada por las coordenadas estereotáxicas, se procedió a la fijación del electrodo activo con cemento dental (S.R. Denture Base, Quick 3/60, Ivoclar) recubriéndolo junto con los tornillos y el electrodo masa hasta dejar el implante totalmente cubierto y fijado al cráneo. Finalizado el proceso, se retiró al animal del aparato estereotáxico y se seccionaron los dos extremos sobrantes de los electrodos, manteniéndolos con una longitud de 1,5 cm. aproximadamente por encima del cráneo.

Como medidas preventivas ante cualquier posible infección, todos los animales recibieron una dosis intramuscular de 0,1 cc. de penicilina (Benzetacil 6-3-3. Antibióticos Farma S.A., Madrid) y se les añadió una solución antiséptica alrededor del implante (Betadine. Povidona Yodada. Asta Médica, Madrid). También se les inyectó 0,1 cc. de Metrazol por vía intraperitoneal para facilitar la recuperación de la anestesia.

Concluida la operación, los animales fueron instalados, ahora individualmente, en jaulas de las dimensiones y características señaladas anteriormente, donde permanecieron durante una semana de recuperación con comida y agua "ad libitum" (Alimento de Laboratorio. A-04 Mantenimiento rata-ratón. Dietas Panlab S.L., Barcelona).

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:

Durante los dos días previos al período de adquisición y tras la fase de recuperación, los animales dispusieron de agua durante solo 7 minutos diarios, en buretas situadas en uno u otro orificio de la jaula, de forma alternada, al tiempo que se limitó la comida a un total de 15 gr. por día.

La Fase Experimental propiamente dicha, consistió en un proceso a través del cual los sujetos pudieron aprender la tarea propuesta, en la que se asociaba un estímulo gustativo con la estimulación eléctrica intracerebral. Se presentaban dos estímulos gustativos neutros, con sabor a "Fresa" y a "Coco", preparados en una

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

concentración de 0,5 cc. de extracto por cada 100 ml. de agua (McCormick, Co. Inc. San Francisco, California) y administrados en días alternos. Solo uno de ellos era seguido inmediatamente de la estimulación eléctrica del NPBL e durante 30 minutos (Para más detalles sobre el procedimiento, consultar la Tabla 1.1).

PRIMERA SESIÓN: Cada uno de los animales disponía de una sola bureta con el estímulo gustativo "F" colocado en el orificio izquierdo de la jaula, durante 7 minutos. Concluido el tiempo se registraba la cantidad ingerida e inmediatamente se procedía a la estimulación eléctrica del NPBL e con corriente directa pulsante, administrada en pulsos individuales de 0,1 ms. de duración, separados por 15 milisegundos de intervalo (o lo que es lo mismo, con una frecuencia de 66,6 c.p.s.). La diferencia de potencial oscilaba entre 1,5 y 1,7 V., alternando 30 segundos de estimulación con otros 30 de descanso. Los pulsos eléctricos fueron suministrados por un estimulador Letica LI12100 (Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain) conectado a un osciloscopio "Telequipment DM63" (Textronic Ltd, London, U.K.) que permite controlar visualmente los parámetros de la estimulación.

La mitad de los animales fueron estimulados tras consumir "F" y el resto no recibió estimulación.

SEGUNDA SESIÓN: Se presentaba una bureta con el estímulo gustativo "C" a la derecha, durante 7 minutos y se estimulaba a la otra mitad de los animales, que el día anterior no habían recibido estimulación.

TERCERA SESIÓN: Se repitió la situación del primer día.

CUARTA SESIÓN: Fue idéntica a la 2ª sesión experimental.

De este modo, al concluir la fase de entrenamiento, cada sujeto había recibido dos ensayos de asociación de uno de los sabores –debidamente balanceados- con la estimulación eléctrica, mientras que el otro estímulo no quedó asociado a estimulación alguna.

QUINTA SESIÓN (PRUEBA): Los animales dispusieron simultáneamente de dos buretas con los sabores "F" y "C" durante los 7 minutos de rigor y en la misma posición en que habían sido presentados durante los días de entrenamiento. Se

registraron las cantidades que cada individuo consumió de una y otra, y al finalizar, la bebida fue retirada y los animales dispusieron de comida "ad libitum".

Durante todos los días que duró el experimento, se comenzaba por la limpieza de los electrodos con un algodón empapado en alcohol antes de colocar los conectores a cada animal. Se finalizaba con la administración de una solución antiséptica sobre los bordes del implante para evitar infecciones que pudiesen causar su desprendimiento. Se utilizó además ruido blanco de fondo para evitar posibles sonidos fortuitos que pudiesen modificar las condiciones ambientales. La comida fue limitada a 15 gr. diarios al acabar cada sesión.

Por su parte, y en relación al **GRUPO CONTROL**, se realizaron implantes similares a los descritos, en un grupo de 10 animales, de pesos comprendidos entre los 270 y 330 gr., con la única excepción de que la coordenada vertical fue modificada, situando el electrodo 0,6 mm. por encima del NPBL. El procedimiento experimental así como los parámetros de la corriente fueron exactamente iguales a los del Grupo Experimental.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Prueba
Grupo A 1/2 suj	FR. izq. + Estimul. 30 min. 30"on- 30"off	CO. der. + No-esti. 30min. 30"on- 30"off	= Día 1°	= Día 2°	FR. izq. CO. der. 7 min.
Grupo B 1/2 Suj	FR. izq. + No-esti. 30 min. 30"on- 30"off	CO. der. + Estimul. 30 min. 30"on- 30"off	= Día 1°	= Día 2°	FR. izq. CO. der. 7 min.

Tabla 1.1: Paradigma utilizado en el experimento 1.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

En el Anexo II, Tabla 1, se recogen las cantidades ingeridas de cada uno de los estímulos gustativos, por parte de los animales del grupo experimental y del grupo control.

PRUEBA DE AUTOESTIMULACION:

Finalizado el proceso, todos los animales experimentales fueron sometidos individualmente a una prueba de autoestimulación intracerebral, que se realizó en una caja de Skinner. Las cuatro paredes laterales de esta caja medían 50x50 cm. y fueron fabricadas con Plexiglás transparente. Además disponía de una palanca de presión, conectada a un generador de corriente eléctrica, Letica, LI12100 (Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain) con el que enlazaba el electrodo activo intracerebral del sujeto.

Cada presión de la palanca suministraba un tren de pulsos, con parámetros predeterminados por el experimentador, de manera que a cada animal se administraba el máximo de intensidad de corriente que era capaz de soportar sin manifestar alteraciones conductuales apreciables o convulsiones motoras (en torno a los 4 voltios). La frecuencia utilizada era de 66,6 cps. y la duración del pulso se fijó en 0,1 ms.; la duración de cada tren de pulsos fue establecida en 0,25 segundos.

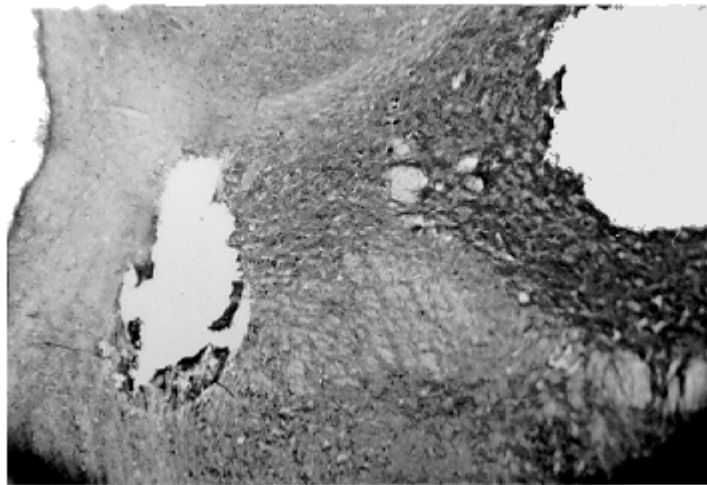
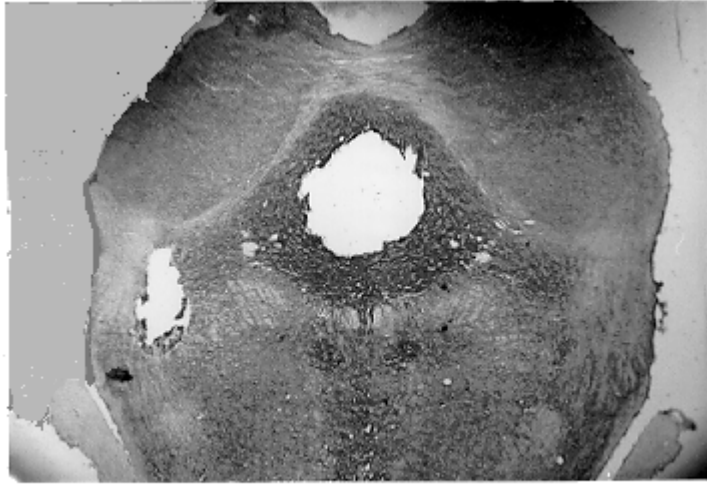
Inicialmente, la estimulación era suministrada con la pretensión de 'moldear' las respuestas de cada sujeto, a fin de conseguir que el animal aprendiese la respuesta correcta y posteriormente la ejecutase por sí solo (Siguiendo un procedimiento similar al utilizado en experimentos-piloto realizados en el Hipotálamo Lateral). De acuerdo con nuestros resultados, durante esta fase no se observó ninguna respuesta espontánea de autoestimulación en los sujetos, a pesar del moldeamiento previo de las mismas, en contraposición a lo que se observa habitualmente en el Hipotálamo Lateral (datos no incluidos en este estudio).

HISTOLOGÍA:

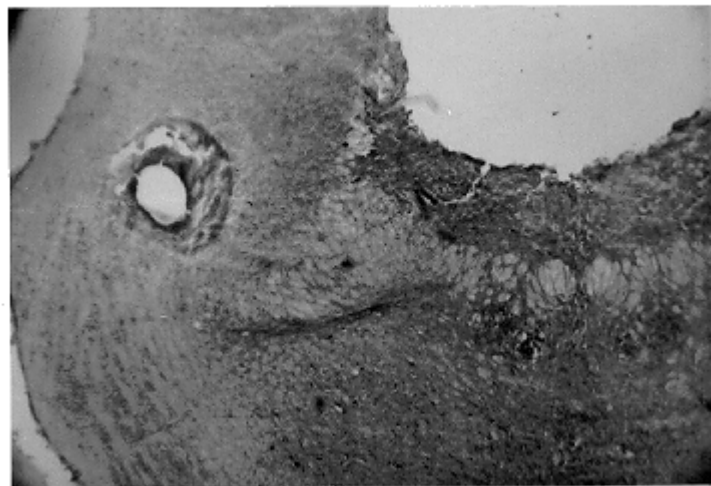
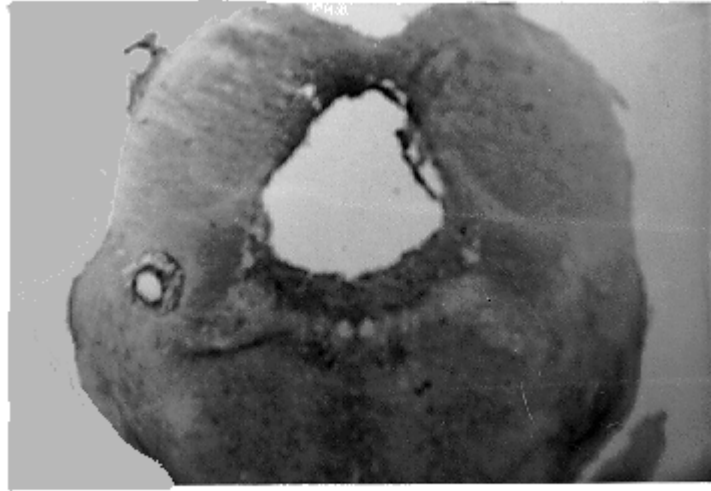
Al finalizar la fase experimental, todos los animales recibieron una dosis letal de anestésico. Tras marcar la zona de la estimulación mediante una pequeña lesión electrolítica (0,3 mA de corriente catódica continua durante 5 segundos), se hizo perfusión transcárdial de todos los animales, inyectando sendas soluciones de suero fisiológico y formol. Los cerebros fueron extraídos del cráneo cuidadosamente y conservados en una solución de Formaldehído al 4% durante varios días. Posteriormente, se laminaron en secciones de 50 micras de grosor con la ayuda de un microtomo-congelador (Leitz, mod. 1320) en dirección antero-posterior, las cuales fueron montadas en portaobjetos, teñidas con Violeta de Cresilo, examinadas (Lupa estereoscópica VMZ-4F, Olympus, Tokio, Japón y fotografiadas (Cámara fotográfica Olympus, PM-6, Tokio, Japón).

Los resultados de este examen histológico permitieron comprobar la localización de los electrodos, para los individuos pertenecientes al Grupo Experimental (microfotografías 1.1, y 1.2) y Control (microfotografías 1.3 y 1.4), teniendo en cuenta que el área destruida por la lesión es siempre mayor que la zona abarcada por la Estimulación Eléctrica.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES



Microfotografías 1.1 (arriba) y 1.2 (abajo): Localización del extremo del electrodo en un animal perteneciente al Grupo Experimental. Abajo, magnificación de la misma zona (X 2,5).



Microfotografías 1.3 (arriba) y 1.4 (abajo): Localización del extremo del electrodo en un animal perteneciente al Grupo Control. Abajo, magnificación de la misma zona (X 2,5).

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

RESULTADOS

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó un ANOVA Unifactorial Intrasujeto.

A uno de nuestros animales se le desprendió el implante durante la fase experimental, pero puesto que había recibido un ensayo en cada una de las condiciones experimentales sus datos fueron incluidos en el análisis.

Los resultados obtenidos muestran que los animales estimulados en el NPBL prefirieron el sabor asociado a estimulación [$F(1,11) = 11.33, p < 0.006^{**}$], mientras que no fueron significativas las diferencias en el Grupo Control [$F(1,9) = 0.007, p > 0.935$], lo cual apoya la idea de que podemos obtener efectos reforzantes en esta zona, además de los efectos aversivos, ampliamente estudiados.

Estos mismos sujetos no fueron capaces de aprender una respuesta operante tras ser sometidos a una prueba de autoestimulación.

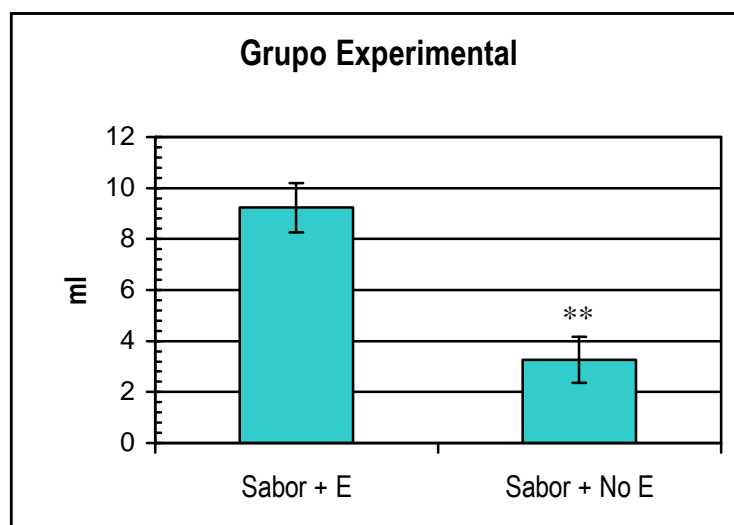


Figura 1.1: Valores medios de ingesta en Centímetros Cúbicos de ambos sabores (sabor + E y sabor + no E) manifestada por los sujetos del Grupo Experimental [$F(1,11)=11.33$, $p < 0.006^{**}$]

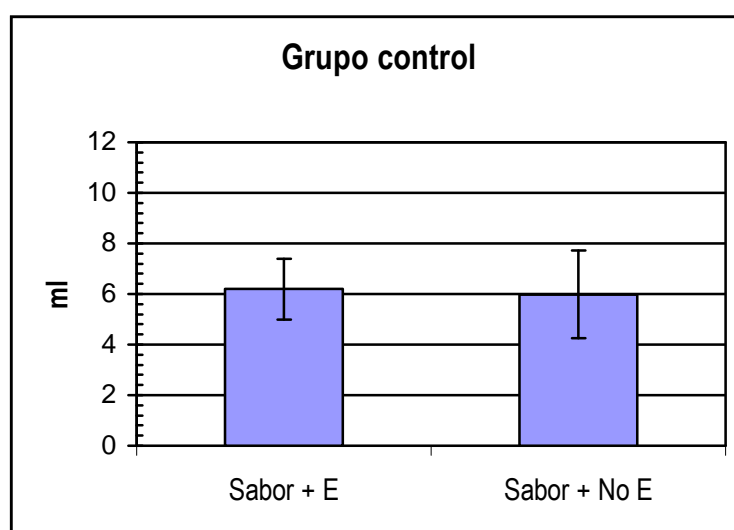


Figura 1.2: Valores medios de ingesta en Centímetros Cúbicos de ambos sabores (sabor + E y sabor + no E) manifestada por los sujetos del Grupo Control [$F(1,9)= 0.007$, $p < 0,935$].

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

DISCUSION

Los resultados obtenidos en este experimento demuestran que la estimulación eléctrica del NPBl genera una clara preferencia por los estímulos gustativos asociados y este efecto es específico anatómicamente, dado que al modificar la posición vertical del electrodo, el efecto desaparece. Asimismo, el procedimiento de balanceo de las condiciones experimentales hace improbable que el resultado sea debido a diferencias innatas en la preferencia por uno de los sabores. Por otro lado, los resultados preliminares en relación con el fallo en la adquisición de una conducta operante de autoestimulación nos permiten excluir la activación del circuito general de refuerzo.

Una posible interpretación de los resultados obtenidos podría hacerse en términos de Aprendizaje Interoceptivo de tipo reforzante/recompensante, pues se tiene constancia de que el Núcleo Parabraquial no solo está implicado en procesamiento gustativo y visceral, sino también en algunos procesos asociativos entre índices sensoriales gustativos y actividad neural sustitutiva de procesos biológicos. De hecho, investigaciones previas realizadas en nuestro laboratorio, han puesto de manifiesto que la Estimulación Eléctrica intracerebral de diversas estructuras como el Córtex Insular o el Área Postrema es capaz de inducir preferencias o aversiones gustativas (Gallo et al., 1988; Agüero et al., 1993b; Cubero & Puerto, 2000b).

Teniendo en cuenta que el NPB constituye uno de los primeros relevos centrales en el procesamiento de las señales tanto gustativas como viscerales, se podrían plantear dos hipótesis alternativas: Que la estimulación eléctrica actúe sobre células gustativas modificando su valor sensorial o hedónico, o bien que funcione como sustituto del estímulo visceral y/o de sus consecuencias motivacionales.

En relación con la primera posibilidad, dentro del Área Parabraquial se han identificado neuronas sensibles a las cualidades orosensoriales de los estímulos gustativos (dulce, amargo, ácido, salado...), que han sido localizadas tanto en la división medial como en la parte lateral. Estas células permiten discriminar entre ellos y muestran diversos patrones de respuesta excitatorios o inhibitorios, que llegan a ser máximos ante una determinada categoría sensorial o "estímulo adecuado" (Yamada et al., 1990; Halsell & Frank, 1992; Halsell & Travers, 1997; Yamamoto et al., 1994; Di Lorenzo & Monroe, 1997; Nishijo & Norgren, 1997). En concreto, en

estos experimentos se registraba la actividad de neuronas individuales ante estímulos gustativos simples o complejos -formados por mezcla de varios sabores-, observando células cuyo patrón de disparo era máximo ante una cualidad sensorial simple, y otras que respondían más intensamente ante combinaciones de varios estímulos gustativos, estando dispuestas todas ellas en capas alternas.

Estas u otras poblaciones de células parabraquiales codificarían también las propiedades motivacionales -apetitivas o aversivas- de tales estímulos gustativos (Yamamoto, 1993; Yamamoto et al., 1994; Monroe & DiLorenzo, 1995). Así por ejemplo, la infusión intraoral de una sustancia innatamente preferida como es la sacarina, probablemente genere activación de células 'hedónicas-positivas', mientras que la quinina, siguiendo la misma lógica, debería estimular el patrón de disparo de células 'aversivas' (Yamamoto et al., 1994).

Asimismo, se ha visto que el consumo de sustancias apetitivas genera inmunorreactividad en los núcleos PBI dorsal, PBI central y PBI externo -parte rostral- (Yamamoto et al., 1994; Yamamoto & Sawa, 2000a; 2000b), lo cual es compatible con la hipótesis de que la estimulación eléctrica llevada a cabo en el presente experimento pueda estar incidiendo sobre células sensoriales y/o motivacionales específicas del sistema gustativo, potenciando el substrato apetitivo del sabor asociado a la estimulación y haciéndolo especialmente atractivo para los sujetos. En relación con esta idea, otros autores -haciendo uso del Test de Reactividad Gustativa ideado por Norgren- han sugerido que el valor motivacional de los Estímulos gustativos se puede modificar mediante procesos de aprendizaje que implican la atribución de propiedades de incentivo, por los cuales el sabor asociado a la estimulación aumentaría su valor frente a otros estímulos presentes simultáneamente (Berridge, 1996; Berridge & Robinson, 1998).

Con respecto a la segunda posibilidad, a saber, que la Estimulación Eléctrica del NPBe funcione como sustituto del estímulo visceral y/o de sus consecuencias motivacionales, se tiene conocimiento de que la parte más rostral de este subnúcleo PBe, es una importante zona receptiva de aferencias viscerales (Yamamoto et al., 1992; Kobashi et al., 1993; Kobashi & Bradley, 1998; Gu et al., 1993; De la Calle & Saper, 2000) cuyo patrón habitual de respuesta podría haber sido reproducido mediante los parámetros concretos de estimulación elegidos en nuestro estudio. Como hipótesis de trabajo, es posible que la estimulación eléctrica del NPBe pueda actuar como sustituto del estímulo visceral y/o de sus consecuencias motivacionales,

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

tal y como se ha observado en experimentos previos de Aprendizaje Interoceptivo llevados a cabo en nuestro laboratorio (Gallo et al., 1988; Agüero et al., 1993b; Cubero & Puerto, 2000b). En este caso se podría estar activando de manera artificial un centro nervioso al cual es enviada la información visceral y cuya función sería la de modular la valoración que el sujeto hace del estímulo gustativo.

En efecto, los resultados de este experimento no permiten descartar, por el momento, un efecto visceral semejante al observado tras la administración intragástrica de algunos alimentos (Puerto et al., 1976a; 1976b), ya que los animales tienden a asociar estímulos gustativos con beneficios metabólicos, sobre todo, teniendo en cuenta que el NPBI externo ocupa una posición estratégica para recibir información visceral periférica relacionada con la ingesta (Ritter et al., 1994; Calingasan & Ritter, 1993; Wang et al., 1999; Yamamoto & Sawa, 2000 a; 2000b).

Siguiendo con la misma línea de razonamiento, investigaciones recientes han puesto de manifiesto que en las lesiones se observa lo contrario. Es decir, que el bloqueo de la zona lateral del Núcleo Parabraquial provoca un descenso considerable en el consumo de sustancias naturalmente preferidas, como la sacarosa o el cloruro sódico –mas marcado en períodos de 24 horas, y menor en test de ingesta de 15 minutos de duración-, así como en aquellas otras que han adquirido propiedades reforzantes –apetitivas- como consecuencia de un proceso de aprendizaje (Reilly & Trifunovic, 2000a; 2000b), probablemente al eliminar las señales acerca de las consecuencias postingestivas de estas sustancias.

Es decir que, en el estado preliminar de esta investigación, no puede excluirse la posibilidad de que el aprendizaje pueda deberse a la actuación sobre una zona de refuerzo nutritivo. De hecho, los estudios clásicos de Grill y Norgren pusieron de relieve que el Tronco Cerebral posee los mecanismos básicos necesarios para regular la conducta ingestiva en función del estado nutricional de los sujetos (Grill & Norgren, 1978a; 1978b; Grill & Kaplan, 1992). En la explicación del presente experimento, se podría hipotetizar que las manipulaciones llevadas a cabo en la zona del NPBI podrían reproducir la actividad neuronal evocada por la llegada de señales periféricas de déficit-saciación, o bien de modificar sus consecuencias motivacionales apetitivas o aversivas. Existen datos a favor de una y otra idea:

Tras la llegada de nutrientes al intestino se produce la liberación de varias hormonas, entre ellas la colecistoquinina, la cual transmite información al cerebro

por vía vagal, generando sensaciones de saciedad (Gibbs et al., 1993; Leibowitz, 1992; Ritter et al., 1992a). Algunos estudios señalan que la CCK periférica es procesada por el NPBl (Li & Rowland, 1995; Trifunovic & Reilly, 2001a) y por tanto, la estimulación eléctrica del núcleo citado podría simular el patrón de actividad evocado por esta sustancia. Dado que los animales utilizados en este experimento disponían de una cantidad muy limitada de comida (15 gr. diarios), la generación de señales de saciedad tras un estado prolongado de déficit puede ser interpretado por el organismo de forma positiva.

Por otra parte, la relevancia del Área Parabraquial en nutrición ha sido examinada disociando el papel de los distintos subnúcleos que forman el complejo. Así, se ha sugerido que la región Parabraquial lateral externa participa en el procesamiento de información acerca de los niveles periféricos de determinados productos metabólicos mediadores de la ingesta, como lípidos y carbohidratos (Calingasan & Ritter, 1993; Ritter et al., 1994; Hoebel, 1997; Wang et al., 1999), pues estas señales son enviadas a niveles centrales haciendo uso de una vía vagal y/o humoral, relacionadas anatómicamente con el NPB lateral externo (Ritter et al., 1992a; 1994; Herbert & Bellintani-Guardia, 1995).

Finalmente, nuestros datos podrían ser compatibles también con otra línea de investigación, en la cual, la administración intraparábraquial de fármacos agonistas de los receptores 5-HT_{1B} en la zona lateral, redujo el número de comidas y aumentó los períodos de inactividad, imitando el efecto de saciación mediada por serotonina (Lee et al., 1998). En este sentido, Lança y Van der Kooy identificaron una conexión serotoninérgica procedente del Área Postrema, mediante la inyección de un marcador retrógrado en la región parabraquial lateral (Lança & Van der Kooy, 1985). Pero, por otro lado, hay que tener en cuenta que la técnica de estimulación eléctrica es muy precisa en cuanto a localización anatómica, pero indiscriminada respecto a su actuación sobre cuerpos celulares o fibras de paso y a las características neuroquímicas de estos (Wise & Rompré, 1989), con lo cual son necesarios nuevos experimentos para dilucidar estas cuestiones.

Los datos obtenidos en este estudio podrían ser compatibles igualmente con los resultados de experimentos que muestran cómo ciertas manipulaciones cerebrales pueden modificar específicamente las consecuencias hedónico-motivacionales de la ingesta:

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

En este sentido, lesiones de la zona lateral del NPB atenúan la sobreingesta de estímulos gustativos muy apetitosos (galletas), generada por eliminación del Área Postrema (Edwards & Ritter, 1989). Teniendo en cuenta que la destrucción de una zona primaria receptiva de información periférica, como es el Área Postrema, elimina la información disponible sobre el estado nutricional del individuo, el NPBI parece importante en la modulación de la valoración hedónica positiva de ciertos estímulos gustativos 'innatamente preferidos'.

Por otro lado, algunas sustancias que incrementan la ingesta, como el midazolam, al parecer, actuando sobre su substrato hedónico (Treit & Berridge, 1990; Berridge & Pecina, 1995; Cooper & Higgs, 1994; 1996), tuvieron un efecto estimulador cuando fueron inyectadas en esta zona parabraquial lateral (Söderpalm & Berridge, 2000). Sin embargo, debe tenerse en cuenta también la participación de otras estructuras cerebrales interconectadas con el NPB, como el hipotálamo lateral, en la modulación de las consecuencias apetitivas/ aversivas de la ingesta (Moufid-Bellancourt & Velley, 1994).

Por otra parte, la manifestación de preferencias gustativas en este experimento se ha logrado bajo un paradigma de contigüidad estimular. Estos resultados, podrían ser compatibles con otros obtenidos previamente en nuestro laboratorio, en los que se utilizó como estímulo visceral la administración intragástrica de nutrientes (Puerto et al., 1976a; 1976b) y también con los obtenidos en tareas de aprendizaje aversivo gustativo, ya que implican específicamente al NPBI en un sistema de memoria a 'corto plazo' en el que las lesiones de este subnúcleo eliminaron el Aprendizaje 'concurrente' dejando intacto el 'secuencial' o 'demorado' (Mediavilla et al., 2000), pero se necesitan nuevas investigaciones para establecer una conclusión definitiva. No obstante, los resultados obtenidos en los siguientes capítulos de esta Tesis permitirán aportar nuevos datos para abordar cuestiones relativas a la contigüidad.

Una tercera propuesta explicativa acerca de las preferencias gustativas inducidas en este estudio, podría relacionarse con la activación de vías nerviosas de 'refuerzo general' sobre las que parecen actuar algunas sustancias psicoactivas, y particularmente con la activación del sistema opiáceo (Carr et al., 1991; Carr & Papadouka, 1994; Papadouka & Carr, 1994; Gutstein et al., 1998). Así, en el Área Parabraquial lateral –y en concreto en los subnúcleos externo, ventral, interno y N. de Kolliker- se han localizado aferencias procedentes de neuronas del NTS reactivas

a encefalinas (Maley & Panneton, 1988; Hermanson & Blomqvist, 1997; Pego-Reigosa et al., 2000), y cantidades notables de receptores μ y k ; los primeros de ellos son especialmente abundantes en el extremo lateral (Mansour et al., 1994; 1995; Ding et al., 1996; Hermanson et al., 1998; Chamberlin et al., 1999).

Los estudios llevados a cabo por Van der Kooy y asociados señalan que esta estructura (NPBI) puede ser clave en la mediación de las propiedades discriminativas de la morfina, asignándole un papel facilitador del aprendizaje de asociaciones (Jaeger & Van der Kooy, 1993; 1996), pero fracasan a la hora de demostrar la capacidad del NPB para sustentar los aspectos reforzantes de esta sustancia en paradigmas de condicionamiento a señales exteroceptivas o interoceptivas (Jaeger & Van der Kooy, 1996). En efecto, las inyecciones intraparábraquiales de morfina fracasaron a la hora de generar consecuencias motivacionales positivas, tras ser asociadas con localizaciones espaciales o índices gustativos. Resultados opuestos se obtuvieron en el ATV, a saber, la inyección local de este producto generó preferencia por el sabor y el lugar con que fue asociada pero no demostró capacidad para actuar como estímulo discriminativo. En nuestro caso, a diferencia de los hallazgos del grupo de Van der Kooy, podría especularse que la estimulación eléctrica del núcleo parabraquial lateral externo habría activado algún sistema neurobiológico reforzante en el que la contigüidad temporal fuera decisiva y, quizás, relacionado en última instancia con la activación del Sistema Dopaminérgico Mesolímbico (Spanagel et al., 1992; Shippenberg et al., 1993; 1995; Bals-Kubik et al., 1993), aunque son muchos los pasos que quedan por dilucidar para probar esta hipótesis de trabajo.

En este contexto, no se puede descartar la participación de los sistemas opiáceos asociados estrechamente con el alivio del dolor. De hecho, Le Magnen propuso que 'refuerzo' y 'modulación del dolor' podrían ser mediados por substratos neurales parcialmente superpuestos (Le Magnen et al., 1980).

Así, algunos autores han comprobado que el área parabraquial es capaz de modular las respuestas neuronales evocadas por estímulos nocivos localizados a nivel cutáneo y/o profundo, provocando su inhibición (Chen Yu Chiang et al., 1995). En efecto, parte de la información visceral que recibe el NPB es de carácter nociceptivo, formando parte del sistema Espino- (Trigémico)- Parabraquio-hipotalámico y Espino- (Trigémico)- Parabraquio- Amigdaloides. Tiene su origen en las astas dorsales medulares (L. I y II, principalmente) y proyecta hacia los subnúcleos laterales externo, dorsal y superior, antes de continuar su trayectoria

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

hacia estructuras mesencefálicas y diencefálicas (Bernard et al., 1991; Light et al., 1993; Bernard et al., 1994; Bester et al., 1995). Podría plantearse la hipótesis de que la estimulación eléctrica del NPBe haya podido activar de algún modo un mecanismo de analgesia opiácea. En efecto, nuestros datos son compatibles con los de otros experimentos en los que la administración de morfina, tras su asociación con un estímulo gustativo en un paradigma no demorado, fue capaz de inducir analgesia, y este efecto desapareció al introducir un intervalo temporal de seis horas (Bardo & Valone, 1994) Además, resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio mediante la administración de naloxona, apuntan en esta misma dirección (García-Perez et al., en preparación).

Por otra parte, hallazgos recientes en otras zonas cerebrales han permitido sugerir que diferentes tipos de refuerzo -nutritivo, inducido por sustancias de abuso o por estimulación- podrían compartir el mismo substrato neuroanatómico (Nader & Van der Kooy, 1994; Berman et al., 1994; Wolinsky et al., 1994; 1996). Así, algunos investigadores han puesto de manifiesto que la restricción crónica de comida genera alteraciones en los niveles de receptores opiáceos de determinadas regiones cerebrales (Wolinsky et al., 1994). Concretamente, en el Área Parabraquial se observó un descenso de los receptores μ en los núcleos PBe y PBme, así como un incremento de los receptores k en el NPBe (Wolinsky et al., 1996).

Teóricamente relacionado con los resultados de este estudio, son los experimentos que han logrado inducir Autoestimulación Intracerebral activando algunas zonas parabraquiales, fundamentalmente en la división medial –tercio medio del NPBm- (Ferssiwi et al., 1989). Sin embargo no se tiene conocimiento de ningún caso de autoestimulación en el NPBe externo. Los intentos realizados en nuestro laboratorio han dado resultados negativos; de hecho, los animales no soportan los estímulos eléctricos que se aproximan a los que son habituales en la estimulación de otras zonas cerebrales como, por ejemplo, en el hipotálamo lateral.

En este modelo de autoestimulación intracerebral, de gran utilidad para el estudio de las bases biológicas del refuerzo, una característica llamativa es el hecho de que su efecto reforzante permite demoras entre la conducta operante y la administración de los pulsos eléctricos (Capdevila et al., 1988), a diferencia de lo observado hasta ahora en el NPBe. Por el momento no se dispone de pruebas concluyentes que permitan una explicación convincente sobre estas diferencias.

En resumen, este experimento muestra que la Estimulación Eléctrica del NPBe es reforzante y que los sujetos son capaces de aprender esta asociación de índices gustativos con estimulación eléctrica sustitutiva de procesos biológicos aún no bien determinados, mostrando preferencias, en un paradigma de contigüidad estimular.

CAPÍTULO II

PREFERENCIAS Y AVERSIONES GUSTATIVAS INDUCIDAS POR ESTIMULACIÓN ELECTRICA DEL NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL EXTERNO EN TAREAS DE APRENDIZAJE DISCRIMINATIVO GUSTATIVO

EXPERIMENTO 2

Preferencias y Aversiones Gustativas inducidas por Estimulación Eléctrica del Núcleo Parabraquial Lateral Externo en Tareas de Aprendizaje Discriminativo Gustativo

En el experimento anterior se encontró que la Estimulación Eléctrica del NPLe genera preferencia por los estímulos gustativos con que es asociada. Sin embargo, en una minoría de los animales, la Estimulación Eléctrica de esta zona PLe no tuvo efectos reforzantes sino aversivos, lo cual puede ser un efecto aleatorio. Una posibilidad alternativa que cabría plantear es que en esta zona existan células implicadas en el procesamiento de eventos tanto aversivos como apetitivos, y que la activación de uno u otro sistema mediante estimulación eléctrica, puede conducir a la aparición de conductas de preferencia o rechazo por el sabor asociado a la estimulación.

Numerosas investigaciones han puesto de manifiesto el papel que las dos divisiones principales del Complejo Parabraquial -medial y lateral- desempeñan en el procesamiento de la información gustativa, viscerosensorial y nociceptiva, siguiendo rutas ascendentes y en gran parte, paralelas (Norgren & Leonard, 1971; Hill, 1987; Herbert et al., 1990; Moga et al., 1990; Edwards & Johnson, 1991; Halsell, 1992; Di Lorenzo & Monroe, 1992; 1997; Davis, 1991; Krukoff et al., 1993; Bernard et al., 1993; Saleh & Cechetto, 1993; Slugg & Light, 1994; Alden et al., 1994; Jia et al., 1994; Saper, 1995a; Yoshida et al., 1997; Bester et al., 1997; Nishijo & Norgren, 1997; Halsell & Travers, 1997; Tkacs & Li, 1999; De la Calle & Saper, 2000; Krukoff & Loewy, 2000; Reilly & Trifunovic, 2000a y 2000b, etc.). En este sentido, algunos autores han propuesto la existencia en esta región, de áreas de convergencia de información gustativa y visceral (Herman & Rogers, 1985; Yamamoto et al., 1994; Karimnamazi et al., 2002), una alternativa que hay que considerar a la hora de determinar el papel de esta zona en algunas conductas innatas y aprendizajes de carácter asociativo.

Así, investigaciones llevadas a cabo en este y otros laboratorios han puesto de manifiesto el papel de esta estructura anatómica en el Aprendizaje Aversivo Gustativo, un tipo de aprendizaje en el que el sujeto aprende a rechazar estímulos gustativos que han sido previamente asociados con la inducción de malestar gastrointestinal (Di Lorenzo, 1988; Agüero et al., 1993a; 1993b; 1997; Spector et al., 1992; Yamamoto et

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

al., 1992; 1994; Swank & Bernstein, 1994; Bielavska & Bures, 1994; Scalera et al., 1995; Nader et al., 1996; Sakai et al., 1997; Shimura et al., 1997; Reilly et al., 1993; Reilly, 1999; Reilly & Trifunovic, 2000a; 2000b; Cubero & Puerto, 2000b; Cubero et al., 2001).

Con respecto al NPBe, al ser un importante relevo de la información viscerosensorial, también se le ha relacionado específicamente con este tipo de Aprendizaje Aversivo Gustativo (Yamamoto et al., 1992; Mediavilla et al., 2000; Sakai & Yamamoto, 1997), sobre todo cuando los estímulos gustativo-visceral son presentados concurrentemente, es decir, siguiendo un paradigma ‘a corto plazo’ o simultáneo (Mediavilla et al., 2000), y todo ello, independientemente de si el denominado EI es un irritante abdominal –irradiación, rotación corporal...-, un agente emético -sulfato de cobre, CILi,...-, o una droga de abuso –cocaína, morfina, anfetaminas...- (Sakai & Yamamoto, 1997). Asimismo, las lesiones parabraquiales que incluyen este subnúcleo, interrumpen el AAG inducido por drogas como la morfina (Bechara et al., 1993; Nader et al., 1996) lo cual no resulta sorprendente si se tiene en cuenta que los efectos aversivos de los opiáceos se originan fundamentalmente a nivel periférico, y son transmitidos al SNC por vía vagal.

Como se ha mencionado anteriormente, el Área Parabraquial es también un importante núcleo de relevo de la información nociceptiva procedente de la periferia. Forma parte del Sistema Espino-(Trigémico)-Pontoamigdaloides, un sistema que se origina en diversas poblaciones neuronales situadas en las astas dorsales medulares (láminas I y II) y trigeminales, transmitiendo la información nociceptiva –en paralelo- hacia centros autonómicos y cognitivos del cerebro, donde tiene lugar el procesamiento afectivo-emocional, autonómico y visceral de estos eventos negativos (Bernard et al., 1991; 1994; 1995; Bester et al., 1995; 1997; Light et al., 1993; Saper, 1995a; Jasmin et al., 1997; Craig & Dostrovsky, 1999).

Estudios realizados mediante técnicas inmunohistoquímicas muestran que la zona parabraquial lateral y ventrolateral queda marcada tras la aplicación de estímulos que provocan dolor ‘lento’, por ejemplo, a través de la inyección de formalina en la región perioral de la rata o de una alga marina conocida como ‘chondrus crispus’ -en inglés, ‘carrageenan’- intraplantar (Wang et al., 1994; Buritova et al., 1998). Aunque muchas de las aferencias medulares no entran en la parte interna de este núcleo PBe y pocas llegan a la parte interna, se ha visto que la mayoría de éstas finalizan en la subdivisión ventral de este subnúcleo descrita por Herbert (Herbert & Bellintani-

Guardia, 1995; Saper, 1995a) desde donde parten las principales vías eferentes de este sistema hacia los siguientes relevos diencefálicos y prosencefálicos -Amígdala, N. Lecho de la Estría Terminal, Tálamo e Hipotálamo- de esta vía (Bernard et al., 1991; 1994; 1995; Bester et al, 1995; 1997; Saper, 1995a; Jasmin et al., 1997).

Por último, algunos autores han identificado no solo células hedónicas-positivas, sino también hedónicas-negativas en la zona parabraquial lateral y ventrolateral (incluyendo la subdivisión externa), que procesan información relacionada con situaciones aversivas o conductas de rechazo (Yamamoto et al., 1994) así como receptores opiáceos κ , cuya activación provoca efectos aversivos (Lynch et al., 1985; Wolinsky et al., 1996; Shippenberg & Elmer, 1998).

En resumen, el Área Parabraquial, y en concreto el extremo ventrolateral, ha sido relacionado no solo con procesos motivacionales de carácter reforzante, como vimos en el capítulo anterior (Edwards & Ritter, 1989; Calingasan & Ritter, 1993; Hoebel, 1997; Söderpalm & Berridge, 2000; Reilly & Trifunovic, 2000a; 2000b;...), sino también con procesos aversivos (Yamamoto et al., 1992; Mediavilla et al., 2000; Sakai & Yamamoto, 1997; Bechara et al, 1993; Nader et al., 1996; Bernard et al., 1991; 1994; 1995; Bester et al, 1995; 1997; Saper, 1995a; Jasmin et al., 1997).

Para poner a prueba esta hipótesis, un grupo de animales experimentales fue sometido a un procedimiento experimental similar al utilizado en el experimento 1, consistente en hacer que los animales asocien un sabor con estimulación eléctrica del NPBe y otro sabor con ausencia de estimulación. Se tomó como medida dependiente la cantidad de cada estímulo gustativo que el animal ingiere cuando ambos se presentaban simultáneamente. Si nuestros datos, como esperábamos, volvían a poner de manifiesto la presencia de variabilidad interindividual en el sentido de que unos animales se decantaban por el sabor asociado a la estimulación y otros por el sabor no asociado a estimulación, los animales serían sometidos a un segundo procedimiento de aprendizaje similar al anterior, pero con claves gustativas y espaciales diferentes. Finalmente analizamos la correlación entre ambos grupos de datos para ver si el efecto era aleatorio o se mantenía estable para cada sujeto experimental, con lo que se demostraría la consistencia del efecto.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

MÉTODO

SUJETOS

Para este experimento fueron utilizadas 22 ratas macho de la raza Wistar, procedentes del animalario de la Universidad de Granada, cuyos pesos, al inicio del experimento, estaban comprendidos entre 255 y 305 gramos.

Los sujetos fueron agrupados de cuatro en cuatro y alojados en jaulas de metacrilato de 30x15x30 cm cuyas paredes laterales eran de color negro, y transparentes la parte anterior y posterior. Disponían de agua y comida ad libitum, y las condiciones de temperatura fueron mantenidas de forma constante entre 22°-24°C, así como la luminosidad, según un ciclo de 12:12 horas de luz-oscuridad, encendiéndose las luces a las 8:30h. y apagándose a las 20.30 h. Permanecieron en esta situación durante cinco días de adaptación antes de ser intervenidos quirúrgicamente. La cirugía y todas las pruebas experimentales fueron llevadas a cabo durante el periodo de luz.

De estos animales, dos tuvieron que ser eliminados tras la recuperación de la fase quirúrgica por presentar conducta de giro y otros dos fueron excluidos del análisis al desprendérseles el implante durante la fase experimental.

PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO:

La cirugía para el implante de electrodos fue realizada bajo anestesia (Pentotal Sódico, en dosis controladas de 50 mg/Kg), siguiendo un procedimiento idéntico al descrito en el experimento anterior (Capítulo I). Al finalizar la intervención, todos los animales recibieron, como medida preventiva, una dosis intramuscular de 0,1 cc. de penicilina (Penilevel retard. Lab. Level, S.A. Barcelona).

Las coordenadas estereotáxicas para el implante de un electrodo monopolar en el NPble fueron idénticas a las del Grupo Experimental descrito en el capítulo 1 de esta Tesis (AP= -0,16; V=3; L=± 2,5 en base a la referencia interaural, con una inclinación del cráneo de -3,3 mm. según el atlas de Paxinos & Watson [1996]).

Concluida la operación, todos animales fueron instalados individualmente en jaulas con las características que se describieron en el experimento anterior, donde permanecieron durante una semana de recuperación con comida y agua "ad libitum" .

PREENTRENAMIENTO Y PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:

Ambos fueron idénticos a lo descrito en el Experimento 1, pero tras la finalización, se mantuvo a los animales durante un periodo de descanso de 2 semanas con comida y agua 'ad libitum'. Posteriormente, los animales fueron asignados a nuevas localizaciones en las jaulas y dentro de ellas, de manera que no se produjera transferencia del primer experimento al segundo, en el aprendizaje egocéntrico y espacial, repitiendo a continuación todo el proceso.

Una vez instalados los animales en su nueva localización, se repitió el mismo procedimiento experimental (Fase II), con la única excepción de que se utilizaron dos nuevos estímulos gustativos, "Vainilla" y "Limon", preparados en una concentración de 0,5 cc. de extracto por cada 100 ml. de agua (McCormick, Co. Inc. San Francisco, California) y presentados en días alternos, uno de los cuales era seguido inmediatamente por la estimulación eléctrica del NPBL. (Ver detalles sobre el procedimiento en las Tablas 2.1 y 2.2).

Para la estimulación eléctrica del NPBL se utilizó corriente directa pulsante, administrada en pulsos individuales de 0,1 ms. de duración y con una diferencia de potencial que oscilaba entre 1,5 y 1,7 V. La frecuencia era de 66,6 c.p.s., suministrados por un estimulador Letica LI12100 (Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain) conectado a un osciloscopio "Telequipment DM63" (Textronic Ltd, London, U.K.) que permitía controlar visualmente los parámetros de la estimulación. Por último hay que señalar que, los pulsos de corriente cuyos parámetros han sido descritos anteriormente, fueron administrados, para un grupo de 10 animales, en sesiones de 15 minutos de duración. Los restantes 8 animales, recibieron la estimulación en sesiones de 30 minutos, en las que se iban alternando 30 segundos de estimulación con otros 30 de descanso. Dado que, considerados globalmente, todos los animales llegaron a recibir, en cada ensayo, pulsos de estimulación eléctrica durante 15 minutos y no hubo diferencias significativas entre ellos, los datos de ambos grupos fueron combinados a la hora de estudiar la consistencia de la conducta de los animales en dos fases experimentales.

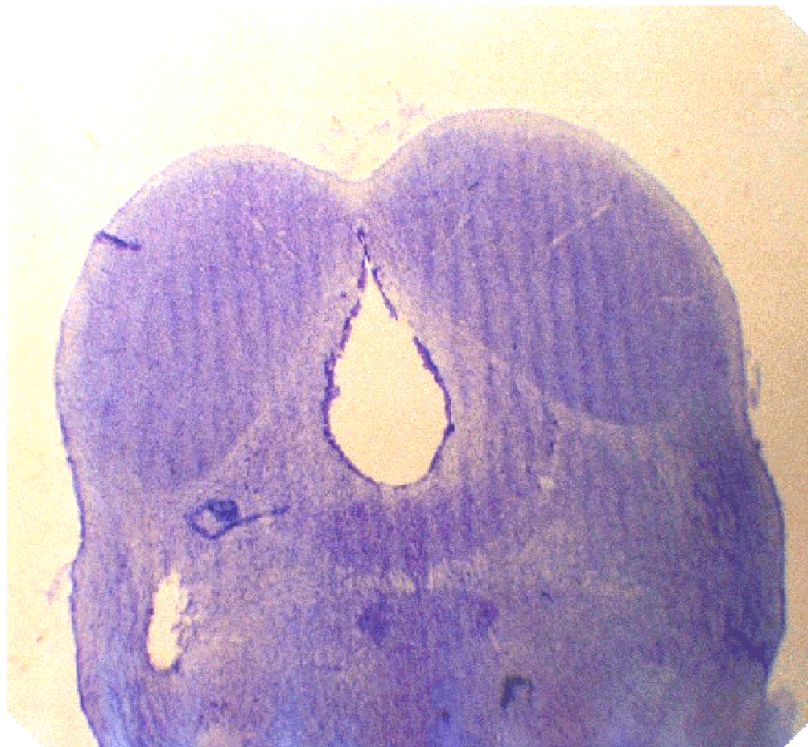
En la primera parte (Fase I), la mitad de los animales fueron estimulados tras consumir "F" y el resto tras la ingesta de "C", siguiendo un procedimiento de control intrasujeto. En la segunda parte (Fase II), el 50% de los sujetos recibieron la estimulación eléctrica tras ingerir "V" y el otro 50% después de beber "L".

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

Al concluir cada fase de entrenamiento, los animales dispusieron simultáneamente de dos buretas con los sabores previamente presentados (“F” y “C” en la primera fase; “V” y “L” en la segunda), durante los 7 minutos establecidos y en la misma posición en que habían sido presentados durante los días del período de adquisición. Se registraron las cantidades que cada individuo consumió de una y otra, y al finalizar, la bebida fue retirada y los animales dispusieron de comida y agua "ad libitum". (Para mas detalles sobre el procedimiento experimental, consultar Tabla 2 .1).

HISTOLOGÍA:

Concluido el experimento, los animales fueron perfundidos transcárdialmente con 100 ml. de suero fisiológico y otros 100 ml. de formaldehído al 4%, disuelto en Suero Fisiológico. El tejido nervioso fue cortado en secciones coronales de aproximadamente 50 micras de grosor, montado y teñido siguiendo el procedimiento descrito en el experimento anterior (Ver Microfotografía 2.1).



Microfotografía 2.1: Preparación histológica teñida con Violeta de Cresilo en donde se muestra la localización de una pequeña lesión en la zona del extremo del electrodo representativa de las realizadas en los animales del experimento 2.

FASE I	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Prueba
Grupo A	FR. izq.	CO. der.			FR. izq.
	+	+	= Día 1°	= Día 2°	
1/2 suj	Estimul. (15 min.)	No-estim. (15 min.)			CO. der. (7 min.)
Grupo B	FR. izq.	CO. der.			FR. izq.
	+	+	= Día 1°	= Día 2°	
1/2 Suj	No-estim. (15 min.)	Estimul. (15 min.)			CO. der. (7 min.)

ASIGNACIÓN AL AZAR

FASE II	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Prueba
Grupo A	LI. izq.	VA. der.			LI. izq.
	+	+	= Día 1°	= Día 2°	
1/2 suj	Estimul. (15 min.)	No-estim. (15 min.)			VA. der. (7 min.)
Grupo B	LI. izq.	VA. der.			LI. izq.
	+	+	= Día 1°	= Día 2°	
1/2 Suj	No-estim. (15 min.)	Estimul. (15 min.)			VA. der. (7 min.)

Tabla 2.1: Diagrama que muestra las condiciones experimentales balanceadas utilizadas en el Experimento 2, para determinar si los animales son capaces de adquirir una tarea de aprendizaje discriminativo gustativo, y ser consistentes en su ejecución, independientemente del sabor utilizado. Se utilizaron como estímulos gustativos fresa (FR.) y coco (CO) en la primera fase, y vainilla (VA.) y limón (LI.) en la segunda. En cada fase, se hizo que la mitad de los sujetos asociaran la Estimulación con un sabor, y el resto de los animales lo hicieran con el otro sabor. Entre las Fases I y II, se estableció un periodo de descanso en el que se cambió la posición de las jaulas y la localización de los animales dentro de las jaulas.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

FASE I	1 / 2	3 / 4	5 / 6	7 / 8	18 / 17
	16 / 15	14 / 13	12 / 11	10 / 9	
FASE II	17 / 18	13 / 14	10 / 9	15 / 16	11 / 12
		4 / 3	8 / 7	2 / 1	6 / 5

Tabla 2.2: Procedimiento de aleatorización llevado a cabo en el Experimento 2. Las dos filas de la primera fase muestran la posición inicial de las jaulas y de los animales dentro de las jaulas. Tras la finalización de esta Fase I, se asignó a los animales a nuevas localizaciones espaciales y a nuevas posiciones dentro de cada jaula, como se muestra en las filas correspondientes a la Fase II.

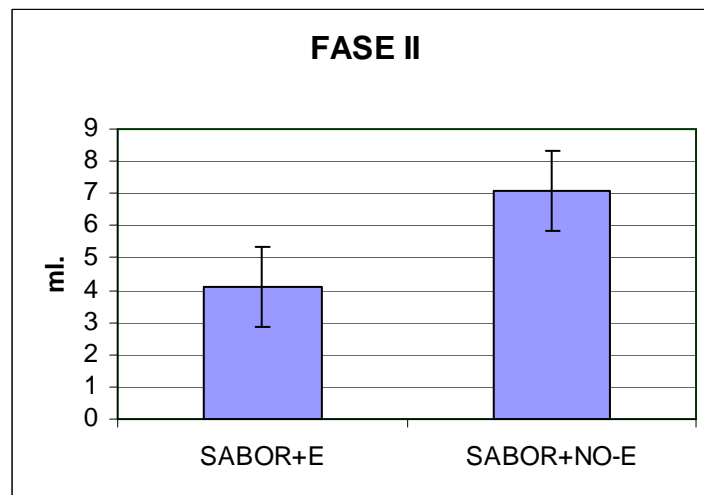
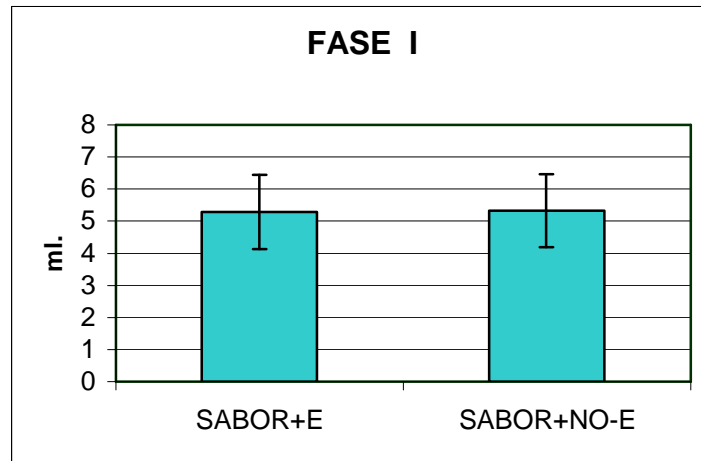
RESULTADOS:

Para el Análisis Estadístico de los resultados, en primer lugar se aplicó un Análisis de Varianza Unifactorial con Medidas Repetidas, en cada una de las fases del experimento. Dada la variabilidad interindividual existente entre la ingesta de uno y otro sabor por parte de los animales, se encontró que no había diferencias significativas entre las cantidades ingeridas del Sabor asociado a la Estimulación del NPBL e y Sabor no asociado a Estimulación en la fase I del experimento [$F(1,17)= 0.0001$, $p<0.987$], ni tampoco en la Fase II, en la que el procedimiento era idéntico aunque cambiando las claves gustativas y espaciales [$F(1,17)= 1.473$, $p<0,241$]. (Ver figuras 2,1 y 2.2 para comparar la ingesta de sabor asociado a estimulación y no asociado a estimulación en las fases I y II del procedimiento experimental).

A continuación, para cada sujeto se obtuvieron datos diferenciales, es decir, se calculó la diferencia entre la ingesta de sabor asociado a Estimulación Eléctrica del NPBL e y la cantidad de sabor no asociado a estimulación que cada sujeto bebió en cada una de las fases del experimento, y luego se analizó la correlación existente entre ambos grupos de datos.

Especialmente interesantes son los resultados que muestran que el valor del Contraste relativo al Coeficiente de Correlación de Pearson calculado para los pares de datos de las fases I y II del presente experimento resulta significativo (**$r = 0,70508$** ; **$p>0.001^{**}$**), lo cual indica un alto grado de consistencia en la ejecución de los sujetos en ambas fases. (Ver figura 2.3 para apreciar la matriz de correlación y el intervalo – superficie acotada- en el que deben encontrarse los valores estimados a partir de una de las fases).

ESTUDIOS EXPERIMENTALES



Figuras 2.1 (superior) y 2.2 (inferior): Valores medios de ingesta en ml. del sabor asociado a la estimulación eléctrica del NPBl e y del sabor no asociado a la estimulación (sabor + E, sabor + NE) durante la fase I [$F(1,17)= 0.0001$, $p<0.987$] (arriba), y la fase II [$F(1,17)= 1.473$, $p<0,241$] (abajo) del procedimiento experimental llevado a cabo en el Experimento 2.

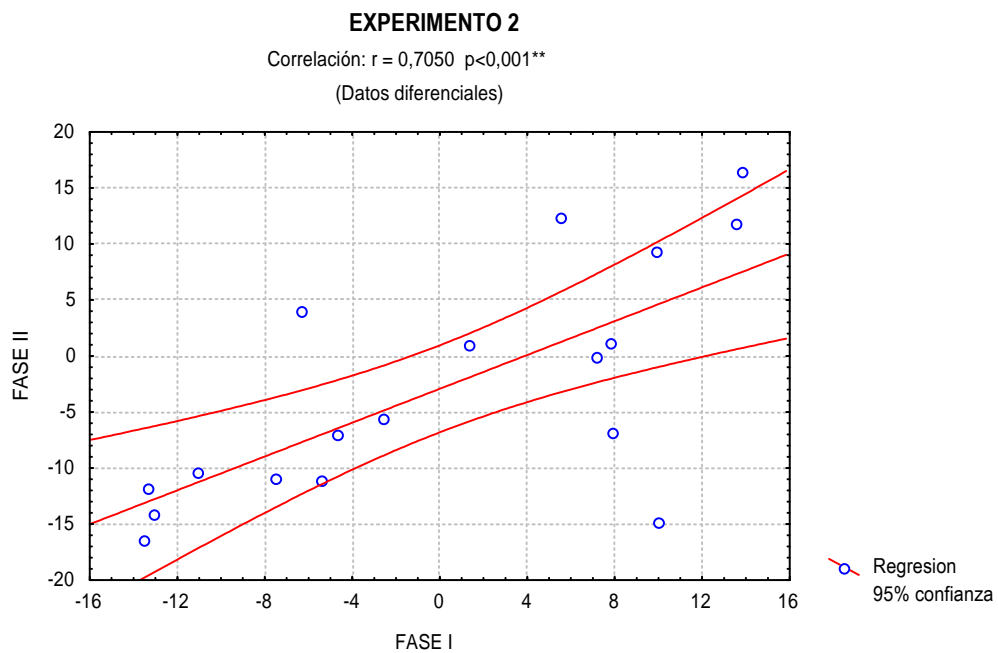


Figura 2.3: Matriz de correlación para los datos de cada sujeto en las Fases I y II del Experimento 2 ($r = 0,7050$, $p > 0.001^{**}$). El área comprendida entre las dos líneas curvas de color rojo, representa la superficie estimada en que se prevé caigan los puntos a partir de la ejecución de cada sujeto en las dos fases del experimento, con un intervalo de confianza del 95%.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo ponen de manifiesto que la Estimulación Eléctrica del NPBl puede generar tanto preferencias como aversiones hacia los estímulos gustativos asociados, y este efecto se mantiene de manera consistente para la mayoría de los sujetos experimentales a pesar de las modificaciones introducidas en el tipo de estímulos gustativos presentados y a pesar, también, de los cambios espaciales y de los requerimientos de reorganización egocéntrica impuestos a los animales.

Aunque al comparar las cantidades del estímulo gustativo asociado a 'estimulación' con las del estímulo gustativo 'no asociado a estimulación' en cada fase, se obtienen resultados no significativos –aleatorios–, el análisis de los datos obtenidos por cada sujeto individualmente en cada una de las dos fases experimentales, muestra que la mayoría de los individuos se decantan repetidamente bien por el sabor asociado a la Estimulación Eléctrica del NPBl o bien por el sabor alternativo, y son pocos los animales que alternan entre ellos (para consultar datos directos, ver tabla 2.1 en el Anexo II). Dado que dicho patrón de preferencia/rechazo se mantiene de manera consistente en la siguiente fase, podemos concluir que dicho resultado no es aleatorio '*dentro*' de un mismo individuo, pero sí podemos encontrar diferencias '*entre*' individuos. Es decir que aquellos animales que inicialmente preferían el sabor asociado a la estimulación, siguen eligiéndolo en la segunda parte y aquellos otros que mostraban preferencia por el sabor alternativo, la siguen manifestando, independientemente del estímulo gustativo asociado. Por tanto, los datos apoyan la hipótesis de que la Estimulación Eléctrica del NPBl puede generar tanto preferencias como aversiones hacia los estímulos gustativos asociados y este efecto se mantiene estable para cada individuo.

Investigaciones previas, llevadas a cabo en nuestro laboratorio, han puesto de manifiesto que la estimulación eléctrica puede actuar como sustituto eficaz de las señales viscerales en procesos de Aprendizaje Aversivo Gustativo (Gallo et al., 1988; Agüero et al., 1993a; Cubero & Puerto, 2000a), lo cual hace pensar que los datos del experimento presentado ahora son compatibles con los de otros autores quienes implican al NPBl lateral en aprendizaje gustativo tanto apetitivo como aversivo (Agüero et al., 1993a; Mediavilla et al., 2000; Reilly & Trifunovic, 2000b). En esta misma línea, otros autores han observado inmunorreactividad en el NPBl tras la administración intragástrica de distintas sustancias químicas generadoras tanto de preferencias como de aversiones condicionadas –sacarosa, lactosa, etanol, cloruro de litio–, efecto que

desaparece tras la sección del nervio vago o es menor si el procedimiento de infusión de estas mismas sustancias es intraoral en lugar de intragástrico (Yamamoto & Sawa, 2000a; 2000b).

La implicación del NPBlé ha podido ser demostrada en modelos de aprendizaje aversivo gustativo ‘concurrente’, es decir, cuando hay contigüidad estimular, y, por lo tanto, no se introdujo ninguna demora entre la ingesta y la estimulación. En efecto, Mediavilla y colaboradores, realizando una intervención opuesta a la estimulación eléctrica –lesión en el NPBlé- han demostrado una interrupción en este aprendizaje aversivo gustativo ‘concurrente’ o ‘a corto plazo’ (Mediavilla et al., 2000). Dado que en el presente experimento tampoco se introduce demora entre la ingesta del estímulo gustativo y la estimulación, podríamos concluir, a la luz de estas investigaciones, que el NPBlé puede ser un núcleo de relevo importante para el condicionamiento cuando las demandas temporales impuestas son importantes.

Otra posibilidad explicativa apunta a que la Estimulación Eléctrica del NPBlé pueda haber incidido sobre células hedónicas-positivas o bien hedónicas-negativas, en función de ligeras variaciones en la localización del electrodo, provocando una modificación en la cualidad del estímulo gustativo asociado y haciendo que éste, inicialmente neutro, adquiriera propiedades motivacionales apetitivas o aversivas. Esta interpolación sería compatible con los datos de Yamamoto y colaboradores, quienes encontraron células en esta zona PBlé que mostraban inmunorreactividad a distintos tipos de estímulos gustativos (Yamamoto et al., 1994; Smith et al., 1994).

En esta misma línea, se han observado interacciones mutuamente inhibitorias –mediadas por GABA- entre los patrones de actividad de neuronas hedónicas positivas y negativas, que maximizan las diferencias entre ellas (Smith et al., 1994). En concreto, mediante el uso de registros unicelulares, algunos autores identificaron neuronas que podían ser activadas por la administración intraoral de sacarosa; la posterior aplicación de una mezcla de quinina + sacarosa producía una supresión en la respuesta. Y, al revés, la aplicación de esta última mezcla produjo una supresión en el patrón de respuesta de las células previamente activadas por la infusión de quinina.

Estudios neurofarmacológicos y neuroquímicos han demostrado que una misma sustancia puede tener consecuencias tanto reforzantes como aversivas, en función de la dosis, la situación experimental y/o la localización anatómica –y esta conclusión se puede aplicar general, pero no exclusivamente referida a las drogas de abuso-. Por

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

ejemplo, se ha comprobado que la administración de CRF (*Corticotropin-Releasing Factor*) a bajas dosis, genera preferencias gustativas pero a dosis elevadas tiene efectos aversivos al promover la liberación de hormonas ansiogénicas (Heinrichs et al., 1991). Similares resultados se han obtenido al estudiar los efectos de diversas manipulaciones del sistema opiáceo: Así, la administración de agonistas específicos de los receptores κ provocó efectos analgésicos/hiperalgésicos en función de la dosis aplicada (Kanarek et al., 1997). De acuerdo con esta afirmación y utilizando como procedimiento experimental la estimulación eléctrica, es posible que en función de los parámetros utilizados, se reproduzca la activación de estas neuronas –por ejemplo, mediante la liberación de opiáceos endógenos–, generando efectos reforzantes con dosis bajas y aversivos al incrementar la intensidad de la estimulación. Sin embargo, este no parece ser nuestro caso, pues la aparición de animales para los que la estimulación eléctrica tuvo consecuencias negativas no se debió al empleo de corrientes muy altas, ya que habitualmente eran los animales positivos los que soportaban una intensidad de corriente mayor, aunque siempre dentro de la franja de valores relativamente uniforme que previamente habíamos establecido en un ensayo inicial, exploratorio, previo a la fase experimental.

Por otra parte, algunos autores han comprobado que la administración de morfina, además de generar Aversiones Gustativas, era capaz de inducir analgesia tras su asociación con un estímulo gustativo en un paradigma no demorado, efecto que desapareció al introducir un intervalo temporal de seis horas entre el estímulo gustativo y el visceral (Bardo & Valone, 1994). Estos resultados podrían estar en concordancia con nuestros datos ya que con un mismo rango de intensidades obtenemos resultados opuestos en distintos animales, para una misma región neuroanatómica, siempre que el estímulo gustativo preceda inmediatamente a la estimulación. Revisando los datos obtenidos a través de pruebas de condicionamiento clásico y operante, algunos autores han comprobado que los efectos de los opiáceos varían en función del tipo de receptor sobre el que actúen –los agonistas específicos de los receptores μ y δ suelen generar refuerzo, mientras que los que actúan sobre receptores κ no provocan conductas de autoadministración pero sí funcionan como inductores en la generación de aversiones– (Moufid-Bellancourt et al., 1996; Shippenberg & Elmer, 1998). Dado que se han identificado receptores μ en los núcleos PBlc y PBme, y κ en el PBlc (Wolinsky et al., 1996), es posible que la estimulación eléctrica haya podido provocar la liberación de opiáceos endógenos, cuyas consecuencias positivas o negativas hayan sido generadas en función de su actuación sobre unos u otros. En efecto, nuestros datos concuerdan en gran medida con los aportados por Moufid-Bellancourt y colaboradores (Moufid-

Bellancourt et al., 1996), quienes, mediante infusión intraparábraquial de agonistas específicos de los receptores μ y κ consiguen ambos efectos reforzantes y aversivos, respectivamente.

El número de estos receptores es plástico y puede ser modificado por la privación de alimento (Wolinsky et al., 1996). De acuerdo con esta idea, podría plantearse la hipótesis de que la estimulación eléctrica del NPBe haya podido reproducir las señales viscerales de déficit/saciación y haber activado indirectamente estos mecanismos opiáceos.

La presencia en nuestro experimento de animales para los que la estimulación eléctrica del NPBe resulta aversiva está en consonancia con la de otros autores que han comprobado que la administración de agentes tóxicos que provocan estimulación del S. Inmune generó inmunorreactividad en la parte externa de este subnúcleo parabraquial lateral externo (Tkacs & Li, 1999). En este sentido, la infección es un tipo de reacción de malestar que provoca, entre otros efectos no específicos, reducción de la ingesta de alimento: parte de la respuesta del ‘huésped’ para luchar contra el agente tóxico incluye movilización de las células inmunitarias del torrente sanguíneo, elevación de la temperatura corporal, depresión conductual y reducción del apetito (Hoebel, 1997; Tkacs & Li, 1999). Por tanto, nuestros datos confirman que esta zona PBe puede ser relevante en el procesamiento de señales viscerales de carácter nocivo.

Finalmente, la aparición en nuestro experimento de efectos aversivos, puede deberse igualmente a la activación de una zona clave de relevo de la vía espino-parabraquial, cuya participación en el procesamiento de información dolorosa, como se mencionó al principio de este capítulo, está ampliamente documentada (Bernard et al., 1991; 1994; 1995; Bester et al., 1995; 1997; Light et al., 1993; Saper, 1995 a; Jasmin et al., 1997; Craig & Dostrovsky, 1999; Wang et al., 1994; Buritova et al., 1998).

En resumen, los resultados obtenidos en este segundo experimento muestran que la estimulación eléctrica del NPBe puede generar preferencias o aversiones hacia los estímulos gustativos asociados a la estimulación en un paradigma de contigüidad estimular. Es posible que ligeras variaciones en la posición del extremo del electrodo hayan provocado la activación de mecanismos motivacionales diferentes de refuerzo/aversión que funcionan próximos y en paralelo, de manera análoga a lo observado en los circuitos orbitofrontales humanos, representando sistemas de refuerzo

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

y castigo, además de asociaciones aprendidas entre un estímulo y sus consecuencias [positivas o negativas] (Rolls, 2000; O'Doherty et al, 2001).

CAPÍTULO III

**EFECTOS DE LAS LESIONES DEL NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL
EXTERNO EN LA ADQUISICION DE PREFERENCIAS GUSTATIVAS
INDUCIDAS POR LA ADMINISTRACIÓN DE ALIMENTOS
PREDIGERIDOS EN PRUEBAS DE APRENDIZAJE DISCRIMINATIVO
GUSTATIVO CONCURRENTENTE Y SECUENCIAL**

EXPERIMENTO 3

Efectos de las Lesiones del Núcleo Parabraquial Lateral Externo en la Adquisición de Preferencias Gustativas Inducidas por la Administración de Alimentos Predigeridos en Pruebas de Aprendizaje Discriminativo Gustativo Concurrente

Los resultados de los dos experimentos previos han puesto de manifiesto que la Estimulación Eléctrica del NPLe genera preferencias y, también, aversiones por los estímulos gustativos con que es asociada, en un procedimiento de aprendizaje a corto plazo –sin demora- (Caps. 1 y 2).

Numerosas investigaciones han implicado al Área Parabraquial, en procesos motivacionales de carácter reforzante, relacionados, por ejemplo, con el procesamiento de sustancias innatamente preferidas por los animales y otras apetitivas -adquiridas después de una experiencia de condicionamiento-, así como con mecanismos relacionados con la conducta nutritiva (Edwards & Ritter, 1989; Calingasan & Ritter, 1993; Hoebel, 1997; Reilly et al., 1993; Reilly & Trifunovic, 2000a; 2000b; Yamamoto & Sawa, 2000a, 2000b). Se ha comprobado también que la región Parabraquial es una zona de actuación de diversos fármacos relacionados con el control de la ingesta, como por ejemplo la Fenfluramina (Li & Rowland, 1993; 1995; Li et al., 1994) o los opiáceos (Carr et al., 1991; Bechara et al., 1993; Jaeger & Van der Kooy, 1993; 1996; Wolinsky et al., 1996), y capaz de sustentar conductas de autoestimulación (Ferwissi et al., 1987).

Algunos de estos estudios han puesto de manifiesto que, en concreto, el extremo lateral del Núcleo Parabraquial es una importante zona receptiva de información visceral tanto vagal como humoral, procedente del NTS caudal y el Área Postrema, lo que la convierte en una zona privilegiada para procesar información periférica relacionada con la conducta nutritiva (Fulwiler & Saper, 1984; Herbert et al., 1990; Moga et al., 1990; Halsell, 1992; Krukoff et al., 1993; 1994; Saleh & Cechetto, 1993; Kobashi et al., 1993; Saper, 1995b; Krout & Loewi, 2000; De Lacalle & Saper, 2000; Karimnamazi et al., 2002). De hecho, se tiene conocimiento de que en los órganos periféricos se originan muchas de las señales de déficit / saciación y las relativas a la cantidad de energía almacenada por el organismo (Molina & Puerto, 1980; 1988; 1990; Campfield & Smith, 1990; Martin et al., 1991;

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

Fraser et al., 1995; Figlewicz et al., 1996; Woods et al., 1998a), los cuales deben ser transmitidos e integrados en centros nerviosos superiores del SNC (Figlewicz et al., 1996; Levine & Billington, 1997; Woods et al., 1998a; 2000; Smith, 2000), y a su vez, podrían estar implicados en el inicio/cese de la ingesta así como en la modulación de su frecuencia y duración.

Así, se ha observado que la actividad del subnúcleo Parabraquial Lateral Externo, puede verse modificada por estimulación eléctrica del nervio vago (Gieroba & Blessing, 1994) y por diversas manipulaciones de carácter visceral, como por ejemplo la infusión intragástrica de distintos tipos de sustancias nutritivas y agentes químicos (Yamamoto et al., 1992; 1993; 1994; Hochstenbach et al., 1993; Kobashi et al., 1993; Sakai & Yamamoto, 1997; Kobashi & Bradley, 1998; De la Calle & Saper, 2000; Yamamoto & Sawa, 2000a; 2000b). Paralelamente a estos resultados, diversos autores han demostrado que la administración de productos antimetabólicos relacionados de la ingesta, como pueden ser el 2,5-anhidro-D-mannitol (2,5-AM), análogo a la fructosa o el mercaptoacetato (MA), que reduce la oxidación de ácidos grasos, genera inmunorreactividad en el NPBl, aunque también en otras estructuras como el NTS (Calingasan & Ritter, 1993; Ritter, 1994; Ritter et al., 1994; Grill et al., 1995; Horn & Friedman, 1998a), y que este efecto queda eliminado por vagotomía (Calingasan & Ritter, 1993; Ritter, 1994; Ritter et al., 1992b, 1994).

Por otro lado, diversos resultados muestran que el consumo de sustancias apetitosas –por ejemplo, sacarina, sacarosa, lactosa, glucosa...- (Yamamoto et al., 1994; Monroe & Dilozeno 1995; Wang et al., 1999 Yamamoto & Sawa, 2000a; 2000b) genera inmunorreactividad en los subnúcleos PBl dorsal, PBl central y también en el PBl externo. También se ha demostrado que en esta zona existen neuronas sensibles a las cualidades sensoriales de los estímulos gustativos (Yamada et al., 1990; Halsell & Frank, 1992; Halsell & Travers, 1997), y otras que codifican su valor motivacional (Yamamoto et al., 1994), las cuales han sido localizadas tanto en la división medial como en la parte lateral del Complejo Parabraquial.

Mas aún, las señales inductoras de saciedad a corto plazo, como por ejemplo las generadas por la Colecistoquinina periférica, que utiliza una vía vagal, rápida (Li & Rowland, 1995; Trifunovic & Reilly, 2001a), o bien por hormonas como la leptina, liberada por el tejido adiposo blanco en relación directa con la cantidad de grasa almacenada por el organismo, y que ha sido implicada en la regulación a largo plazo de la ingesta y el peso corporal –por tanto, haciendo uso de una ruta humoral,

lenta- (Elmqvist et al., 1997; 1998; Friedman, 1998; Friedman & Halaas, 1998; Ahima & Flier, 2000; Elias et al., 2000), de nuevo son procesadas preferentemente por el subnúcleo parabraquial lateral externo (Li & Rowland, 1995; Trifunovic & Reilly, 2001a; Elmquist et al., 1997; 1998).

Finalmente, y en relación a este subnúcleo, es preciso destacar que diferentes neurotransmisores que tienen un papel modulador sobre la ingesta (Hoebel, 1997), se ha demostrado que actúan sobre esta zona parabraquial: Así por ejemplo, los péptidos reguladores del consumo de los principales tipos de macronutrientes, como el *NPY* –carbohidratos-, *galanina* –grasas- y ‘*Hormona liberadora de la hormona del crecimiento*’ –proteínas- son procesados en el extremo lateral del Núcleo Parabraquial (Smith et al., 1985; Krukoff et al., 1993; Petrov et al., 1992a; 1992b; Veening et al., 1998; Koegler et al., 1999; Bray, 2000).

La noradrenalina, implicada en arousal, tiene un papel potenciador de la ingesta cuando actúa sobre receptores α_2 - del NPV hipotalámico e inhibidor cuando actúa a través del α_1 - (Leibowitz, 1982; 1992). También, mediante técnicas de inmunohistoquímica, se han logrado identificar en el NPBe células que contienen ARNm específico para los receptores α_2 -adrenérgicos (Herbert & Flügge, 1995), pero su actuación concreta en esta localización aún no es conocida.

Continuando con esta revisión general del NPBe se ha comprobado que existe una conexión serotoninérgica directa desde el Área Postrema al Núcleo Parabraquial (Lança & Van der Kooy, 1985), un neurotransmisor que ejerce un conocido papel modulador sobre la ingesta. En relación a ésta, se ha visto que sustancias anorécticas como la fenfluramina -que actúa incrementando los niveles celulares de 5-HT-, son procesadas por el NPBe (Lança & Van der Kooy, 1985; Li & Rowland, 1993; 1995; Veening et al., 1998; Simansky & Nicklous, 2002), aunque todavía no queda claro si este efecto se debe a un papel facilitador sobre las señales de saciedad (Lee et al., 1998), o es causado por modificaciones en el valor hedónico de los alimentos, tal y como proponen otros autores (Trifunovic & Reilly, 2001a). Por el contrario, la lesión de la parte ventrolateral de esta zona parabraquial reduce el efecto anoréctico de la fenfluramina así como la expresión de inmunorreactividad (*‘immediate early genes’*) en otras zonas anatómicamente relacionadas como el CeA y el NLET (Li et al., 1994).

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

Finalmente y en este contexto, los opiáceos desempeñan un importante papel en la ingesta, ya que al parecer actúan modulando la valoración hedónica de las cualidades sensoriales de la comida y/o incrementando su valor como incentivo (Le Magnen, 1990; 1992; 1999; Apfelbaum & Mandenoff, 1981; Drewnowski et al., 1992; Carr & Papadouka, 1994; Papadouka & Carr, 1994; Cooper & Clifton, 1996; Hoebel, 1997), aunque también podrían ser experimentados por el organismo como reforzantes al reducir las sensaciones provocadas por estados de ‘desequilibrio homeostático’ como es el caso de las sensaciones de hambre (Carr & Papadouka, 1994). Así, se ha visto que la restricción crónica de alimento genera hiper e hipoactividad, respectivamente, en los receptores κ y μ de la zona Parabraquial Lateral Externa y Parabraquial Medial Externa (Wolinsky et al., 1996). Este Complejo Parabraquial establece conexiones con el Hipotálamo Lateral y, al parecer, participa de un circuito que ha sido relacionado con la ingesta, y cuyos efectos pueden ser modulados por la administración de morfina y otras sustancias opiáceas (Carr et al., 1991; Moufid-Bellancourt & Velley, 1994; Moufid-Bellancourt et al., 1996).

En un ámbito mas general en relación con la nutrición, es bien sabido que los animales poseen los repertorios conductuales necesarios para aprender a asociar los distintos sabores con la presencia interna de sustancias tóxicas, dado su importante valor adaptativo, pero también pueden asociar estas señales gustativas con la llegada al sistema digestivo de productos nutritivos, que permiten mantener el equilibrio energético y la homeostasis (Puerto & Molina, 1977; Molina & Puerto, 1981; Hoebel, 1997). Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, han logrado disociar dos sistemas neuroanatómicos diferentes implicados en las distintas modalidades de este proceso adquisitivo y regulatorio, que han sido denominadas ‘a corto plazo’ o ‘concurrente’ y ‘a largo plazo’ o ‘secuencial’, las cuales que difieren fundamentalmente en los requisitos temporales necesarios para llevar a cabo la tarea (Arnedo et al., 1990; 1993; Gallo et al., 1990; 1991; Agüero et al., 1993a; 1993b; 1994; Cubero et al., 2000b; 2001; Mediavilla, 1995; Mediavilla et al., 1999; 2000).

Mientras que los procesos ‘secuenciales’ implican mecanismos lentos, ‘humorales’, la modalidad de aprendizaje a ‘corto plazo’ ‘simultáneo’ o ‘concurrente’ requiere de la activación de centros nerviosos especializados en la detección rápida de información visceral. En este sentido, está ampliamente documentado el papel de las aferencias vagales en la detección de señales mecanorreceptoras y quimiorreceptoras procedentes de distintos segmentos del

Tracto Gastrointestinal (Gonzalez & Deutsch, 1981; Gonzalez et al., 1986; Ritter et al., 1994), cuyos primeros relevos se sitúan en la zona intermedio-caudal del NTS, los cuales, a su vez, proyectan hacia la parte interna del NPBl, aunque también hacia los subnúcleos PBl dorsal y central y la región conocida como 'waist', así como en el subnúcleo dorsomedial del NTS que inerva la parte externa del NPBl (Fulwiler & Saper, 1986; Herbert et al., 1990; Jia et al., 1994; Karimnamazi et al., 2002).

Diversos estudios previos han demostrado que las pruebas comportamentales de elección entre dos estímulos gustativos permiten evaluar de forma fiable las propiedades reforzantes/ aversivas de la estimulación eléctrica intracerebral (Gallo et al., 1988; Agüero et al., 1993a; Cubero & Puerto, 2000a; Caps. 1 y 2 de esta Tesis) así como los resultantes de la administración de diversos estímulos viscerales (Puerto et al., 1976a; 1976b; Mediavilla et al., 2001b). Así, en el aprendizaje concurrente, se ofrece a los animales a elegir entre dos estímulos gustativos presentados independientemente, pero de manera que uno de ellos es asociado contingentemente con la administración inmediata de un producto y el otro con una sustancia inocua (Mediavilla et al., 2001b).

En estos estudios, la infusión directa de alimentos naturales en el estómago produce reacciones aversivas semejantes a las desencadenadas por la administración de productos tóxicos (Puerto et al., 1976a; 1976b; Molina et al., 1977; Puerto & Molina, 1977; Molina & Puerto, 1986; Zafra, 2000), pero esto no sucede si se administran alimentos predigeridos, procedentes de animales donantes (Puerto et al., 1976a; 1976b; Zafra, 2000). La explicación de este efecto diferencial se remonta a principios del siglo pasado, cuando Pavlov (1910) demostró que las sustancias alimenticias ingeridas solo ejercen efectos beneficiosos si antes han sido sometidas a la denominada 'fase cefálica', un proceso neuroendocrino que desencadena una cascada de secreciones que preparan al canal digestivo para la recepción y procesamiento del alimento en condiciones fisiológicas (Pavlov, 1910; Tordoff & Friedman, 1989).

De acuerdo con estos datos, cabría plantearse si el subnúcleo Parabraquial Lateral Externo estaría implicado no solo en el proceso de recompensa inducido artificialmente mediante estimulación eléctrica, sino también en el refuerzo generado en procesos fisiológicos naturales como los resultantes de la administración de nutrientes, que se ha demostrado ejercen un efecto nutritivo positivo en los animales.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

Para comprobar estas hipótesis fueron llevados a cabo dos experimentos en los que se investigaron los efectos de la lesión electrolítica del NPBl en tareas de aprendizaje concurrente y demorado, inducidos por la administración intragástrica de nutrientes predigeridos. En el primero de ellos se planteó estudiar los efectos de la lesión electrolítica de esta zona en un paradigma de Aprendizaje Interoceptivo ‘concurrente’ y utilizando, como estímulo visceral, la infusión enteral de ‘leche predigerida’.

MÉTODO

SUJETOS

Para la realización de este experimento fueron utilizadas 19 ratas macho de la raza Wistar, procedentes del animalario de la Universidad de Granada, cuyos pesos, al inicio del experimento, estaban comprendidos entre 260 y 300 gramos. Fueron mantenidas en jaulas durante un periodo de habituación de 4 días, previo a la cirugía, con comida y agua ‘ad libitum’ y distribuidas aleatoriamente en dos grupos, experimental o ‘Grupo Lesionado’ (N = 10) y control o con ‘Falsa Lesión’ (N = 9). La temperatura se mantuvo constante, entre 21 y 24°C, y el período de luz fue de 12 horas, comenzando a las 8:30 a.m. y finalizando a las 8:30 p.m., siguiendo un procedimiento similar al descrito en los experimentos anteriores. Todas las manipulaciones experimentales fueron realizadas durante el período de luz..

Además se utilizaron 10 animales ‘donantes’ a los que previamente se había implantado una fístula intragástrica, las cuales debían ingerir los alimentos que posteriormente se extraerían para ser administrados en la cavidad gástrica de los animales experimentales

PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO:

Lesión electrolítica del Núcleo Parabraquial Lateral Externo (NPBl):

Los animales fueron anestesiados para la cirugía con una dosis i.p. de tiopental sódico de 50 mg/Kg (Pentothal; Lab. Abbott, Madrid, Spain) y colocados en un aparato estereotáxico (Stoelting Co. Estereotáxico 51.600). Tras rasurar la parte superior de la cabeza, se practicó una incisión longitudinal de aproximadamente 1,5 cm. de largo y se procedió a retirar el tejido conjuntivo perióstico adherido al cráneo. Se taladraron dos orificios en el lugar determinado por

las coordenadas anteroposterior y lateral del subnúcleo que iba a ser lesionado y a continuación se introdujo un electrodo monopolar, bilateralmente, hasta el punto correspondiente a la coordenada vertical. El electrodo, de unas 200 micras de diámetro, estaba aislado en toda su longitud excepto en los 0,5 mm. distales. Se cerró el circuito mediante un electrodo ‘masa’ insertado en el recto y se aplicó una corriente catódica continua de 0,3 mA durante 10 segundos, mediante un generador de lesiones, modelo DCML-5 (Grass Instruments Corp., Quincy, Mass., USA). Finalmente se cerró la incisión mediante varios puntos de sutura.

Las Coordenadas Estereotáxicas fueron idénticas a las utilizadas en los experimentos anteriores [A-P= -0,16mm.; V= 3,0mm.; L= \pm 2,5mm.], obtenidas del Atlas de Paxinos & Watson (1996) a partir del Punto 0 Interaural, y con una inclinación del cráneo de -3,3 mm.

El Grupo Control recibió un tratamiento similar, con la única excepción de se realizó una ‘falsa lesión’: Se hizo descender el electrodo hasta una coordenada vertical de + 4,0 mm., para evitar dañar el núcleo, pero no se aplicó corriente.

Implante de dos catéteres intragástricos:

Tras finalizar la cirugía cerebral y con el animal todavía anestesiado se procedió al implante de dos sondas intragástricas (Silastic. Silastic-Medical Grade Tubing, Dow Corning Corp., Michigan, USA), aunque en algunos casos fue necesario suministrar una dosis adicional de 0,1 c.c. de anestésico. Primeramente se practicó una incisión en la línea media del abdomen de unos 3 cm. de longitud. Con ayuda de unas pinzas, el estómago fue extraído cuidadosamente hacia fuera de la cavidad abdominal y realizadas unas pequeñas incisiones de 2 mm. en la superficie ventral de la zona del Cardias. A través de ésta, se introdujeron los catéteres, con un diámetro interior de 0,04 pulgadas y exterior de 0,085 p., respectivamente. Cada uno de ellos había sido preparado con adhesivo quirúrgico (Medical Adhesive Silicone. Type A. Dow Corning Corp., Michigan, USA) que formaba un pequeño abultamiento alrededor del extremo que quedaría dentro del estómago para impedir el desplazamiento de la fístula hacia el exterior, una vez cerrada la incisión con un punto de sutura. Tras finalizar la operación, el estómago fue devuelto con cuidado al interior de la cavidad gástrica y colocado en su posición original. Durante el tiempo que duró la intervención, éste se mantuvo permanentemente humedecido e irrigado con suero fisiológico isotónico (Apiroserum, Lab. YBIS, Madrid). Posteriormente, con la ayuda de un punzón, se construyeron dos túneles subcutáneos desde el

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

abdomen a la parte dorsal de la cabeza, por donde se extrajo el otro extremo de las fístulas, que quedarían al descubierto para poder realizar manipulaciones desde el exterior. Aquí se aplicó un tope de adhesivo alrededor de los catéteres para evitar que pudieran desplazarse hacia el interior del túnel. Ambas incisiones, abdominal y cefálica fueron suturadas y los catéteres taponados para impedir el vaciado de contenidos gástricos.

Al finalizar las intervenciones, todos los animales recibieron una dosis intramuscular de 0,1 cc. de penicilina (Penilevel retard, Lab. Level, S.A., Barcelona), con el fin de evitar posibles infecciones. Se instalaron en jaulas individuales, de características similares a las descritas en los experimentos anteriores, y se les mantuvo con comida y agua 'ad líbitum' durante un período de recuperación de 13-14 días hasta el inicio del procedimiento experimental.

PRE-ENTRENAMIENTO:

El periodo de preentrenamiento fue de cuatro días de duración. Se comenzaba cada sesión pesando a cada rata y haciendo pasar 0,5 ml de agua a temperatura ambiente a través de los catéteres, para prevenir su obstrucción. A continuación se ofrecían simultáneamente a los animales dos buretas graduadas con agua, y se registraba la cantidad consumida durante cada día, así como la preferencia por la posición. En los dos primeros días, los sujetos dispusieron de las buretas durante 10 minutos, mientras que en los dos últimos, la duración fue de 7 minutos.

Transcurrido un período de tiempo de 30 minutos después de retirar el agua, se ofrecían 15 gramos de alimento sólido. El último día de preentrenamiento y a última hora de la tarde, se comprobaba que los animales habían ingerido todo el alimento para garantizar que, el día siguiente, al comienzo de la fase experimental, el estómago estuviese vacío durante las administraciones intragástricas.

Durante este período, así como a lo largo de todo el procedimiento experimental se utilizó sonido blanco de fondo para amortiguar ruidos fortuitos imprevisibles.

Los animales donantes tuvieron un período de entrenamiento de 5 días durante los cuales eran ubicados en una habitación diferente al resto de los sujetos y colocados en jaulas provistas de rejillas en la parte inferior –a unos 2,5 cm. de la base- para evitar que pudiesen ingerir productos presentes en el suelo de las mismas.

Durante los dos primeros días de esta fase, se ofreció alimento líquido (Leche Evaporada, diluida al 50% en agua. Sociedad de Productos Nestlé. Barcelona) durante varias horas por la mañana y por la tarde, combinándola con 7 gramos de alimento sólido. El resto de los días dispusieron solo de alimento líquido y se comprobó que las extracciones gástricas eran factibles a través de los catéteres implantados. Antes de que finalizase el período de luz de cada día, se ofrecía a los animales agua durante 10 minutos, aunque generalmente no la consumían.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Las sesiones experimentales se iniciaban pesando a cada animal y comprobando que sus catéteres no estaban obstruidos. (Para ver detalles sobre el procedimiento utilizado, consultar Tabla 3.1).

En el caso de los animales donantes, se comenzaba por ofrecer alimento líquido durante un período de tiempo no definido, hasta alcanzar la saciación, y transcurridos 30 minutos, el alimento era extraído mediante una jeringa a través de las fístulas.

Tanto a los animales Experimentales Lesionados como al Grupo con Falsa Lesión se les presentaban dos buretas simultáneamente, durante 7 minutos, cada una de las cuales contenía un estímulo gustativo novedoso, sabor a fresa o a coco (McCormick Co. INC. San Francisco. California, USA), en una concentración del 0,5%. Se había comprobado previamente en otras muestras, que estos sabores son análogamente preferidos por los sujetos, y, por tanto, equivalentes.

La ingesta voluntaria de uno de los estímulos gustativos era asociada a la administración simultánea, a través de una de las fístulas intragástricas, de alimento predigerido procedente de los animales donantes. El consumo del otro sabor fue asociado con la administración simultánea de suero fisiológico isotónico, a través de la otra fístula. Las administraciones fueron balanceadas, de manera que la mitad de los animales del grupo lesionado y la mitad de los animales del grupo de 'falsa lesión' recibieron el alimento predigerido al consumir el estímulo gustativo con sabor a fresa, que era presentada siempre en el orificio izquierdo, y el resto, en asociación con el sabor a coco (Ver Tabla 3.1).

La tasa de infusión de ambos productos (alimento predigerido, suero fisiológico) fue de 1 ml. por cada ml. del estímulo gustativo ingerido. Dicha

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

administración se realizaba a través de dos conectores adaptados a las sondas, con longitud y flexibilidad suficiente como para permitir al animal moverse libremente en el interior de su jaula.

Pasados los 7 minutos, se retiraban las buretas y se anotaban las cantidades que cada animal había consumido de uno y otro sabor. Una hora más tarde se ofrecía alimento sólido suficiente, de modo que, pasadas cuatro horas, el alimento no consumido era retirado y registrado. De esta manera se garantizaba la ausencia de restos de comida al día siguiente en el sistema digestivo de las ratas.

Por su parte, los animales donantes, tras finalizar la sesión de cada día, disponían también de 30 minutos de alimento líquido adicional, que no era extraído.

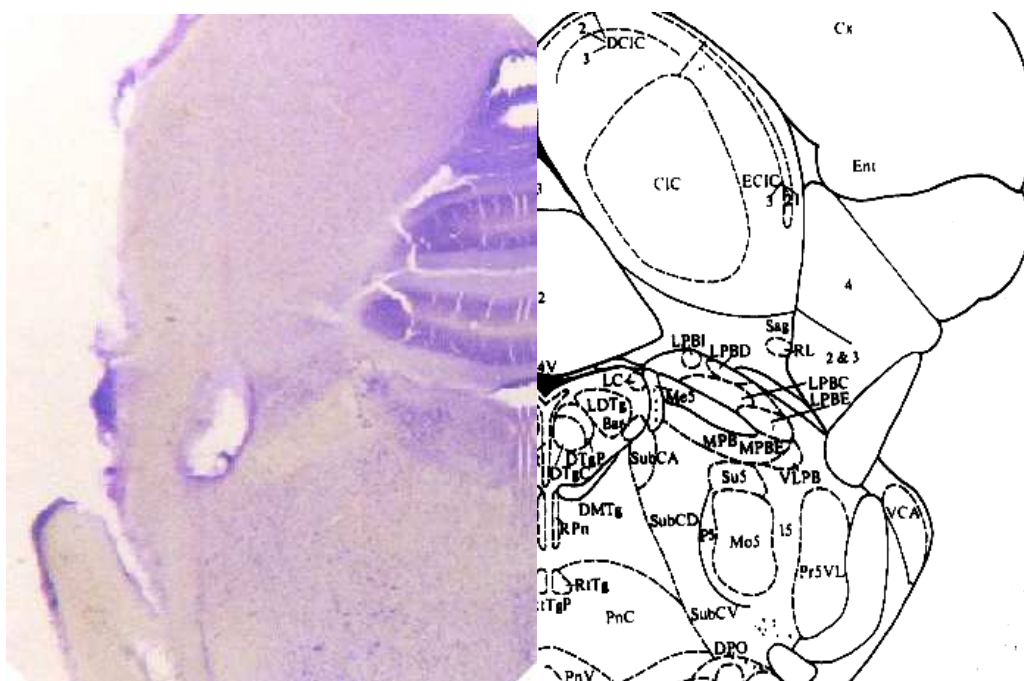
SUJETOS	Día 1	Día 2	Día 3...
1/2 suj Gr.:Lesion	FR. izq. + Leche Predig.	FR. izq. + Leche Predig.	FR. izq. + Leche Predig.
1/2 suj Gr.: Falsa L.	Coco dcha. + S. Fisiol..	Coco dcha. + S. Fisiol..	Coco dcha. + S. Fisiol..
1/2 suj Gr.:Lesion	FR. izq. + S. Fisiol	FR. izq. + S. Fisiol	FR. izq. + S. Fisiol
1/2 suj Gr.: Falsa L.	Coco dcha. + Leche Predig.	Coco dcha. + Leche Predig.	Coco dcha. + Leche Predig.

Tabla 3.1: Procedimiento experimental utilizado en una Tarea de Aprendizaje Concurrente, que se repitió durante todos los días del estudio (Experimento 3).

HISTOLOGÍA:

Concluido el experimento, los animales fueron anestesiados profundamente y perfundidos transcordialmente con 10ml de suero fisiológico y otros 10 ml de formaldehído al 10%. Se extrajo el cerebro que fue conservado en formaldehído al 4% durante al menos una semana, hasta su laminación. El tejido nervioso fue laminado en secciones coronales de aproximadamente 50 micras de grosor, montado y teñido siguiendo el procedimiento descrito en los experimentos anteriores.

Los resultados del Análisis Histológico se muestran en la Microfotografía 3.1.



Microfotografía 3.1: Preparación histológica teñida con Violeta de Cresilo en donde se muestra la localización de una lesión representativa de las realizadas en los experimentos 3 y 4 de esta Tesis (parte izquierda de la imagen). En el dibujo de la derecha se muestra la sección correspondiente, tomada del Atlas de Paxinos & Watson (1996), donde se puede apreciar la localización del Núcleo Parabraquial Lateral Externo (LPBE).

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

RESULTADOS:

Previamente a la realización del análisis estadístico, hubo que descartar a dos animales del grupo ‘Lesionado’ y a un sujeto del grupo ‘Falsa Lesión’, por haberse desprendido el catéter durante la fase experimental, por lo que se incluyeron 16 sujetos (8 lesionados y 8 controles con falsa lesión).

Para el Análisis Estadístico de los resultados, se realizó un ANOVA con tres factores: Grupo x Sabor x Día, en el que la variable ‘Sabor’ [$F(1,14) = 5,775$ $p < 0,030^*$] y la variable ‘Día’ [$F(3,42) = 4,740$ $p < 0,006^{**}$] resultaron ser significativas. El factor ‘Grupo’ no es significativo [$F(1,14) = 2,364$ $p < 0,146^*$], dado que si se comparan las cantidades totales de los estímulos gustativos (sabor asociado a infusión intragástrica de Leche Predigerida y sabor asociado a infusión i.g. de Suero Fisiológico) ingeridas por los animales de cada grupo, ambos ingieren cantidades similares correspondientes a lo que una rata es capaz de tomar en un determinado período de tiempo –en este caso, siete minutos-. Esto significa que la diferencia probablemente se encuentre en la distribución de la cantidad global que consume cada animal, como veremos en los análisis específicos.

(Los resultados del Grupo Lesionado y del Grupo de Falsa Lesión se recogen en las tablas 3 y 4 del Anexo II, respectivamente).

Si realizamos un Análisis de las variables manipuladas Intrasujeto en el Grupo ‘*Lesionado*’ comparando el efecto de ‘Sabor’, ‘Día’ y ‘Sabor x Día’ obtenemos que solo es significativo el efecto de Día [$F(3,21)=3,398$ $p < 0,036^*$], pero no el ‘Sabor’ [$F(1,7)=0,575$ $p < 0,474$], ni la interacción [$F(3,21)=0,492$ $p < 0,691$], lo cual significa que éstos animales no han sido capaces de establecer un aprendizaje. Las cantidades ingeridas de ambos sabores son superiores el primer día y descienden en paralelo, lo cual se refleja globalmente en el efecto ‘Día’ (Ver figura 3.1).

Por el contrario, en el Grupo denominado ‘*Falsa Lesión*’, se puede observar que los sujetos difieren en las cantidades de estímulo gustativo ingerido, y por tanto, el efecto del sabor es significativo [$F(1,7)=8,332$ $p < 0,023^*$], lo que quiere decir que los animales prefieren el sabor asociado a la infusión intragástrica de nutrientes, pero no es significativo el efecto ‘Día’ [$F(3,21)=2,040$ $p < 0,138$] ni el efecto de la interacción [$F(3,21)=1,828$ $p < 0,172$]. (Ver figura 3.2).

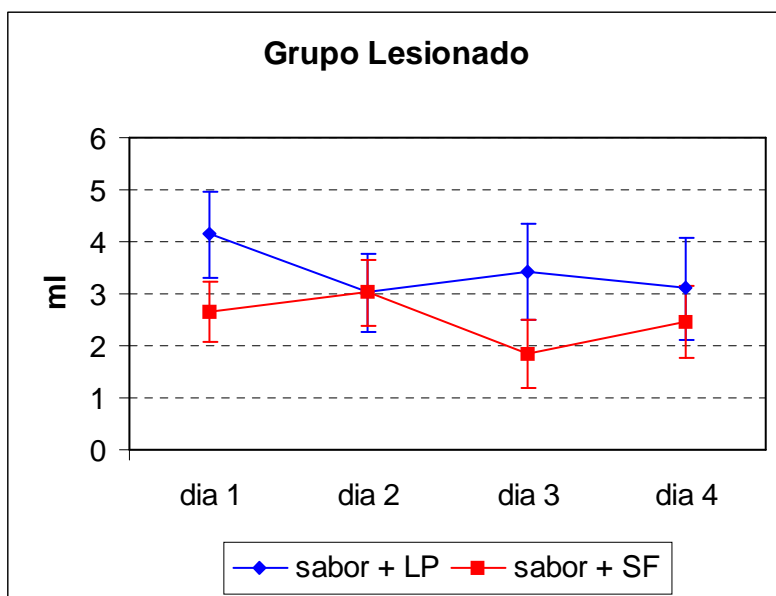


Figura 3.1: Ingesta de cada uno de los Estímulos Gustativos manifestada por los sujetos del Grupo 'Lesionado' en el Experimento 3 (Sabor + LP: Sabor asociado a infusión i.g. de Leche Predigerida; Sabor + SF: Sabor asociado a infusión i.g. de Suero Fisiológico).

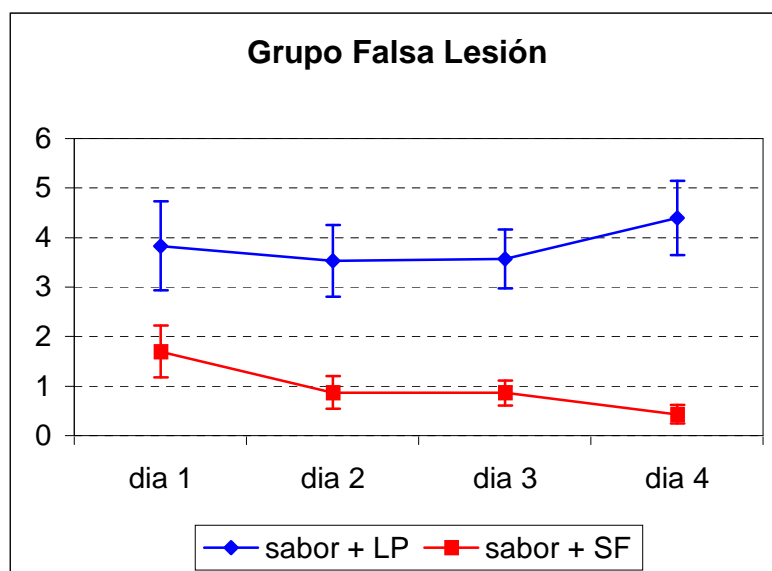


Figura 3.2: Ingesta de cada uno de los Estímulos Gustativos manifestada por los sujetos del Grupo 'Falsa Lesión' en el Experimento 3 (Sabor + LP: Sabor asociado a infusión i.g. de Leche Predigerida; Sabor + SF: Sabor asociado a infusión i.g. de Suero Fisiológico).

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

DISCUSIÓN

Los resultados de este experimento muestran que los animales lesionados en el NPBe son incapaces de discriminar entre los dos Estímulos Gustativos presentados, uno de los cuales va asociado a la administración intragástrica de alimento predigerido, mientras que el otro ha sido relacionado con la infusión i.g. de Suero Fisiológico en un Paradigma de Aprendizaje Concurrente, pues los animales ingieren cantidades similares de ambos. Por el contrario, los animales con ‘Falsa Lesión’ prefieren los estímulos gustativos asociados a la administración intragástrica de nutrientes predigeridos, y por tanto, son capaces de realizar correctamente la tarea (Ver Figs. 3.1 y 3.2). Por lo tanto, las lesiones electrolíticas del NPBe interrumpen las preferencias gustativas inducidas por la infusión i.g. de alimento predigerido, algo que no sucede en los animales controles, que eligen el sabor asociado a la infusión de alimento, lo que, por otra parte, confirma su carácter reforzante.

Estos resultados están en consonancia con los presentados en los capítulos 1 y 2 de esta Tesis, en los que la Estimulación Eléctrica del NPBe generaba preferencia por el estímulo gustativo asociado. Ahora, como cabía esperar, el bloqueo de esta región tras la realización de una lesión electrolítica en esta zona interrumpe la preferencia por un Estímulo Gustativo asociado a la administración intragástrica de productos nutritivos reforzantes.

También son compatibles estos datos con los aportados recientemente por Mediavilla (Mediavilla et al., 2000) en los que las lesiones de esta estructura (NPBe) interrumpieron el aprendizaje de asociación sabor–malestar inducido por administración i.g. de ClNa hipertónico en un paradigma concurrente. Parece pues, que a nivel troncoencefálico, y conforme a lo observado con técnicas de estimulación eléctrica, las lesiones de este subnúcleo interrumpen el procesamiento de la información visceral tanto aversiva como reforzante.

Resultados similares a los presentados en este experimento se han obtenido tras diversas intervenciones periféricas. Así por ejemplo, la ablación de las aferencias vagales bloquea el aprendizaje discriminativo gustativo, tanto si la estimulación visceral es de naturaleza aversiva, generada por administración de productos tóxicos (Arnedo et al., 1990; 1991; 1993) o por la administración de alimentos ‘no cefálicos’ (Zafra, 2000), como en el caso de la estimulación reforzante inducida por infusión intragástrica de nutrientes predigeridos (Zafra, 2000).

EXPERIMENTO 4

Efectos de las Lesiones del Núcleo Parabraquial Lateral Externo (NPBle) en la Adquisición de Preferencias Gustativas Inducidas por la Administración de Alimentos Predigeridos en Pruebas de Aprendizaje Discriminativo Gustativo Secuencial

Los resultados del experimento 3 muestran que las lesiones electrolíticas del NPBle bloquean el aprendizaje asociativo entre un estímulo gustativo y la administración enteral de alimento predigerido (reforzante) cuando no se intercalan períodos de dilación entre ambos, es decir en régimen de contigüidad.

Sin embargo, dado que las investigaciones realizadas en nuestro laboratorio han permitido establecer una disociación anatómica y funcional entre los sistemas implicados en AAG ‘concurrente’, que utilizan el eje anatómico vagal-NPBle–NPB medial de procesamiento rápido (Arnedo et al., 1990; 1991; 1993; Mediavilla et al., 2000; Zafra, 2000), y los que utilizan paradigmas ‘secuenciales’, a través de una vía humoral, lenta, que incluye el sistema circulatorio–Área Postrema-NPB lateral (Gallo et al 1988; 1990; 1991; Agüero et al., 1993a; 1993b; Cubero & Puerto, 2000a; Cubero et al., 2001), cabría preguntarse si el NPBle estaría implicado en el procesamiento de ambas modalidades regulatorias y adquisitivas, o si sería específico a la modalidad ‘concurrente’ mostrada en el experimento anterior.

El objetivo de este experimento consistía, por tanto, en examinar el efecto de las lesiones electrolíticas del NPBle en el Aprendizaje Gustativo Secuencial o ‘a largo plazo’, cuando en lugar de estimulación visceral aversiva se utilizaba la administración intragástrica de nutrientes predigeridos.

METODO

Para este experimento se utilizaron 19 ratas macho, de la raza Wistar, suministradas por el animalario de la Universidad de Granada, de características similares a las del experimento anterior. A su llegada al laboratorio fueron distribuidas y mantenidas en condiciones idénticas a las descritas en los experimentos previos.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

Se utilizaron, además, 12 ratas donantes procedentes de experimentos previos.

PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO:

De los 19 animales, 10 ratas elegidas al azar fueron asignadas al grupo 'lesión electrolítica del NPBe' y las restantes fueron sometidas a 'falsa lesión' y utilizadas como controles, de acuerdo con el procedimiento quirúrgico descrito en el experimento anterior. El periodo de recuperación en este caso fue de entre 8-11 días.

PREENTRENAMIENTO:

Se llevó a cabo un programa de preentrenamiento que tuvo una duración de cuatro días. Cada día, y también durante la fase experimental, se pesaba a los animales y se hacía pasar a través de las sondas, 0,5 ml de agua a temperatura ambiente para prevenir posibles obstrucciones.

En los días primero y tercero, se presentó una bureta con agua en el orificio izquierdo de los dos que dispone la jaula, mientras que en el segundo día, la bureta con agua estaba disponible a la derecha del animal. El último día, los animales disponían simultáneamente de las dos buretas de agua en los orificios izquierdo y derecho de la jaula. Durante los dos primeros días, el agua estuvo disponible durante 10 minutos, y 7 en los dos restantes.

Como en el experimento anterior (experimento 3), media hora después, se les ofrecían 15 grs. de alimento sólido, y al finalizar la sesión experimental del cuarto día, se comprobaba que no quedasen restos en las jaulas. También se utilizó ruido blanco de fondo para contrarrestar posibles golpes fortuitos.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:

Los animales realizan un proceso de aprendizaje en cuatro sesiones mas una prueba final de elección, siguiendo un procedimiento similar al utilizado en los capítulos 1 y 2 de esta Tesis, con dos diferencias: a) El Estímulo Gustativo en lugar de asociarse con E. Eléctrica del NPBe, es seguido de la administración i.g. de productos (Leche Predigerida o Suero Fisiológico), y b) Entre el EC (presentación del sabor) y el EI (infusión de productos en el estómago) se intercala una demora de 15 minutos.

En la primera y tercera sesión de este ciclo, se ofrece a los animales una bureta en el orificio izquierdo de la jaula, que contiene el estímulo gustativo con sabor a 'fresa' durante 7 minutos, cuya ingesta, transcurrido el intervalo pertinente de 15 minutos, es asociada para la mitad de los animales con la inyección de Alimento Predigerido y para la otra mitad de los animales con suero fisiológico isotónico. Durante las sesiones segunda y cuarta, se presenta el estímulo gustativo con sabor a 'coco' a la derecha de la jaula durante los 7 minutos de rigor, que es asociado con la administración de Suero Fisiológico en el caso de las ratas que habían recibido Nutrientes Predigeridos en el día anterior y leche predigerida en el caso de haber recibido suero fisiológico el día previo. El volumen administrado, como en el experimento 3, fue de 1ml. por cada mililitro de estímulo gustativo ingerido. Una hora más tarde, los animales recibían 15 grs. de alimento sólido, cuyos restos –en el caso de que los hubieren-, se retiraban 4 horas después.

Transcurridas las cuatro sesiones anteriores, se realizó una prueba final de elección durante el quinto día, en la cual se presentaban ambos estímulos gustativos simultáneamente -'fresa y coco'- durante 7 minutos y en la misma posición en que habían estado situados durante el período de adquisición. En este caso, los animales mantuvieron colocados los conectores para la infusión i.g. de productos, pero no se les administraba sustancia alguna. Se registraron las cantidades ingeridas de uno y otro estímulo gustativo.

A continuación se realizó la segunda fase, en la que los animales repitieron otras cuatro sesiones de entrenamiento, así como otro test de elección, idénticas en todos los aspectos a las anteriores, tanto en cuanto al procedimiento como a los estímulos utilizados. Por lo tanto, y en total, estos animales recibieron un conjunto de cuatro ensayos –cada ensayo completo duraba dos días- y dos test de discriminación gustativa, igual al número de ensayos efectuados en el experimento 3.

HISTOLOGÍA:

Finalizado el experimento, los animales fueron anestesiados con una sobredosis de tiopental sódico, perfundidos y el tejido nervioso sometido a un proceso similar al descrito en el experimento anterior, para el análisis histológico.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL										
SUJETOS	ENSAYO 1		ENSAYO 2		PRUEBA 1	ENSAYO 3		ENSAYO 4		PRUEBA 2
	SESION 1	SESION 2	SESION 3	SESION 4	SESION 5	SESION 6	SESION 7	SESION 8	SESION 9	SESION 10
50% LESION	FR izq	CO dch	FR izq	CO dch	FR izq	FR izq	CO dch	FR izq	CO dch	FR izq
50% FALSA L.	+	+	+	+	CO dch	+	+	+	+	CO dch
	LP	SF	LP	SF		LP	SF	LP	SF	
50% LESION	FR izq	CO dch	FR izq	CO dch	FR izq	FR izq	CO dch	FR izq	CO dch	FR izq
50% FALSA L.	+	+	+	+	CO dch	+	+	+	+	CO dch
	SF	LP	SF	LP		SF	LP	SF	LP	

Tabla 4.1: Procedimiento experimental utilizado en el paradigma de Aprendizaje secuencial (Abreviaturas: FR= fresa; CO= coco; izq= orificio izquierdo; dch= orificio derecho; LP= Leche predigerida; SF= Suero fisiológico).

RESULTADOS

Dos animales del grupo ‘Lesionado’ y uno del grupo control con ‘Falsa Lesión’ tuvieron que ser eliminados durante el curso del procedimiento experimental al desprenderse alguna de las fístulas, con lo cual el análisis de los resultados se llevó a cabo con 16 animales.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó un ANOVA ‘Grupo’ x ‘Sabor’, el cual arrojó los siguientes resultados:

En la primera prueba no hubo efectos significativos de ninguno de los factores ni de la interacción [Sabor: $F(1,14)=0,0350$ $p<0,8542$; Grupo: $F(1,14)=2,5902$ $p<0,1298$; GruposxSabor: $F(1,14)=0,0070$ $p<0,9340$].

En cambio, en la segunda prueba, existe un efecto significativo de la variable ‘Sabor’ [$F(1,14)= 27,1370$ $p<0,00013^{**}$], pero no de la variable grupo [$F(1,14)=1,9425$ $p<0,1851$] ni de la interacción SaborxGrupo [$F(1,14)=0,1776$ $p<0,6797$]. Si hacemos un análisis intrasujeto de la cantidad de Estímulo Gustativo consumido en cada grupo por separado, obtenemos que el efecto de esta variable ‘Sabor’ es significativo tanto en el grupo ‘Lesionado’ [$F(1,7)= 44,1164$ $p<0,00029^{**}$] como en el Grupo de ‘Falsa Lesión’ [$F(1,7)= 6,9859$ $p<0,0332^*$].

Merece ser destacado el hecho de que no hay efecto de ‘Grupo’ en la Prueba 1 [$F(1,14)=2,5902$ $p<0,1298$] ni en la Prueba 2 [$F(1,14)=1,9425$ $p<0,1851$], lo cual significa que ambos grupos se comportan de la misma manera en cuanto a la cantidad total de líquido que ingieren en la Prueba 1, y vuelven a comportarse igual en la Prueba 2. En la Prueba 1 ambos grupos ingieren cantidades aproximadamente iguales de los dos Estímulos Gustativos, pero en la Prueba 2 ambos grupos prefieren el sabor asociado a infusión intragástrica de alimento predigerido (Ver Figuras 4.1 y 4.2).

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

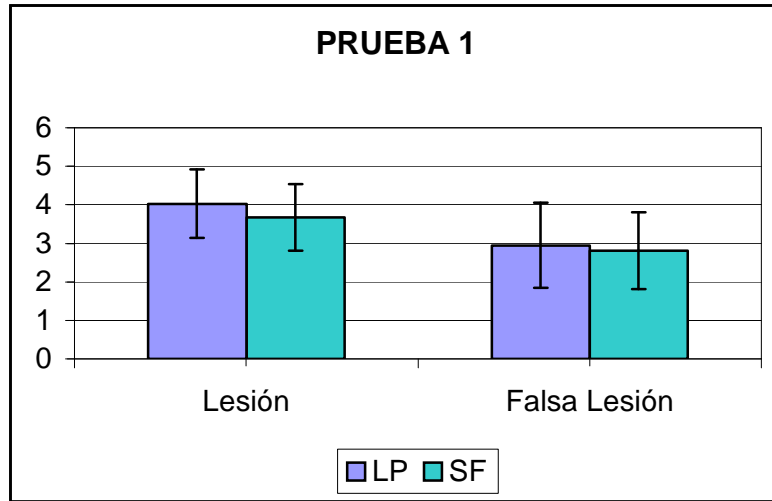


Figura 4.1: Ingesta de cada uno de los estímulos gustativos (Sabor + Leche Predigerida, LP; Sabor + Suero Fisiológico, SF) manifestada por los sujetos del grupo 'Lesionado' y del grupo con 'Falsa Lesión' durante la primera prueba de elección en el experimento 4.

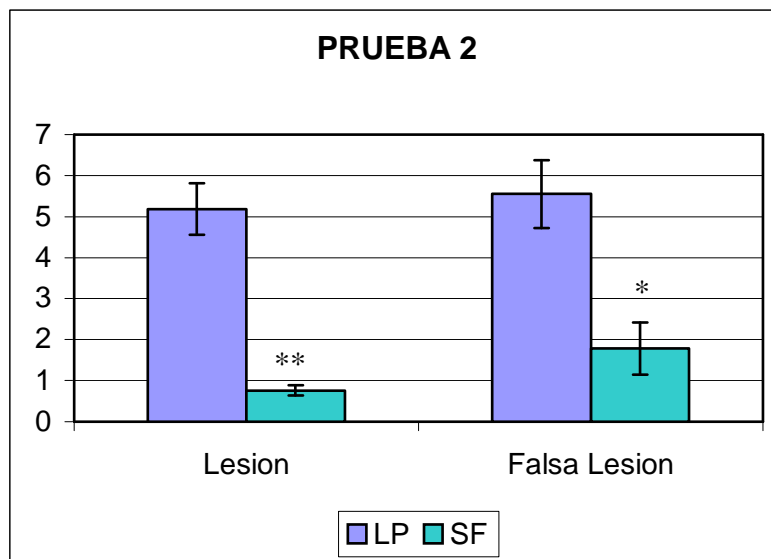


Figura 4.2: Ingesta de cada uno de los estímulos gustativos (Sabor + Leche Predigerida, LP; Sabor + Suero Fisiológico, SF) manifestada por los sujetos del grupo 'Lesionado' [$F(1,7) = 44.1164$, $p < 0.0002^{**}$] y del grupo con 'Falsa Lesión' [$F(1,7) = 6.9859$, $p < 0,032^*$] durante la segunda prueba de elección en el experimento 4.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este experimento ponen de relieve que las lesiones del subnúcleo Parabraquial lateral externo no interfieren en el aprendizaje discriminativo gustativo de tipo secuencial. En este caso, los animales lesionados, al igual que los que fueron sometidos a ‘falsa lesión’ -y por tanto, ‘neurológicamente intactos’-, fracasan en la primera prueba, después de dos ensayos de asociación. Pero, tras incrementar el número de ensayos de emparejamiento del estímulo gustativo con la inyección intragástrica de productos reforzantes en un número idéntico al experimento 3, manifiestan una clara preferencia por el sabor asociado a éstos en la segunda prueba de elección (Ver figuras 4.1 y 4.2 de este capítulo).

Este experimento vuelve a confirmar el carácter reforzante del alimento utilizado, que habrá sido sometido previamente al proceso endocrino de la ‘fase cefálica’, imprescindible para que la digestión, absorción y asimilación de los nutrientes se realicen en condiciones fisiológicas (Pavlov, 1910; Puerto et al., 1976a; 1976b; Tordoff & Friedman, 1989), todo ello en concordancia con datos previos obtenidos en nuestro laboratorio (Puerto et al., 1976a; 1976b; Zafra, 2000).

Además, los datos presentados están igualmente en concordancia con los resultados obtenidos por Mediavilla y colaboradores (Mediavilla et al., 2000) en un paradigma de Aprendizaje Aversivo Gustativo ‘secuencial’ en el que la estimulación visceral aversiva era presentada de forma demorada, y con otros trabajos previos en los que lesiones en diversos niveles del eje gástrico-vagal-NPBle no tenían ningún efecto sobre el aprendizaje secuencial (Arnedo et al., 1990; 1991; 1993; Zafra, 2000). Por tanto, las estructuras anatómicas del eje vagal parecen estar implicadas, de manera análoga, en ambas modalidades de aprendizaje, apetitivo y aversivo, pero siempre en relación con el aprendizaje concurrente. En efecto, el NPBle, que tan relevante se había mostrado en este aprendizaje, no parece ser esencial en los aprendizajes secuenciales –demorados-; y por tanto, otras estructuras diferentes parecen ser responsables de esta última modalidad (Gallo et al., 1988; Agüero et al., 1993 a; 1993b; Mediavilla et al., 2000; Cubero & Puerto, 2000b; Cubero et al., 2001).

DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos en los dos experimentos de este capítulo ponen de manifiesto que las lesiones electrolíticas del subnúcleo Parabraquial Lateral Externo (NPBle) interrumpen el aprendizaje discriminativo gustativo ‘concurrente’ cuando se utiliza como estímulo visceral la infusión intragástrica de alimentos predigeridos, los cuales a su vez han demostrado tener un valor motivacional positivo o reforzante en animales neurológicamente intactos. Sin embargo, estas mismas lesiones no tienen efecto sobre el aprendizaje cuando se introduce una demora, o lo que es lo mismo, en un paradigma ‘secuencial’. De este modo, si se intercala un intervalo de 15 minutos entre el estímulo gustativo y el visceral, los animales lesionados, al igual que los controles con ‘falsa lesión’, tras varias sesiones de asociación sabor-infusión i.g. de nutrientes, son capaces de aprender la tarea propuesta y esto sucede en un número de ensayos análogo a la prueba concurrente (4 ensayos).

El déficit de aprendizaje provocado por la lesión del NPBle podría ser debido a la interrupción en el procesamiento de información visceral, o bien de la información gustativa, al bloqueo en la formación/recuperación de una asociación viscerogustativa, o bien a la incapacidad para generar una respuesta motora (Reilly, 1999).

Está ampliamente demostrado que este subnúcleo constituye un importante relevo de la información visceral y somatosensorial periférica procedente del NTS caudal, donde tiene su primera sinapsis central, hacia estructuras anteriores (Fulwiler & Saper, 1984; Herbert et al., 1990; Bernard et al., 1994; Jia et al., 1994; Bester et al., 1995; Kobashi & Bradley, 1998; Reilly, 1999; De la Calle & Saper, 2000): Diversas manipulaciones de las fibras vagales aferentes, como la estimulación eléctrica (Gieroba & Blessing, 1994) o la administración de productos tales como ClNa hipertónico o ClLi (Kobashi et al., 1993; Gu et al., 1993; Swank & Bernstein, 1994; Yamamoto et al., 1992; 1993; 1994; Sakai & Yamamoto, 1997; Wang et al., 1999...) generan inmunorreactividad en esta zona Pble. Pero recientemente se ha demostrado también la presencia en esta región, de células que responden a estimulación gustativa y hedónica (Yamamoto et al., 1994; Halsell & Travers, 1997; Kobashi & Bradley, 1998) –negativa, por ejemplo, como es el caso de la quinina o el ácido clorhídrico, las cuales se localizan en la parte interna del subnúcleo y en las zonas caudales (Yamamoto, et al., 1994)-. Además se han encontrado células que

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

responden a estimulación gustativa positiva como sucrosa o lactosa (Yamamoto & Sawa, 2000 a; 2000b).

Aunque es difícil establecer una conclusión definitiva acerca de cual es el efecto de la lesión del NPBl, parece que no se trata de un déficit en el procesamiento de la información gustativa, ya que los animales del grupo lesionado que son entrenados en una tarea 'secuencial', tras varios ensayos de emparejamiento, prefieren el sabor asociado a la infusión i.g. de nutrientes (ver fig. 4.2 de este capítulo). Nuestros datos concuerdan en este sentido con los aportados por Reilly en el sentido de que las lesiones del NPBl que incluyen el subnúcleo lateral externo no producen modificaciones significativas en el patrón de ingesta espontánea de distintos estímulos gustativos tales como NaCl, Ácido Cítrico, Quinina y Sacarosa, ni en las cantidades ingeridas –salvando algunas diferencias metodológicas, ya que estos autores miden la ingesta en un test de 15 minutos de duración- (Reilly & Trifunovic, 2000a). En cambio, en un test de 24 horas, estos investigadores sí encuentran un incremento progresivo en el consumo de sacarosa (que en condiciones normales sigue un patrón en forma de U-invertida) y una reducción en la ingesta de ClNa a bajas concentraciones (Reilly & Trifunovic, 2000a). El efecto de atenuación del consumo de bajas concentraciones de ClNa y elevación de la ingesta de sacarosa, es explicado por los autores en base a que las lesiones de la zona parabraquial lateral habrían interrumpido el procesamiento de información visceral o la integración viscerosensorial, importante en aquellas sustancias que tienen consecuencias postingestivas (Reilly & Trifunovic, 2000a), lo cual llevaría a los animales a modificar progresivamente su consumo, de la misma manera en que aprende, tras varios ensayos, nuestro grupo lesionado en el experimento 4. Sin embargo, las lesiones realizadas por Reilly y cols. son mucho más extensas que las nuestras e incluyen toda la zona parabraquial lateral, de forma que podrían afectar al condicionamiento demorado, en concordancia con los resultados de otros experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio (Agüero et al. 1993a; 1993b; Cubero et al., 2001). De hecho, nuevos datos obtenidos por estos autores así lo confirman (Reilly & Trifunovic, 2000b).

Otra posibilidad más apropiada, nos hace suponer que la lesión puede haber afectado al procesamiento de la información visceral que hace uso de una vía vagal rápida, en concordancia con los hallazgos obtenidos en éste y otros laboratorios (Arnedo et al., 1990; 1991; 1993; Agüero et al., 1993 a; 1993b; 1997; Yamamoto et

al., 1992; Mediavilla et al., 2000; Zafra, 2000) e impide que éste tipo de información ejerza un papel modulador sobre la conducta ingestiva.

De hecho, se ha demostrado que la información viscerosensorial sobre el estado de privación de alimento provocado por fármacos como el Mercaptoacetato – que inhibe la oxidación de ácidos grasos- o el 2,5-Anhidro Mannitol –análogo a la fructosa, que causa glucoprivación- es procesada por el NPBl y posteriormente por los subnúcleos dorsal/central (Calingasan & Ritter, 1993; Ritter et al., 1994; Koegler et al., 1999; Horn & Friedman, 1998a), y que las lesiones de esta zona interrumpen el efecto producido (Calingasan & Ritter, 1993; Ritter, 1994; Grill et al., 1995).

Otro tanto puede decirse quizá con respecto a la colecistoquinina (CCK), una hormona peptídica normalmente liberada por el tracto gastrointestinal al paso de los nutrientes, y que genera una señal a corto plazo que informa al cerebro sobre la necesidad de finalizar la comida. Por tanto, actúa disminuyendo el tamaño de las comidas cuando es administrada exógenamente (Deutsch, 1990; Ritter et al., 1992a; Gibbs et al., 1993). Se ha visto que la administración i.p. de esta sustancia genera inmunorreactividad en distintas estructuras cerebrales: NTS, AP, NPBl (Li & Rowland, 1994; Rowland et al., 1996), antes de hacer sinapsis en otros subnúcleos como el NPB dorsal y NPBl interno (Takaki et al., 1990; Inagaki et al., 1984), NCeA –parte lateral anterior-, NLET –posterior y ventral- y NPV parvicelular hipotalámico (Li & Rowland, 1994; Rowland et al., 1996), unos efectos que son eliminados por vagotomía (Rowland et al., 1996) o por lesiones excitotóxicas que incluyen el NPBl (Trifunovic & Reilly, 2001a).

Estas mismas intervenciones modulan pero no eliminan completamente el efecto de la fenfluramina sobre la ingesta (Li, et al., 1994; Li & Rowland, 1995; Trifunovic & Reilly, 2001a). Este fármaco agonista serotoninérgico, actúa como un agente anoréctico y su administración periférica genera inmunorreactividad en el NTS, NPBl, CeA y NLET (siguiendo un patrón similar al provocado por la infusión de CCK), pero también en el NPBl superior, hipotálamo lateral y ventromedial y Caudado-Putamen (Li et al., 1994; Li & Rowland, 1995; Simansky & Nicklous, 2002), lo cual sugiere que el efecto anoréctico de este fármaco podría estar mediado, al menos en parte, por las mismas estructuras que se veían activadas tras la administración de CCK. Por otra parte, se ha encontrado también que la administración de anfetaminas produce actividad C-fos en esta zona PBl externa (Sakai & Yamamoto, 1997), lo que supone un apoyo adicional a esta hipótesis.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

Por tanto, estos datos sugieren la existencia de un sistema que recibe e integra información viscerosensorial, el cual se inicia en el vago e implica al NTS medial y NPBl, proyectando a estructuras prosencefálicas de la 'Amígdala extendida' como la parte lateral del Núcleo Central Amigdaloides (CeA) y NLET dorsolateral (Fulwiler & Saper, 1984; Herbert et al., 1990; Bernard et al., 1993; Alden et al., 1994; Jia et al., 1994; Bester et al., 1997; Jasmin et al., 1997; Cassell et al., 1999). Esta vía, relacionada con la nutrición (Fulwiler & Saper, 1984; Bernard et al., 1993; Alden et al., 1994; Rowland et al., 1996; Scharrer, 1999; Trifunovic & Reilly, 2001), podría estar implicada en el procesamiento de señales de saciedad, o bien podría desempeñar un papel importante en el efecto que los opiáceos tienen sobre la ingesta (Li et al., 1994; Li & Rowland, 1995; Trifunovic & Reilly, 2001a; Simansky & Nicklous, 2002; Hoebel, 1997).

Como ya se ha mencionado anteriormente, una amplia variedad de trabajos han puesto de manifiesto la participación de los opiáceos en la ingesta, en el sentido de que estas sustancias parecen tener un papel modulador sobre las propiedades motivacionales de la comida, modificando la 'palatabilidad' de los alimentos e incrementando su valor como incentivo. En este sentido, se ha comprobado que la ingesta de productos apetitosos estimula la actividad opiácea endógena (Le Magnen et al., 1980; Apfelbaum & Mandenoff, 1981; Le Magnen, 1992; 1999; Evans & Vacarino, 1990; Cooper & Higgs, 1994; Bodnar, 1996; Gosnell & Levine, 1996; Carr, 1996; Nencini, 1996; Vacarino, 1996; Mercer & Holder, 1997; Levine & Billington, 1997).

Estos efectos de los opiáceos sobre la ingesta parecen implicar su actuación sobre receptores μ y κ (Papadouka & Carr, 1994; Bodnar, 1996; Giraud et al., 1998a; Zhang et al., 1998). La región parabraquial, como ya se señaló en la Introducción de esta Tesis, contiene elevadas concentraciones de receptores opiáceos μ y moderadas de κ , los cuales se distribuyen en paralelo. Los receptores μ se localizan en los subnúcleos externo y central de la parte lateral, y específicamente en las dendritas de células que proyectan al N. Central Amigdaloides (CeA) –implicado en procesamiento de información viscerosensorial y nutritiva, como ya se ha mencionado anteriormente-, así como en el NPBl (Lynch et al., 1985; Wolinsky et al., 1996; Chamberlin et al., 1999). Por su parte, los receptores κ se localizan tanto en la zona dorsal como en la parte ventral y externa de esta estructura (Lynch et al., 1985; Mansour et al., 1988; 1994; Ding et al., 1996).

La palatabilidad de los alimentos no es una dimensión fija sino que puede verse modificada en función del estado de privación del individuo, de manera que cuanto mayor sea el grado de déficit fisiológico, mayor será también su valor reforzante, y viceversa (Berridge, 1996; Carr & Papadouka, 1994; Nader et al., 1997). Recientemente se ha demostrado que la restricción crónica de alimento produce modificaciones en el número de receptores opiáceos μ y κ presentes en el área parabraquial (Wolinsky et al., 1996) pero también en otras zonas como el CeA y NLET (Wolinsky et al., 1994; Carr et al., 1998). Por el contrario, la administración de fármacos agonistas/antagonistas específicos de estos receptores generan modificaciones en el consumo de productos apetitosos como la sacarina (Moufid-Bellancourt et al., 1996) lo que resalta de nuevo la importancia de esta vía NPble-CeA-NLET en algunos aspectos de la conducta nutritiva (Park & Carr, 1998; Carr et al., 1999).

Por tanto, los datos aportados hasta el momento permiten plantear la hipótesis de que el NPble, además de participar en procesos de naturaleza aversiva, procesa información referente a distintos aspectos reforzantes de la conducta nutritiva, como por ejemplo las señales de saciedad o el valor hedónico de los nutrientes. Esta información nutritiva es enviada, con toda probabilidad, hacia estructuras prosencefálicas como el Núcleo Central Amigdaloides y Núcleo Lecho de la Estría Terminal (Fulwiler & Saper, 1984; Herbert et al., 1990; Bernard et al., 1993; Alden et al., 1994; Jia et al., 1994; Bester et al., 1997; Jasmin et al., 1997; Cassell et al., 1999) y diencefálicas como el HTL y Ventromedial (Fulwiler & Saper, 1984; Bernard et al., 1991; 1993; Krukoff et al., 1993; Bester et al., 1997) con las que está conectado.

En definitiva, basándonos en los resultados obtenidos en este capítulo, podemos concluir que el Núcleo Parabraquial Lateral Externo está implicado en aprendizaje discriminativo gustativo inducido por la infusión intragástrica de productos de naturaleza reforzante, como son los alimentos predigeridos. Del mismo modo, parece que la disociación anatómica y funcional establecida a nivel periférico entre dos modalidades de aprendizaje, concurrente y demorado, se mantiene a nivel troncoencefálico (Arnedo et al., 1990; 1991; 1993; Agüero et al., 1993a; 1993b; Mediavilla et al., 2000; Zafra, 2000), siendo necesaria la integridad del NPble en la modalidad concurrente. Dada la importancia de la vía NPble-CeA-NLET, la

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

participación de estas estructuras en aprendizaje discriminativo gustativo concurrente es algo que queda aún por dilucidar.

CAPÍTULO IV

EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DEL NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL EXTERNO EN UNA TAREA DE APRENDIZAJE ESPACIAL

EXPERIMENTO 5**Efectos de la Estimulación Eléctrica del Núcleo Parabraquial Lateral Externo en una Tarea de Aprendizaje Espacial**

Los experimentos realizados hasta el momento ponen de manifiesto que en el NPBl existe una zona de procesamiento de información tanto apetitiva como aversiva, pues la activación de dicha región mediante Estimulación Eléctrica genera preferencias o aversiones por los estímulos gustativos asociados (Caps. I y II). A su vez, las lesiones de este subnúcleo interrumpen el aprendizaje discriminativo gustativo, cuando se utiliza como Estímulo Visceral, la administración intragástrica de productos reforzantes (alimentos predigeridos, ver Cap. III), o de sustancias tóxicas (Mediavilla et al., 2000), que son detectados y procesados por vías rápidas, antes de llegar a niveles centrales. Es decir que, la participación de este subnúcleo parabraquial lateral externo, parece ser clave cuando las demandas temporales de la tarea son muy exigentes (Cap. III; Zafra, 2000; Mediavilla et al., 2000).

Dado que la zona Parabraquial Lateral en general, y el NPBl en particular, es una importante zona de relevo de información viscerosensorial, como ya se ha puesto de manifiesto en repetidas ocasiones (Fulwiler & Saper, 1984; Herbert et al., 1990; Krukoff et al., 1994; Jia et al., 1994; Herbert & Bellintani-Guardia, 1995; Saper, 1995b; Krukoff & Loewi, 2000; De la Calle & Saper, 2000), estos resultados plantean una problemática en relación a si dicho efecto se restringe únicamente a asociaciones gustativo-visceral, o si, por el contrario, podría extenderse a situaciones estimulares diferentes como por ejemplo, aprendizaje espacial.

En el paradigma de Aprendizaje Espacial (también conocido como Condicionamiento de Preferencia por el Lugar), las propiedades motivacionales del estímulo administrado -una droga u otra sustancia-, son asociadas con estímulos ambientales, inicialmente neutros, que se convierten así en estímulos capaces de generar conductas de aproximación/evitación, cuando el sujeto se vea nuevamente expuesto a ellos (Tzschentke, 1998). Ha resultado ser un procedimiento eficaz en la investigación de los mecanismos cerebrales del refuerzo, como dan cuenta de ello los numerosos estudios en los que se consigue que los animales, entrenados en un laberinto, aprendan a elegir el compartimento asociado con comida (Lepore & Franklin, 1996), soluciones apetitosas de sacarosa o sacarina (Stefurak & Van der Kooy, 1992; 1994), interacción social o sexual, etc.(Tzschentke, 1998; Schechter &

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

Calcagnetti, 1998) y, sobre todo, se ha utilizado para estudiar las consecuencias afectivas de la mayoría de las drogas de abuso (Bechara & Van der Kooy, 1992a; 1992b; Bechara et al., 1993; Jaeger & Van der Kooy, 1993; 1996; Nader & Van der Kooy, 1994; 1997; Bals-Kubik et al., 1993; Shippenberg & Bals-Kubik, 1995; Olmstead & Franklin, 1993; 1997; Museo & Wise, 1994; Calcagnetti & Schechter, 1994; Maldonado et al., 1997; Ikemoto & Panksepp, 1999... para una revisión, consultar Tzschentke, 1998; Schechter & Calcagnetti, 1998; Shippenberg & Elmer, 1998). Asimismo, una de las ventajas de este procedimiento es que permite estudiar también otras propiedades motivacionales aversivas de las drogas de abuso -por ejemplo, el Síndrome de Retirada tras administración crónica de morfina-, y otros tratamientos -CILI-, cuyos efectos no se pueden estudiar mediante paradigmas de autoadministración (Spanagel et al., 1992; Reilly et al, 1993; Shippenberg & Elmer, 1998; Tzschentke, 1998).

Este tipo de Aprendizaje Espacial está considerado como una modalidad de Condicionamiento Clásico (pavloviano) en el que las consecuencias motivacionales de un reforzador son asociadas con determinadas claves ambientales. Según este procedimiento, una sustancia -por ejemplo, morfina- (EI, estímulo incondicionado) es administrada inmediatamente antes de que el animal sea situado en una determinada localización espacial y será allí donde experimente el efecto hedónico de la droga (RI, respuesta incondicionada), que es asociado con unas señales ambientales particulares (EC, estímulo condicionado), las cuales evocaran en el futuro una fracción de la reacción afectiva inicial (Tzschentke, 1998; Schechter & Calcagnetti, 1998; Shippenberg & Elmer, 1998). Cuando se usan estímulos naturales en lugar de drogas de abuso, y estos están disponibles en el ambiente donde se produce el Condicionamiento Espacial, el proceso es algo mas complejo, porque lo que se mide son respuestas de aproximación y permanencia en un espacio particular -‘instrumentales’-. A su vez, el contacto con el estímulo reforzante puede provocar la ejecución de conductas ‘consumatorias’ (ej. comer, beber) que son seguidas por una reacción hedónica, positiva o negativa. Por lo tanto, se establecen dos clases de asociaciones: a) Entre las propiedades de incentivo del EI y las señales ambientales, y b) entre las reacciones afectivas asociadas con la conducta consumatoria y estas claves externas (Agmo et al., 1995; Tzschentke, 1998; Spiteri et al., 2000).

Por otro lado, este procedimiento experimental se puede llevar a cabo de dos maneras distintas: mediante un método sesgado, más conservador, en donde el condicionamiento se produce en la localización inicialmente no preferida, de modo

que el animal tiene que superar su rechazo inicial, o bien, mediante un procedimiento no sesgado, preferido por los investigadores, en el que no existe preferencia previa por una determinada localización espacial (Tzschentke, 1998; Schechter & Calcagnetti, 1998).

Diferentes estudios han pretendido examinar el substrato cerebral implicado en el establecimiento del condicionamiento espacial inducido por distintos productos. Algunas investigaciones muestran bloqueo en el condicionamiento inducido por anfetaminas, cocaína, morfina o reforzadores naturales tras lesiones del N. Accumbens, Área Tegmental Ventral, Pálido Ventral, Amígdala Lateral o Hipocampo (Shippenberg et al., 1993; Museo & Wise, 1994; Shippenberg & Bals-Kubik, 1995; Olmstead & Franklin, 1997; Schroeder & Packard, 2000; Shippenberg & Elmer, 1998; Tzschentke, 1998), aunque existen discrepancias entre los resultados obtenidos por distintos autores (Olmstead & Franklin, 1997; Shippenberg & Elmer, 1998; Tzschentke, 1998). Sin embargo, mayor consistencia parecen tener los datos relativos a la participación del Núcleo Tegmental Pedúnculo-Pontino (NTPP) en Condicionamiento Espacial, pues lesiones de dicha zona afectan al condicionamiento inducido por anfetaminas, sacarina, comida o morfina (Bechara & Van der Kooy, 1989; 1992a; 1992b; Bechara et al., 1992; Stefurak & Van der Kooy, 1994; Nader & Van der Kooy, 1994; Nader et al., 1997; Olmstead & Franklin, 1993; 1994; 1997; Bechara et al., 1998; Tzschentke, 1998).

En relación al área Parabraquial, los resultados son ambiguos respecto a su participación en el condicionamiento espacial inducido por CILi (Reilly et al., 1993). En otro estudio, las lesiones de la zona parabraquial lateral bloquearon el condicionamiento espacial aversivo inducido por la administración periférica de morfina, lo que ha sido interpretado por los autores como una interrupción en el procesamiento de las propiedades motivacionales-aversivas de la morfina, que tienen lugar cuando esta sustancia actúa sobre el sistema gastrointestinal (Bechara et al., 1993).

De hecho, se ha propuesto que las drogas de abuso podrían actuar sobre los mismos substratos neurales que los reforzadores naturales, activando la vía dopaminérgica mesocorticolímbica de refuerzo (Kelley & Berridge, 2002; Fernández-Espejo, 2002), aunque los efectos producidos por unas y otros son ampliamente discutidos: Así algunos investigadores afirman que la motivación producida por la morfina y la comida es isomórfica, basándose en que los animales

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

privados de comida prefieren el lugar asociado con la infusión de morfina aunque ésta sea irrelevante para su estado fisiológico, siendo este efecto bloqueado por antagonistas dopaminérgicos (Nader & Van der Kooy, 1994); pero habría que demostrar también lo contrario, es decir, que la comida es capaz de sustituir los efectos motivacionales de la droga en animales adictos. En el mismo sentido, se ha observado también, que la privación de comida facilita o potencia el establecimiento del condicionamiento espacial inducido por drogas –cocaína, morfina- (Bechara & Van der Kooy, 1992a; Bell et al., 1997; Tzschentke, 1998), y que la ingesta de soluciones de sacarosa mejoran la adquisición de este aprendizaje (Agmo et al., 1995; Arnould & Agmo, 1999). A su vez, el efecto de Condicionamiento Espacial inducido por comida puede ser bloqueado por naloxona, α -flupentixol, pimocida, racloprida y SCH 23390 (Agmo et al., 1995; Tzschentke, 1998).

Por tanto, parece probable que el cerebro evolucionó para dar respuestas adecuadas a estímulos naturales claves para la supervivencia y la reproducción como la comida, la bebida o el sexo. Pero en este proceso evolutivo, han aparecido nuevas maneras de estimular artificialmente los sistemas de refuerzo –especialmente la vía mesocorticolímbica, especializada en la formación de hábitos de conducta- (Kelley & Berridge, 2002, Fernández-Espejo, 2002). Las drogas podrían actuar sobre estos sistemas de varias formas, no necesariamente excluyentes: 1) activando estos mecanismos, con la misma intensidad que lo harían los reforzadores naturales, 2) sensibilizando, distorsionando y modificando cuantitativamente los sistemas cerebrales implicados en el proceso de motivación de incentivo y refuerzo –el sistema mesocorticolímbico- para provocar una conducta compulsiva (Di Chiara, 1998; Robbins & Everitt, 1999; Berke & Hyman, 2000; Robinson & Berridge, 2003; Hyman & Malenka, 2001). 3) Finalmente, las drogas adictivas podrían modificar los circuitos cerebrales del refuerzo y reclutar, además, nuevos sistemas: por ejemplo, los responsables de los estados aversivos del síndrome de retirada, que ejercerían una acción oponente a la de los mecanismos implicados en el procesamiento de los aspectos reforzantes (Kreek & Koob, 1998; Koob & Le Moal, 2001). En definitiva, parece que las drogas usurpan y modifican los procesos motivacionales y conductuales normales que están a la base de los reforzadores naturales.

Este paradigma de condicionamiento espacial, podría ser utilizado también para estudiar las consecuencias hedónicas positivas o negativas de la Estimulación Eléctrica de una determinada zona del cerebro. En el procedimiento utilizado aquí, al igual que ocurre cuando se utilizan estímulos naturales disponibles en el ambiente, la

posibilidad de que el animal deambule libremente por el laberinto, permite establecer que en una cierta zona reciba estimulación eléctrica y en otras no (Vezina & Stewart, 1987). Esta modificación hace mas complejo el proceso ya que el animal puede actuar para recibir estimulación o huir de ella, además de asociar ‘clásicamente’ las consecuencias de la estimulación o ausencia de ella con unas determinadas claves ambientales; sin embargo, como contrapartida, podemos obtener un efecto mas potente que el que obtendríamos mediante un condicionamiento pavloviano (Tzschentke, 1998).

De acuerdo con estos planteamientos, el propósito de este experimento es doble: primero, examinar si la Estimulación Eléctrica del NPBlé induce preferencias/aversiones específicas hacia los estímulos gustativos asociados, -tal y como observamos en el capítulo II de esta Tesis-, o si, por el contrario, tiene lugar de manera generalizada hacia otras claves estímulares distintas. Y, segundo, valorar este efecto en un paradigma que elimine los efectos de la demora, dado que los experimentos previos ponen de manifiesto la labilidad del efecto, que desaparece al introducir un intervalo temporal. Para poner a prueba estas hipótesis, animales implantados con electrodos en el NPBlé y sus correspondientes controles, fueron sometidos a una prueba de Condicionamiento Espacial repetida en dos ocasiones. Dado que los animales podían elegir libremente entre las dos opciones -lugar asociado a estimulación y lugar no asociado a estimulación-, la existencia o no de una correlación significativa entre las dos sesiones, será indicativa del grado de consistencia o aleatoriedad de la estimulación eléctrica del NPBlé así como de sus efectos aversivos o recompensantes.

MÉTODO

SUJETOS:

Para este experimento, fueron utilizadas 40 ratas macho de la raza Wistar procedentes del animalario de la Universidad de Granada, cuyos pesos al comenzar el procedimiento experimental se encontraban comprendidos entre 250 y 305 grs. Los animales fueron distribuidos en grupos de 4, colocados en jaulas de plexiglás de 30x30x30 cm. -de características similares a las descritas en los Experimentos 1 y 2 de esta Tesis- y mantenidos con comida y agua ‘ad libitum’ durante una semana de habituación previa a la cirugía. Las condiciones ambientales de luz y temperatura

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

fueron mantenidas constantes, según el rango descrito en el experimento 1 y las manipulaciones experimentales fueron llevadas a cabo durante el período de luz.

PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO:

De estos 40 animales, 33 fueron sometidos a una intervención quirúrgica consistente en la colocación de un electrodo monopolar en el NPble izquierdo, cuyas coordenadas fueron idénticas a las descritas en los experimentos 1 y 2 de esta Tesis (AP=-0,16; V=3, L= $\pm 2,5$ a partir de la referencia interaural, según el Atlas Estereotáxico de Paxinos & Watson, 1996). El electrodo ‘masa’ con el que se cerraba el circuito fue fijado al cráneo mediante 4 tornillos de acero inoxidable y recubierto todo el implante con resina acrílica, siguiendo los pasos descritos en el apartado denominado ‘cirugía e instrumental’ del experimento 1.

Los restantes 7 animales fueron utilizados como Grupo Control sin estimulación, a los que se implantó solamente el electrodo masa, que quedó fijado al cráneo mediante tornillos de acero inoxidable y resina acrílica.

Concluida la intervención quirúrgica, todos los animales fueron instalados en jaulas individuales de las características que se señalaron en el experimento 1, donde permanecieron durante un período de recuperación mínimo de 8 días desde la finalización de la fase quirúrgica en el último animal. Durante este periodo los animales dispusieron de comida y agua ‘ad libitum’ y se les aplicó diariamente una solución antiséptica sobre el implante (*Betadine*, Povidona Yodada. Asta Médica. Madrid) para prevenir infecciones y acelerar el proceso de recuperación.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL:

Fase de Exploración previa al Condicionamiento:

Antes de proceder a la Fase de Condicionamiento al Lugar, se realizó una exploración respecto a la corriente eléctrica que los animales eran capaces de soportar, con objeto de utilizar la intensidad óptima con la que íbamos a estimular a cada animal. Para ello, dos días antes del inicio del procedimiento conductual, se sometió a cada animal, dentro su jaula, a estimulación eléctrica del NPble. Se utilizó corriente directa pulsante y de voltaje creciente, comenzando desde 0,2 voltios y aumentando de 0,2 en 0,2 voltios hasta llegar al máximo capaz de soportar cada sujeto, intentado evitar a la par conductas de escape, saltos o reacciones vocales. Por lo tanto, se fijó un criterio consistente en la aplicación de ‘una corriente conductualmente noticable, pero siempre por debajo del umbral aversivo’. Entre

cada ensayo de estimulación, de aproximadamente 3 minutos, en que se aumentaba una unidad de voltaje, se introdujo un periodo de descanso de 2 minutos para evitar dañar la zona. Finalmente, procedimos a calcular la intensidad de corriente que recibió cada animal que utilizaríamos en la fase experimental. Los valores del grupo oscilaron entre 55 y 92 microamperios, con una media de 71,77 μA (Para consultar estos valores, pasar a la tabla 7 del Anexo II). Se dejó transcurrir un día de descanso entre esta prueba y el comienzo de la fase de Condicionamiento, en el que los animales dispusieron de comida y agua 'ad libitum'.

Fase de Condicionamiento Espacial:

La Fase Experimental fue llevada a cabo en un Laberinto con forma de Corredor, cuyas dimensiones eran: 48 cm. de largo x 25 cm. de ancho x 30 cm de altura. El recinto interior estaba dividido en dos zonas laterales diferentes en cuanto a color y textura, pero igualmente preferidas por los animales y una tercera zona central, neutra: Esta parte central, mas estrecha, tenía una superficie de 8x 25 cm., cuyo suelo era de metacrilato blanco, y las paredes de color madera-natural. Los dos laterales, cuyo suelo estaba formado por un panel de corcho blanco pintado a rayas en un caso, y un panel de corcho marrón en el otro, medían 20x25 cm. cada uno. Las paredes de ambos laterales estaban forradas de papel pintado a rayas blancas y negras de 1 cm. de espesor, orientadas en sentido vertical en un lado y horizontal en el otro. Este corredor fue colocado sobre una mesa en el centro de la habitación donde se llevó a cabo la fase experimental, orientado en sentido paralelo a la ventana de la sala y equidistante de las paredes laterales, pero perpendicular a las barras fluorescentes que iluminaban la estancia.

Cada animal fue sometido a **dos sesiones** de Condicionamiento Espacial, en días consecutivos, de 10 minutos de duración cada una. En este período de tiempo en que los sujetos podían deambular libremente por el corredor, recibían estimulación si permanecían en uno de los laterales del laberinto o no recibían nada si se iban hacia el otro lado.

Se comenzaba situando a cada rata en el espacio central del laberinto y a continuación se le permitía deambular libremente por él durante los 10 minutos que duraba el ensayo, registrándose el tiempo que permanecía en cada zona, de modo que si entraban en el compartimento prefijado, recibían estimulación eléctrica simultáneamente. Se utilizó como criterio para considerar que un animal estaba dentro de uno de los laterales cuando tenía la cabeza y las patas delanteras dentro de

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

ese lateral. Previamente se habían distribuido aleatoriamente a todos sujetos en dos grupos, de manera que la mitad de ellos recibió estimulación en uno de los compartimentos y el 50% restante en el otro compartimento. El grupo 'Control sin estimulación' no recibió estimulación en ninguno de los compartimentos. Finalizado el tiempo, los animales eran devueltos a su jaula, donde disponían de comida y agua 'ad libitum'.

Finalizada la prueba de Condicionamiento al Lugar, los animales del grupo experimental fueron sometidos individualmente a una prueba de autoestimulación intracerebral (Olds & Milner, 1954), que se realizó en una caja de Skinner mediante moldeamiento, tal como se describe en el apartado denominado 'Prueba de Autoestimulación' del experimento 1 de esta Tesis.

HISTOLOGÍA:

Concluido el experimento, los animales fueron perfundidos transcárdialmente con 40 ml. de suero fisiológico y otros 40 ml. de formaldehído al 4%. Se cortaron secciones coronales de tejido nervioso, de 50 micras, las cuales fueron montadas y teñidas siguiendo el procedimiento descrito en el Capítulo 1 de esta Tesis (Microfotografía 4.1).



Microfotografía 4.1: Preparación histológica en donde se muestra la localización de una pequeña lesión en la zona del extremo del electrodo representativa de las realizadas en el experimento 4.

RESULTADOS

De los 33 animales a los que se implantó un electrodo en el NPBl, 4 tuvieron que ser eliminados porque presentaban conducta de giro y 2 porque se les desprendió el implante, con lo cual quedaron 27 ratas experimentales. También hubo que eliminar dos animales del Grupo ‘Control sin estimulación’ porque se les desprendió también el implante, quedando en total 5 sujetos en este grupo.

Si comparamos la ejecución de los animales experimentales en las dos sesiones de condicionamiento, podemos observar una correlación altamente significativa entre estos dos días ($r = 0,86852$, $p < 0,001^{**}$), lo cual significa que su conducta de preferencia o rechazo por el lugar estimulado es altamente consistente (Fig 5.1). En cambio, los animales del Grupo Control ‘sin estimulación’, alternan entre ambos laterales del corredor ($r = -0,08239$ $p < 0,895$), no observándose preferencia por uno u otro (Fig. 5.2).

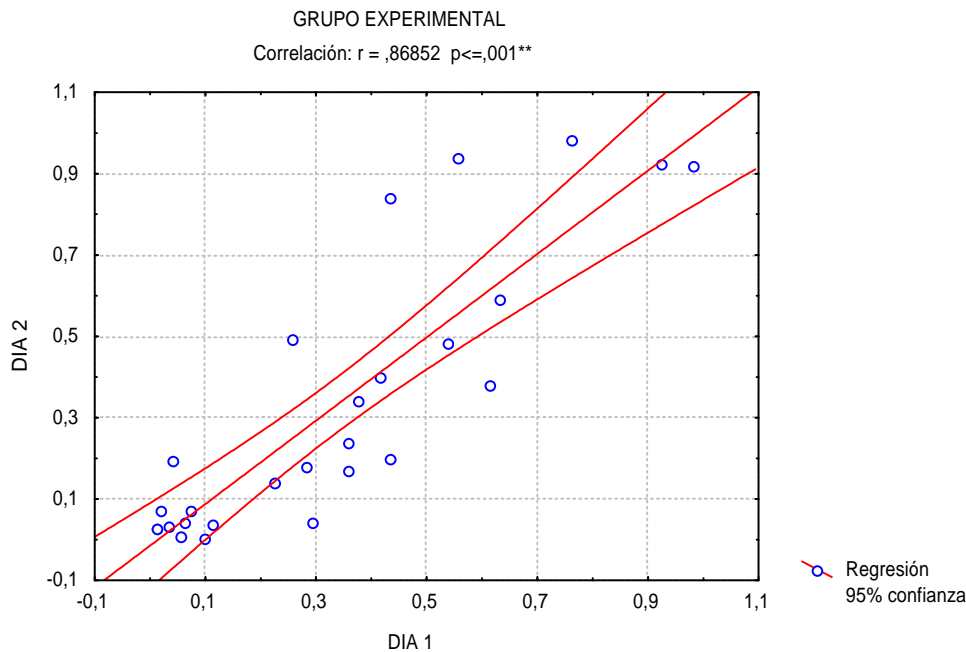


Figura 5.1: Matriz de correlación para los sujetos del Grupo ‘Experimental’ respecto a la proporción de tiempo que permanecen en el Compartimento Estimulado en cada una de las dos sesiones de condicionamiento.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

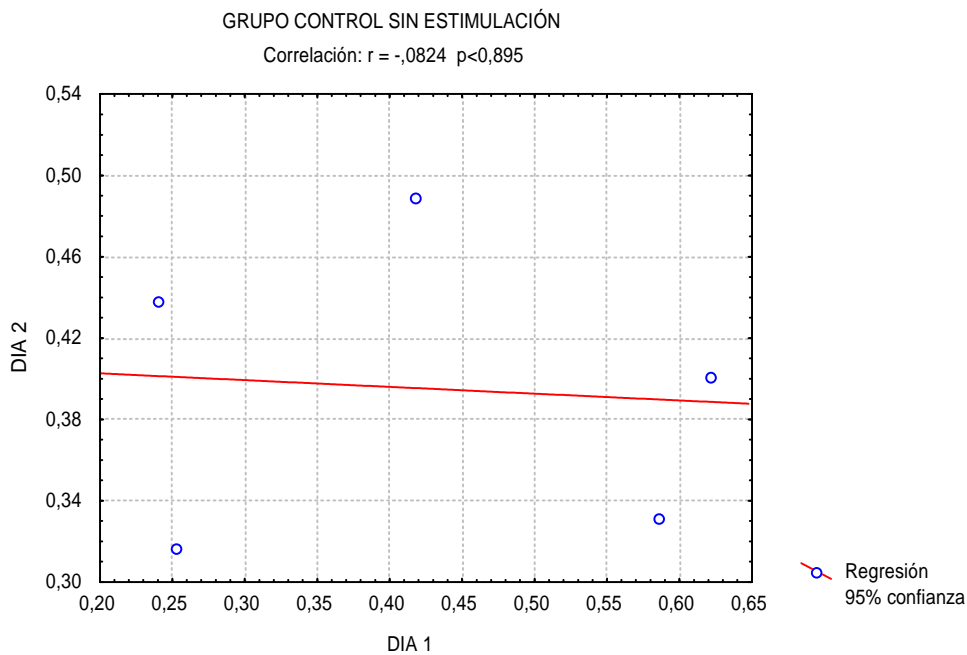


Figura 5.2: Matriz de correlación para los sujetos del Grupo ‘Control Sin Estimulación’ respecto a la proporción de tiempo que permanecen en uno de los dos compartimentos, seleccionado al azar, en cada una de las dos sesiones de condicionamiento.

Si observamos los datos referentes a los animales experimentales –que recibieron estimulación eléctrica en el NPBl-, podemos clasificarlos en tres grupos en función de su comportamiento: un grupo de animales prefiere claramente el lugar de la estimulación, otro grupo de animales no muestra una conducta clara de rechazo o preferencia, aunque parece que tiende a evitar la estimulación, y otro grupo de animales rechaza claramente el lugar de la estimulación. El establecimiento de un criterio comportamental consistente en considerar a los animales como positivos si permanecen más del 60% del tiempo total en el compartimento asociado a la estimulación, indiferentes si pasan entre el 30%-60% de este tiempo en el lugar estimulado, y negativos si permanecen menos del 30% de este tiempo en dicha zona, calculado teniendo en cuenta el promedio de los dos ensayos, permitió establecer tres grupos de 6, 6 y 15 animales, respectivamente (figura 5.4, tabla izquierda).

Este criterio comportamental fue corroborado estadísticamente mediante un ‘Análisis de Cluster’ calculado en función de la proporción de tiempo que cada sujeto permanece en el compartimento estimulado en cada una de las sesiones, con ligeras variaciones que solo supusieron una alteración en la composición de los

grupos de 1-2 animales, como se observa en la figura 5.4. A su vez, este análisis estadístico considera al Grupo 'Control sin estimulación' dentro del conglomerado 2 de animales que no tienen una preferencia definida.

CRITERIO CONDUCTUAL		ANÁLISIS DE CLUSTERS		
Nº DE CASO	GRUPO	Nº DE CASO	CONGLOMERADO	DISTANCIA
1	3	1	2	0,0866
2	1	2	1	0,0879
3	3	3	3	0,1029
4	2	4	2	0,0247
5	3	5	3	0,0567
6	3	6	2	0,1499
7	3	7	3	0,1132
8	3	8	3	0,0573
9	3	9	3	0,0435
10	1	10	1	0,1919
11	3	11	2	0,1298
12	3	12	3	0,0487
13	3	13	3	0,0135
14	3	14	3	0,0196
15	3	15	3	0,0403
16	3	16	3	0,0242
17	3	17	3	0,0424
18	1	18	1	0,1530
19	2	19	2	0,1494
20	1	20	1	0,2021
21	2	21	2	0,0380
22	1	22	1	0,1232
23	1	23	1	0,1988
24	2	24	2	0,1314
25	2	25	2	0,1064
26	3	26	3	0,1471
27	2	27	2	0,1441
I	2	I	2	0,1238
II	2	II	2	0,1536
III	3	III	2	0,1133
IV	2	IV	2	0,1007
V	2	V	2	0,1368

Figura 5.3: Agrupamiento de los sujetos en conglomerados: Tabla izquierda, según el criterio conductual definido previamente. Tabla derecha, teniendo en cuenta los resultados estadísticos del 'Análisis de Clusters'; aquí se incluye además, la distancia de cada individuo a la media de su conglomerado. (Conglomerado 1: animales positivos; conglomerado 2: animales indiferentes; conglomerado 3: animales negativos. Los animales que recibieron Estimulación son designados mediante numeración arábiga y los del Grupo Control -sin estimulación- mediante numeración romana.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

A continuación recogemos la media y desviación típica de cada agrupamiento en cada una de las sesiones de condicionamiento en la tabla 5.1 y en la figura 5.4. El grupo control sin estimulación ha quedado asimilado en el Cluster 2.

	CONGLOMERADO 1		CONGLOMERADO 2		CONGLOMERADO 3	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
Media	0,715	0,866	0,410	0,346	0,086	0,058
DT	0,212	0,141	0,133	0,114	0,087	0,057

Tabla 5.1: Estadística descriptiva de cada uno de los ‘agrupamientos’ o ‘conglomerados’ resultantes del ‘Análisis de Clusters’. Los valores reflejan la media y desviación típica de cada uno de los conglomerados en las dos sesiones de Condicionamiento Espacial. Dichos valores han sido calculados tomando como base la proporción de tiempo que los animales del grupo experimental pasan en el lugar donde reciben estimulación, frente al tiempo total, en cada una de las sesiones. En el caso de los animales que no recibieron estimulación, se toma como referencia el tiempo que pasan en uno de los dos compartimentos, seleccionado al azar para cada sujeto.

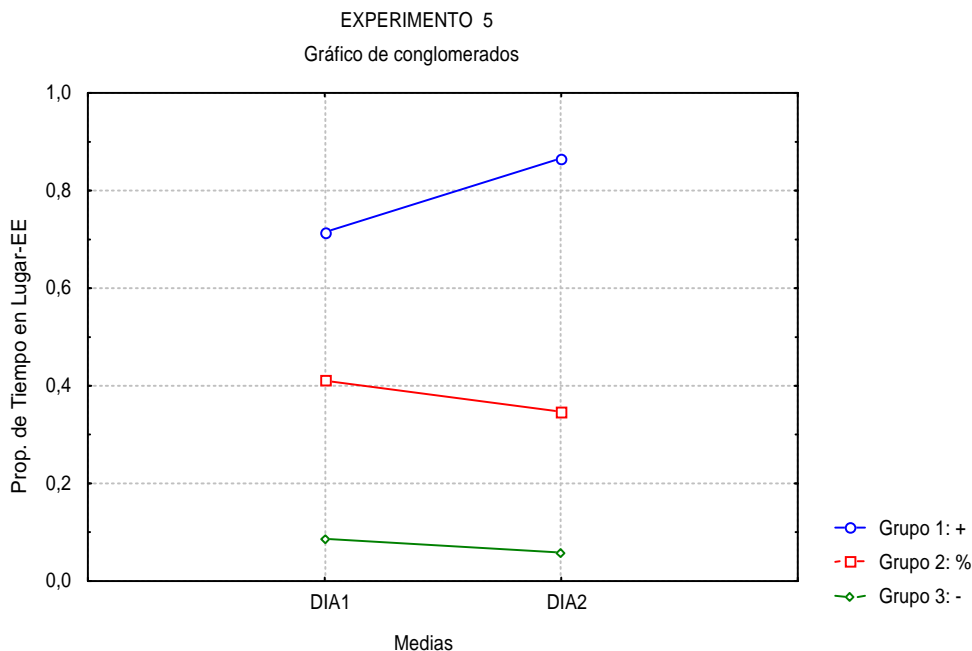


Figura 5.4: Proporciones medias del tiempo que pasan los animales de cada agrupamiento en el compartimento estimulado, en cada una de las sesiones. (Grupo 1: animales que prefieren el compartimento estimulado. Grupo 2: animales que no muestran preferencia clara por uno de los compartimentos del laberinto. Grupo 3: animales que prefieren el compartimento no estimulado).

Finalmente, hay que señalar que durante las pruebas efectuadas para inducir Autoestimulación Intracerebral (Olds & Milner, 1954) ninguno de los animales experimentales mostró las respuestas instrumentales referidas de presión de la palanca de manera espontánea, a pesar del moldeamiento conductual que se realizó previamente de dicha conducta.

DISCUSIÓN:

Los resultados de este experimento vuelven a poner de manifiesto que la Estimulación Eléctrica del NPBe genera tanto conductas de preferencia, como efectos aversivos, en este caso, hacia los estímulos ambientales con los que es asociada entre los animales del grupo experimental, y este resultado es consistente a través de las dos sesiones de Condicionamiento Espacial. Hay además otro grupo de animales experimentales que no muestra una tendencia clara, a pesar de que su comportamiento es también consistente entre sesiones.

Por su parte, los animales del grupo ‘control sin estimulación’ alternan entre los dos compartimentos del laberinto sin mostrar una tendencia clara y con resultados carentes de consistencia, algo que cabía esperar si se tiene en cuenta que estos animales no reciben estimulación y que se ha utilizado un procedimiento de Condicionamiento Espacial no sesgado.

Los resultados obtenidos en este experimento vuelven a plantear de nuevo una cuestión clave, que es la referente a la acción fisiológica específica que ejerce la estimulación del NPBe, y que finalmente da como resultado la inducción de preferencias y aversiones. Una posibilidad apunta a que la estimulación eléctrica podría estar evocando patrones neurales específicos, que en condiciones naturales son generados por la información visceral positiva o negativa, la cual, a su vez, al ser asociada con claves ambientales, induce preferencia o rechazo por una determinada localización espacial. En su caso, el efecto sería entonces, similar al observado tras la presentación de un estímulo gustativo que es asociado con beneficios metabólicos o con la inyección intragástrica de alimentos (Puerto et al., 1976a; 1976b; Zafra, 2000; experimento 3 de esta tesis), o bien con la sensación de malestar provocada por un agente tóxico (Mediavilla et al., 2000) o por el contrario, por un estímulo

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

nociceptivo, respectivamente (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 se puede hipotetizar que la Estimulación Eléctrica del NPBe podría haber activado substratos generales de refuerzo/aversión sobre los que, por ejemplo, actúan las drogas de abuso, y en particular sobre el sistema opiáceo, dado que en esta zona se encuentran altas concentraciones de receptores μ y κ (Mansour et al., 1988; 1994; Wolinsky et al., 1996). En efecto, algunos resultados obtenidos por el grupo de Bechara y Van der Kooy implican a esta región en el procesamiento de las propiedades aversivas de la morfina (Bechara et al., 1993). Al mismo tiempo, la inyección intraparábraquial de morfina en animales no-lesionados modificó la preferencia espontánea de los animales por una solución de sacarina transformándola en aversión, al parecer debido a un predominio de su actuación sobre receptores κ , pues este efecto fue reproducido mediante una mezcla de agonistas μ y κ e invertido tras el bloqueo de estos últimos receptores con un antagonista específico (Moufid-Bellancourt & Velley, 1994; Moufid-Bellancourt et al., 1996). Estos datos son compatibles con los resultados de este experimento en los que se encuentra que la estimulación eléctrica del NPBe genera, en algunos animales, rechazo hacia los estímulos asociados.

La evidencia respecto a la implicación del área parabraquial lateral externa en procesos motivacionales positivos es mucho más controvertida e indirecta. Así, el grupo de Van der Kooy no ha podido demostrar la participación de esta estructura en el sistema de refuerzo (Nader et al., 1997), aunque sí la implica en la codificación de las propiedades discriminativas de la morfina (Jaeger & Van der Kooy, 1993; 1996). Otros autores solo observan un incremento en el consumo de soluciones apetitosas tras el bloqueo de los receptores κ y/o la administración simultánea de agonistas específicos de los receptores μ en esta zona parabraquial (Moufid-Bellancourt et al., 1996).

Algunos investigadores consideran como dos procesos independientes, por una parte, la codificación del valor afectivo o hedónico de un estímulo, y por otra, su capacidad para actuar como incentivo guiando la conducta (Berridge & Robinson, 1998; Kelley & Berridge, 2002; Robinson & Berridge, 2003), al tiempo que proponen la implicación de diferentes neurotransmisores en estos procesos (Agmo et al., 1995; McFarland & Ettenberg, 1998; 1999). Por tanto, el hecho de que el grupo de Van der Kooy encuentre que el área parabraquial se relaciona con el

procesamiento de las propiedades discriminativas de la morfina (Jaegger & Van der Kooy, 1993; 1996) está, al menos parcialmente, en consonancia con nuestros resultados, al suponer la implicación de esta zona en, al menos, el aspecto de incentivo de los reforzadores, aumentando el valor de determinadas señales frente a otras. Sin embargo, Yamamoto ha observado la activación de esta zona PBL tras la administración de diversas drogas de abuso –cocaína, morfina y anfetaminas- así como de sustancias alimenticias –glucosa, lactosa-, pudiendo actuar todas ellas como reforzadores (Sakai & Yamamoto, 1997; Yamamoto & Sawa, 2000a), lo cual podría significar, en contraposición a los resultados del grupo de Van der Kooy, que área Parabraquial Lateral externa también podría intervenir en el procesamiento del valor reforzante de dichos estímulos. Por ahora, nuestros datos no permiten disociar ambos efectos, y por tanto, no podemos descartar la idea defendida por otros autores de que dichos efectos –hedónico y de incentivo- podrían depender de un mismo circuito, aunque con aportaciones específicas por parte de distintas estructuras y conexiones (Wise, 2002; Schultz, 2002; Koob & Le Moal, 2001). Por otro lado, aunque todavía no está bien entendido cual es el papel de los sistemas clásicamente implicados en refuerzo, como es la vía mesolímbica, la mayoría de los investigadores parecen converger en la idea de una función integradora y dinamizadora de la conducta y/o de anticipación de sus consecuencias (Salamone, 1994; Salamone et al., 1994; 1997; Ikemoto & Panksepp, 1999; Di Chiara, 1998; 1999; Schultz, 1997; 2002; Schultz et al., 1998; Wise, 2000), mas allá del aspecto puramente reforzante, planteado inicialmente por Wise (Wise & Rompré, 1989; Wise, 1982; 1994; 1996).

Aunque la mayor parte de los autores sostiene que existe un sustrato común para los reforzadores naturales y las drogas de abuso, que se habría desarrollado para dar respuestas adecuadas a estímulos naturales claves para la supervivencia y la reproducción, como la comida, la bebida o el sexo, sobre él actuarían también aquellas drogas de abuso mencionadas. Éstas, podrían estimular artificialmente dicho circuito –especialmente la vía mesocorticolímbica, especializada en la formación de hábitos de conducta- usurpando y modificando los procesos motivacionales y conductuales normales (Hoebel, 1997; Di Chiara, 1998; Kreek & Koob, 1998; Robbins & Everitt, 1999; Berke & Hyman, 2000; Berridge & Robinson, 1998; Hyman & Malenka, 2001; Koob & Le Moal, 2001; Kelley & Berridge, 2002; Fernández-Espejo, 2002; Robinson & Berridge, 2003), pero existe también un pequeño grupo de estudios que apuntan en dirección contraria:

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

Por ejemplo en un experimento realizado con técnicas de registros unicelulares, se comprobó que las neuronas del N. Accumbens exhibían distintos patrones de actividad ante reforzadores naturales (agua y comida) y cocaína (Carelli et al., 2000). Estas diferencias, a nuestro parecer, se podrían explicar, alternativamente, en función del grado de privación y/o dependencia, dado que los animales habían sido entrenados previamente para autoadministrarse las drogas, lo cual podría llevar a modificar el funcionamiento del sistema, sensibilizándolo y distorsionándolo hasta provocar conductas compulsivas.

Incluso hay autores que también consideran que el aprendizaje inducido mediante un paradigma de Condicionamiento Espacial tiene consecuencias comportamentales diferentes según se utilicen drogas de abuso o reforzadores naturales: En el primer caso los animales permanecen la mayor parte del tiempo en el compartimento reforzado, en contacto con las claves ambientales que han sido asociadas al efecto de la infusión de morfina, mientras que en el segundo caso el condicionamiento es más complejo, y, aunque los animales pasan igualmente mucho tiempo en el compartimento reforzado, exhiben mayor número de conductas exploratorias o de búsqueda (Spiteri et al., 2000).

Las observaciones sobre el comportamiento de nuestros animales no nos permiten decidir, por el momento, si el condicionamiento espacial inducido por estimulación eléctrica del NPBe se parece más al descrito por Spiteri y asociados en el caso de la utilización de morfina, o al de la comida, en donde predomina su capacidad para actuar como dinamizador de la conducta, generando muchas entradas y salidas en el compartimento reforzado, puesto que no se han incluido y estudiado grupos de animales a los que se le administre droga o comida. Pero dado que la estimulación eléctrica genera preferencias por cualquier tipo de estímulos con los que es asociada (claves ambientales en este caso, pero también estímulos gustativos como se observó en los experimentos 1 y 2 de esta tesis), y, por otra parte, las lesiones de esta zona interrumpen el efecto reforzante de la administración de productos fisiológicos (alimento predigerido), nos inclinamos a pensar que podríamos estar actuando sobre un mecanismo general de refuerzo, en consonancia con las propuestas de una mayoría de autores, entre los que se encuentran los anteriormente citados (Di Chiara, 1998; Kreek & Koob, 1998; Robbins & Everitt, 1999; Berke & Hyman, 2000; Berridge & Robinson 1998; Robinson & Berridge, 2003; Hyman & Malenka, 2001; Koob & Le Moal, 2001; Kelley & Berridge, 2002; Fernández-Espejo, 2002).

Finalmente, la existencia en este experimento de un grupo de animales en el que no se manifiesta una clara preferencia o aversión por una determinada localización espacial, sugiere que la estimulación eléctrica es ineficaz, o mas probablemente, que pueda estar activando simultáneamente sistemas que codifican aspectos motivacionales positivos y negativos. Teóricamente, una modificación en los parámetros utilizados podría hacer que los animales se decantaran por uno u otro compartimento, algo similar a lo que se puede observar tras la utilización de diferentes dosis de una determinada droga, o también, al actuar sobre distintos tipos de receptores de una misma célula. Estas últimas posibilidades, de todos modos, no han sido examinadas por el momento.

Una cuestión relevante y que merece ser tratada en esta discusión, es la relacionada con la demora entre la Estimulación Eléctrica (EI) y los estímulos asociados (EC). En experimentos previos se ha puesto de manifiesto que este núcleo cerebral (NPBle) es importante solo si la tarea de aprendizaje requiere de una detección rápida de los estímulos (Mediavilla et al., 2000; Cap. III de esta Tesis). Es importante resaltar en este contexto, que en el experimento presentado, la asociación entre la estimulación eléctrica y las claves ambientales se realiza en contigüidad, esto es, cuando el animal cambia de localización y se traslada a otro compartimento deja inmediatamente de recibir la estimulación, lo cual está en consonancia con los resultados mencionados mas arriba.

Mas aún, estos datos concuerdan con los resultados presentados por Arnould y Agmo (1999) en los que animales no privados de alimento, manifestaron preferencia, en un paradigma de condicionamiento espacial, por el compartimento asociado con la disponibilidad de una bureta conteniendo sacarosa o bien con su infusión intragástrica, siempre que este producto fuese administrado inmediatamente antes de trasladar al animal al laberinto donde se realizó el condicionamiento. Sin embargo, el efecto desapareció al introducir una demora de 15 minutos entre la administración de la sustancia y la colocación del animal en uno de los dos compartimentos del laberinto, en paralelo al resultado obtenido por nosotros en el capítulo III de esta Tesis, utilizando claves gustativas y la administración intragástrica de nutrientes. Conviene destacar, por tanto, que teniendo en cuenta las restricciones temporales de este aprendizaje, la estimulación eléctrica del NPBle imitaría el efecto de los reforzadores naturales, en contraposición a los datos obtenidos en cuanto a condicionamiento de preferencias/aversiones espaciales

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

inducido por morfina, los cuales admiten demoras, y su efecto persiste durante días (Nader et al., 1997; Stinus et al., 2000; Parker et al., 2002).

Estos mismos autores también observaron preferencia por el compartimento asociado, en contigüidad temporal, con la infusión intragástrica de ‘*agua a 35°C*’ y este efecto se vio facilitado por la administración de ‘*devazepida*’ (un antagonista de los receptores CCK_A, que bloquea el efecto inductor de saciedad/aversivo de la colecistoquinina), con lo cual descartan que el efecto sea debido al sabor o bien a las consecuencias post-absortivas de la sacarosa. Lo atribuyen, concretamente a que la distensión gástrica posiblemente pueda activar dos sistemas oponentes, uno promotor del refuerzo (predominante al inicio de la conducta ingestiva) y otro aversivo (más activo al final de la ingesta), que en este caso es bloqueado por el antagonista CCK (Arnould & Agmo, 1999). Dado que el NPLe es un importante núcleo de relevo de la información visceral, como ya se ha mencionado en esta Tesis, otra hipótesis sobre la que se puede especular en nuestro experimento, hace referencia a la posibilidad de que la estimulación eléctrica de esta zona haya podido reproducir la actividad de los dos sistemas oponentes hipotetizados en estas investigaciones, aunque se necesitan nuevos estudios a desarrollar en el futuro para confirmar o rechazar dicha hipótesis.

En resumen, según los datos obtenidos en este experimento, podemos proponer que la Estimulación Eléctrica del Núcleo Parabraquial Lateral externo genera tanto preferencias como aversiones por los estímulos asociados, independientemente de la modalidad estimular utilizada. Este efecto está en concordancia con los datos de otros investigadores que señalan al NPLe como estructura implicada en el procesamiento de las consecuencias aversivas de algunas drogas opiáceas y, como mínimo, en los aspectos discriminativos -de incentivo- del efecto provocado por estas (Bechara et al., 1993; Moufid-Bellancourt & Velley, 1994; Moufid-Bellancourt et al., 1996; Jaegger & Van der Kooy, 1993; 1996; Nader et al., 1997; Sakai & Yamamoto, 1997; Yamamoto & Sawa, 2000a).

Si tenemos en cuenta las condiciones temporales en las que se desarrollan éste y los experimentos previos de esta tesis, nuestros datos concuerdan con los obtenidos por autores con paradigmas similares, pero utilizando reforzadores naturales (Arnould & Agmo, 1999). Esto nos permite pensar que la estimulación eléctrica del NPLe puede haber reproducido artificialmente un efecto visceral. Tal explicación resulta compatible con propuestas teóricas según las cuales, drogas y

reforzadores naturales, podrían utilizar los mismos sistemas neuroanatómicos (Kelley & Berridge, 2002).

Finalmente, no puede descartarse que la estimulación eléctrica del NPBe active células gustativas (Yamamoto et al., 1994), y que sean las consecuencias motivacionales de estas, las que quedan asociadas a claves ambientales. Sin embargo, no parece ser ésta la explicación mas parsimoniosa, teniendo en consideración los datos anteriores.

CAPÍTULO V

EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DE LOS NÚCLEOS PARABRAQUIAL LATERAL EXTERNO E HIPOTÁLAMO LATERAL EN TAREAS DE APRENDIZAJE ESPACIAL Y CONDICIONAMIENTO OPERANTE

INTRODUCCIÓN

Una de las principales conclusiones que se pueden extraer a partir de los capítulos previos de esta Tesis hace referencia a la participación del NPBe en procesos motivacionales de carácter reforzante/positivo independientemente de la modalidad sensorial de los estímulos con los que es asociada la actividad de esta zona. En este sentido, nuestros datos señalan que los animales muestran preferencia por estímulos gustativos (experimentos 1 y 2) e índices espaciales (experimento 5) asociados con estimulación eléctrica del NPBe, mientras que las lesiones de esta zona bloquean la preferencia por el sabor asociado a la infusión intragástrica de alimento predigerido (experimento 3), un estímulo viscerosensorial cuyo valor reforzante ha sido puesto de manifiesto en diferentes investigaciones llevadas a cabo por nuestro Grupo de Investigación (Puerto et al., 1976a; 1976b; Zafra, 2000).

En el capítulo anterior revisábamos la bibliografía existente con respecto a la utilidad del Paradigma de Condicionamiento Espacial en la investigación de los mecanismos cerebrales del refuerzo inducido por drogas de abuso, nutrientes, soluciones gustativas apetitosas, interacción social o sexual, etc. (Tzschentke, 1998; Schechter & Calcagnetti, 1998; Shippenberg & Elmer, 1998), un tipo de condicionamiento clásico en el que las consecuencias motivacionales de las drogas u otros reforzadores son asociadas con claves ambientales. Demostrábamos, además, la participación del NPBe en la inducción de preferencia por los índices ambientales asociados con la activación, mediante estimulación eléctrica, de esta región troncoencefálica (experimento 5).

La línea de investigación clásica acerca de los mecanismos cerebrales del refuerzo, se inició a partir del descubrimiento por parte de James Olds y Peter Milner, del fenómeno de la Autoestimulación Intracraneal (AEIC), según el cual los animales eran capaces de aprender una conducta instrumental con objeto de autoadministrarse pulsos de corriente en determinadas regiones cerebrales (Olds & Milner, 1954; Milner, 1989).

Mediante este método se han podido identificar algunas de las regiones relacionadas con el sistema de recompensa cerebral, localizadas principal, pero no exclusivamente, a lo largo del haz prosencefálico medial, un conjunto de fibras orientadas en dirección rostro-caudal que se extienden desde el prosencéfalo basal al mesencéfalo, donde los umbrales de AEIC son especialmente bajos y las tasas de

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

respuesta mas altas (Wise & Rompré, 1989; Gallistel et al., 1996; Kandel et al., 2000). Inicialmente, mediante técnicas de Histología Fluorescente se observó la existencia de cierto grado de solapamiento entre la distribución anatómica de las principales vías catecolaminérgicas y las localizaciones cerebrales donde se había observado conducta de AEIC (Wise & Rompré, 1989; Bauco & Wise, 1994; Wise, 1994; Weiner & Molinoff, 1994). Sin embargo, los estudios realizados con técnicas lesivas del sistema dopaminérgico, por ejemplo, mediante neurotoxinas (Wise & Rompré, 1989; Yeomans, 1990), así como otros mas recientes realizados con técnicas de inmunohistoquímica, han constatado un escaso solapamiento entre las células activadas por AEIC (marcadas con inmunorreactividad C-fos), y las que contienen dopamina (que reaccionaron a anticuerpos dirigidos contra la Tirosina Hidroxilasa, enzima clave en la síntesis de Catecolaminas) (Hunt & McGregor, 1998).

En cualquier caso, la delimitación anatómica de los circuitos claves para la conducta de AEIC ha sido posible mediante la combinación de distintos procedimientos y técnicas, que han permitido localizar otras zonas consistentemente asociadas con esta conducta: En posiciones anteriores se incluye la Corteza Prefrontal, Bulbo Olfatorio, Amígdala, Hipocampo, y una región comprendida entre el Globo Pálido y el N. Accumbens. En localizaciones posteriores del Mesencéfalo y Tronco, se ha reproducido este fenómeno conductual en una zona comprendida entre el Acueducto Cerebral y el N. Interpeduncular, Sustancia Gris Central, Área Tegmental Ventral y Sustancia Negra. También se ha descrito conducta de AEIC en la parte ventral del Rafe Dorsal –cerca del Locus Coeruleus-, N. Tegmental Pedunculopontino y parte medial del N. Parabraquial, lo que ha sido corroborado mediante métodos inmunohistoquímicos (Routtenberg, 1976; Olds & Fobes, 1981; Wise & Rompré, 1989; Milner, 1989; Yeomans, 1990; Gallistel et al., 1996; Arvanitogiannis et al., 1997; 2000; Flores et al., 1997; Panagis et al., 1997; Konkle et al., 1999; Nakahara et al., 2001; Kandel et al., 2000). Por último, se han identificado regiones troncoencefálicas como el NTS, Médula Dorsolateral, N. Motor del Trigémino y N. Cerebelosos profundos capaces de sustentar también esta conducta de AEIC (Routtenberg et al., 1976; Wise & Rompré, 1989; Kandel et al., 2000).

Conviene resaltar que en el N. Parabraquial, se ha podido desencadenar este efecto de AEIC en una región localizada en el tercio medio del subnúcleo medial, en posición ventral al Pedúnculo Cerebeloso superior, y por tanto lejos de la estructura objeto de estudio de esta Tesis, el NPble (Ferssiwi et al., 1987; Arvanitogiannis et

al., 1997). Por otro lado, las lesiones electrolíticas extensas del complejo Parabraquial no alteran sustancialmente la efectividad de la conducta de AEIC del Haz Prosencefálico Medial (Waraczynski & Shizgal, 1995).

Estas investigaciones mencionadas han sido complementadas con otros estudios neurofarmacológicos y conductuales en los que se ha observado que determinadas manipulaciones, como la administración de determinados fármacos o la privación de alimento pueden alterar la tasa de AEIC: Los neurolépticos producen un descenso en la eficacia del refuerzo, mientras que drogas de abuso como la cocaína, anfetaminas, opiáceos, nicotina, etc. lo aumentan (Gallistel & Karras, 1984; Miliaressis et al., 1986; Wise & Bozarth, 1987; Nakajima & Patterson, 1997; Bauco & Wise, 1994; 1997; Wise, 1996; Bernalov et al., 1999). Por otro lado, intervenciones tales como la restricción de alimento/saciación parecen modificar el umbral de refuerzo y provocar un desplazamiento de la curva que relaciona la tasa de respuesta con la frecuencia de la estimulación eléctrica, cuando el electrodo de AEIC se localiza en determinadas regiones cerebrales pero no en otras (Mora et al., 1979; Angyàn, 1984; Abrahamsen et al., 1995; Wise, 1996; Carr, 2002).

Ahora bien, aunque se trata de un modelo útil para el estudio del refuerzo, la cuestión acerca de la relación existente entre la AEIC y los efectos de los reforzadores naturales no ha quedado definitivamente resuelta. Como ya mencionamos en la introducción de esta Tesis, la Conducta de Autoestimulación posee unas características peculiares, como es la *'falta de saciación'*, en la medida en que los animales pueden responder durante horas para administrarse pulsos de estimulación eléctrica, hasta quedar exhaustos, ignorando la comida y otros reforzadores. Y, junto a esta característica, resulta sorprendente su extremada *'labilidad'*, que se manifiesta de varias formas: -la conducta decae rápidamente si el animal deja de recibir estimulación, -la ejecución es errática cuando la conducta es controlada por un programa de reforzamiento parcial, y -se observan decrementos en la ejecución cuando el intervalo entre pulsos de corriente es largo (Hoebel, 1976; Olds & Fobes, 1981; Wise & Rompré, 1989; White & Milner, 1992; Wise, 1996; Fouriezos & Randall, 1997). Sin embargo, otros autores destacan las similitudes entre la AEIC y los reforzadores naturales al señalar que si se somete a los animales a un paradigma de elección forzosa en el que pueden elegir entre refuerzo natural (por ej. sacarosa) y AEIC, éstos se decantan eligiendo el reforzador más fuerte, y si están privados prefieren la suma de los dos (sacarosa + AEIC) frente a uno solo, lo

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

que significa, probablemente, que ambos están siendo evaluados en la misma dimensión (Olds & Fobes, 1981; Shizgal, 1997).

Una de las teorías más influyentes que se han propuesto para explicar las diferencias entre reforzadores naturales y AEIC fue formulada por Deutsch y continuada por Gallistel. Estos autores proponen que la AEIC activa simultáneamente dos sistemas, un sistema motivacional o de 'drive', responsable de la iniciación del comportamiento, y un sistema de refuerzo, los cuales se diferencian en el periodo en que están activados, siendo el primero el que permanece activo durante un tiempo algo más breve (Olds & Fobes, 1981).

Para conocer si la Estimulación Eléctrica reforzante del NPBe se asemeja al efecto neural producido por un reforzador natural (por ej. comida), al fenómeno de estimulación directa del 'sistema de recompensa del cerebro', o a ambos fenómenos simultáneamente, según opinan algunos autores, se han realizado dos experimentos. En el primero someteremos a dos grupos de animales, uno con el electrodo monopolar situado en el NPBe y otro en el Hipotálamo Lateral, a un Paradigma de Condicionamiento Clásico, en el que el Estímulo reforzante utilizado es la Estimulación Eléctrica Intracerebral controlada por el experimentador. En el segundo experimento emplearemos un procedimiento de Condicionamiento Operante en el que el cada animal debe aprender a presionar una palanca para autoadministrarse trenes de pulsos de corriente eléctrica intracerebral.

EXPERIMENTO 6**Condicionamiento de Preferencias Espaciales inducido por Estimulación Eléctrica del Núcleo Parabraquial Lateral Externo e Hipotálamo Lateral**

La estimulación eléctrica del NPBLE, según se ha puesto de manifiesto en el capítulo IV de esta Tesis, genera preferencias/ aversiones por los estímulos ambientales con que es asociada.

Por otro lado, resultados obtenidos por otros investigadores han puesto de manifiesto que los animales que muestran conducta de AEIC en el Hipotálamo Lateral son capaces de establecer un condicionamiento de preferencia por el lugar asociado con la Estimulación Eléctrica –en este caso administrada por el experimentador- (Duvauchelle & Ettenberg, 1991 Tzschentke, 1998; Schechter & Calcacnetti, 1998).

Si la Estimulación Eléctrica de ambas localizaciones (NPBLE e Hipotálamo lateral) genera preferencias por las claves ambientales con las que es asociada, podemos suponer que en ambos casos podríamos estar activando algún mecanismo común de refuerzo, bien sea de manera directa o indirecta.

En este experimento evaluaremos previamente los efectos reforzantes de un electrodo monopolar implantado en el HTL mediante una función que relacione la intensidad de la estimulación con la tasa de respuesta del sujeto en un procedimiento habitual de condicionamiento operante en el que cada animal debe aprender a presionar una palanca para autoadministrarse pulsos de corriente eléctrica, según el procedimiento descrito por autores como Gallistel o Milliaressis (Milliaressis et al., 1986; Gallistel & Karras, 1984). A continuación, todos los animales serán sometidos a un Condicionamiento Espacial en el que uno de los compartimentos es asociado con Estimulación Eléctrica y otro con la ausencia de ésta.

METODO:**SUJETOS:**

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

Se utilizaron 35 ratas macho albinas, de la raza Wistar, suministradas por el Animalario de la Universidad de Granada, con pesos que oscilaron entre los 245 y 370 grs. al inicio del experimento, las cuales fueron distribuidas en jaulas con 4 animales y mantenidas con comida y agua 'ad libitum' durante una semana de habituación previa al comienzo de la cirugía. Las condiciones ambientales de luz y temperatura fueron mantenidas constantes, dentro de un rango similar al descrito en los experimentos previos y las manipulaciones fueron realizadas durante el período de luz.

PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO:

De estos 35 animales, 19 fueron sometidos a una intervención quirúrgica consistente en la colocación de un electrodo monopolar en el NPble (EE-PBle); a otros 10 se les implantó un electrodo monopolar en el Hipotálamo Lateral (EE-HTL), ambos según el procedimiento quirúrgico descrito en el Experimento 1 de esta Tesis. Y los restantes 6 animales fueron utilizados como Grupo Control Sin Estimulación (CON-NE), a los que se implantó solamente el electrodo de referencia, que quedó fijado al cráneo mediante tornillos de acero inoxidable y resina acrílica.

Las coordenadas estereotáxicas para el implante del electrodo en el Hipotálamo Lateral fueron tomadas del Atlas de DeGroot (1959): AP = +5,8 V = +2,8 y L = ±1,8, a partir de la referencia interaural, y con una elevación de los incisivos de +5,0. Las coordenadas para la localización del electrodo intracerebral del grupo experimental EE-PBle fueron idénticas a las utilizadas en los experimentos previos de esta tesis (AP = -0,16 V = 3,0 y L = ±2,5 según el atlas de Paxinos & Watson, 1996).

Concluida la intervención quirúrgica, todos los animales fueron instalados individualmente en jaulas con características similares a las descritas en los experimentos anteriores, donde permanecieron durante una semana de recuperación desde la finalización de la cirugía del último de los animales. Durante este período los animales dispusieron de comida y agua 'ad libitum' y se les aplicó diariamente una solución antiséptica sobre el implante (*Betadine*, Povidona Yodada. Asta Medica. Madrid) para prevenir infecciones y acelerar el proceso de recuperación.

PROCEDIMIENTO CONDUCTUAL:*Fase de Evaluación del Efecto Reforzante de la Estimulación:*

Inicialmente se examinó la intensidad de corriente apropiada para los animales experimentales (grupo EE-PBle y grupo EE-HTL); esa intensidad óptima sería la empleada en cada rata durante la fase de Condicionamiento al Lugar. Para ello, tres días antes del inicio del procedimiento conductual, se sometió a cada animal a estimulación eléctrica del NPBle o del HTL (administrada por el experimentador) en una caja de Skinner. Se utilizó corriente directa pulsante y de voltaje creciente, comenzando desde 0,2 voltios y aumentando de 0,2 en 0,2 voltios hasta llegar al máximo capaz de soportar cada sujeto, intentado evitar a la par conductas de escape, saltos o vocalizaciones. El criterio fue similar al del experimento 5 y consistía en la aplicación de ‘una corriente conductualmente noticable, pero siempre por debajo del umbral de dolor’. Entre cada ensayo de estimulación de aproximadamente 3 minutos, se introdujo un periodo de descanso de 2 minutos para evitar dañar esta zona. Finalmente, y una vez conocido el valor máximo de voltaje que habíamos liberado en cada animal, se procedió a calcular la intensidad de corriente que recibió cada animal. Los valores del grupo EE-PBle oscilaron entre 54 y 86 microamperios, con una media de 77,53 μA y los valores del grupo EE-HTL oscilaron entre 80 y 90 microamperios, con una media de 83,87 μA (Ver Tabla 8 del Anexo II).

Moldeamiento y Prueba de Autoestimulación Intracerebral:

Para determinar el efecto reforzante de la estimulación en los animales del grupo EE-HTL, se inició un proceso de moldeamiento de la conducta de autoestimulación en una caja de Skinner, con paredes de Plexiglás transparente, de 50x50x50cm., y una palanca metálica en la base de la pared posterior, conectada a un generador de corriente eléctrica, Letica, LI12100 (Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain). A este generador de corriente iba conectado también el electrodo activo de cada sujeto, mediante un cable flexible que permitía el libre movimiento del animal dentro de esta jaula de autoestimulación.

Se comenzó con una fase exploratoria en la que la estimulación intracerebral era suministrada los investigadores, en forma de trenes de pulsos de 0,25 segundos de duración. Se administraba corriente cada vez que el animal presentaba conductas de aproximación a la palanca, colocación sobre ella, movimiento de la pata, etc.,

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

hasta que lograba presionar la palanca por sí mismo, consiguiendo así el moldeamiento de la conducta.

A continuación se obtuvo una curva de AEIC para cada sujeto experimental siguiendo un procedimiento estándar (Miliaressis et al., 1986). Para ello, se comenzó por fijar los parámetros de la corriente que se iba a suministrar, en un valor medio elegido en función de la bibliografía existente con respecto a esta conducta de AEIC en el HTL (corriente: 3,7V - 3,9 V; frecuencia: 66,6 c.p.s.; duración de cada tren de pulsos: 0,25 segundos; duración de cada pulso individual: 0,1 ms.), permitiendo el tiempo necesario para que el animal consiguiera una tasa de autoestimulación relativamente estable (Figura 6.1).

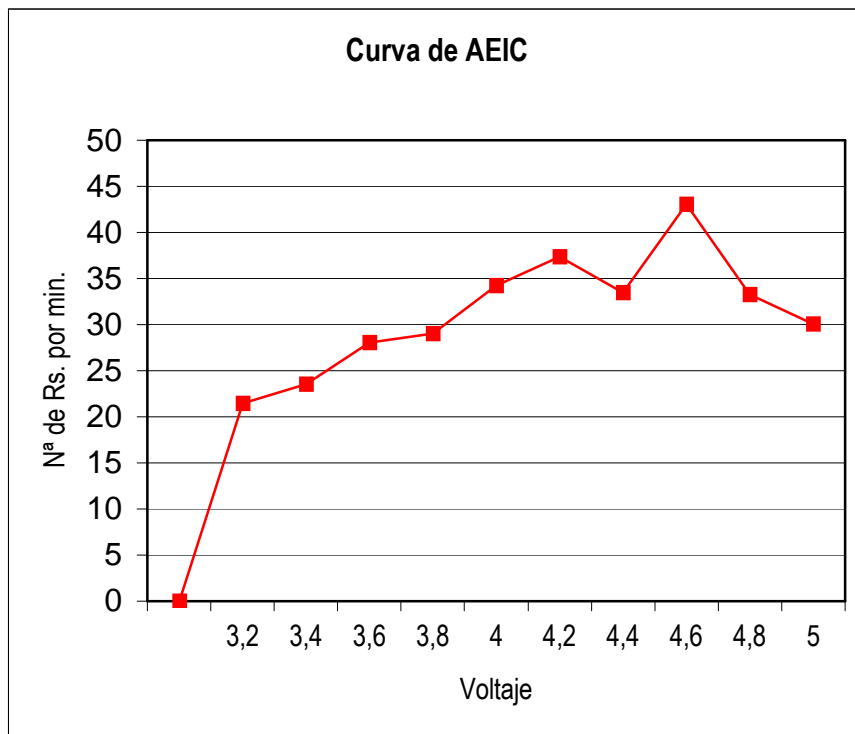


Figura 6.1: Función que relaciona Tasa-Intensidad de Corriente eléctrica en conducta de AEIC, promediada para los 9 animales del grupo EE-HTL.

Fase de Condicionamiento al Lugar:

Después de un día de descanso tras la fase anterior, en el que los animales dispusieron de comida y agua ‘ad libitum’, todos ellos (grupos EE-PBle, EE-HTL y CON-NE) fueron examinados en el ‘Laberinto en Corredor’, donde eran sometidos a un Paradigma de Aprendizaje Espacial en dos sesiones, según el procedimiento descrito en el experimento 5 de esta Tesis. La mitad de los animales recibieron estimulación en un lado del corredor y el 50% restante en el otro lado. El grupo ‘Control Sin Estimulación’ no recibió estimulación en ninguno de los dos compartimentos. Finalizados los ensayos individuales, cada animal era devuelto a su jaula, donde disponía de comida y agua ‘ad libitum’. Como en el experimento 5, cada grupo fue sometido a dos pruebas repetidas en un Laberinto, a fin de examinar la consistencia de la conducta de los sujetos entre los ensayos.

RESULTADOS:

De los 19 animales del Grupo de EE-PBle, 2 tuvieron que ser eliminados por daño en el conducto auditivo y conducta de giro, y otro por desprendimiento del electrodo, por lo que la fase de Condicionamiento Espacial se llevó a cabo con 16 animales. Del grupo de EE-HTL hubo que eliminar un animal al desprendérsele el implante, por lo que quedaron 9 sujetos experimentales en este grupo. Y finalmente, del grupo CON-NE hubo que eliminar otro animal por idénticas razones, con lo que este grupo quedó constituido finalmente por 5 animales.

Si evaluamos a los animales de cada uno de los grupos siguiendo un criterio conductual similar al utilizado en el experimento 5 (Grupo positivo: animales que pasan más del 60% del promedio de tiempo total en el lugar asociado a la estimulación; Grupo Negativo, pasan menos del 30% en este compartimento; y Grupo indiferente, permanecen entre el 30%-60% del tiempo en esta localización), nos encontramos con que en el grupo que recibe estimulación eléctrica en el NPBle (EE-PBle) hay animales que prefieren el lugar de la estimulación, animales que prefieren el lugar no asociado a estimulación y animales que alternan entre los dos compartimentos. Todos los animales hipotalámicos (EE-HTL), en cambio, muestran preferencia por el Lugar asociado a la estimulación, mientras que los animales del grupo control (CON-NE) no manifiestan una preferencia clara por uno u otro compartimento, salvo el animal nº 5, lo que podría ser un sesgo introducido por azar. Posteriormente realizamos un Análisis de Cluster, que viene a confirmar estos resultados, como se muestra en la Figura 6.1.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

CRITERIO CONDUCTUAL		ANÁLISIS DE CLUSTERS		
Nº DE CASO	GRUPO	Nº DE CASO	CONGLOMERADO	DISTANCIA
PB1	2	PB1	2	0,1359
PB2	1	PB2	1	0,1647
PB3	2	PB3	2	0,1420
PB4	2	PB4	2	0,1280
PB5	2	PB5	2	0,1669
PB6	1	PB6	1	0,0515
PB7	1	PB7	1	0,1072
PB8	3	PB8	3	0,0366
PB12	3	PB12	3	0,0716
PB13	1	PB13	1	0,1536
PB14	3	PB14	3	0,0278
PB15	2	PB15	2	0,2390
PB16	2	PB16	2	0,1669
PB17	1	PB17	1	0,0389
PB18	1	PB18	1	0,0091
PB19	1	PB19	1	0,0628
HT1	1	HT1	1	0,0747
HT3	1	HT3	1	0,0774
HT4	1	HT4	1	0,1268
HT5	1	HT5	1	0,1267
HT6	1	HT6	1	0,0882
HT7	1	HT7	1	0,0889
HT8	1	HT8	1	0,1162
HT9	1	HT9	1	0,0762
HT10	1	HT10	1	0,0586
CO1	2	CO1	2	0,0177
CO2	2	CO2	2	0,0835
CO4	2	CO4	2	0,0658
CO5	3	CO5	3	0,1323
CO6	2	CO6	2	0,2265

Figura 6.1: Agrupamiento de los sujetos en conglomerados. Tabla izquierda, según el criterio conductual definido previamente. Tabla derecha: teniendo en cuenta los resultados estadísticos del 'Análisis de Clusters'; aquí se incluye además, la distancia de cada individuo a la media de su conglomerado. (Conglomerado 1: animales positivos; conglomerado 2: animales indiferentes; conglomerado 3: animales negativos; PB: grupo de animales sometidos a estimulación eléctrica del NPBe; HT: grupo de animales a los que se administró estimulación eléctrica en el Hipotálamo Lateral; CO: grupo control, que no recibió estimulación.

En la siguiente tabla (Tabla 6.1) recogemos la media y desviación típica de cada agrupamiento en cada una de las sesiones de condicionamiento.

	CONGLOMERADO 1		CONGLOMERADO 2		CONGLOMERADO 3	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
Media	0,7148	0,7760	0,4442	0,5071	0,1030	0,0495
DT	0,0886	0,1117	0,1060	0,2001	0,1267	0,0214

Tabla 6.1: Estadística descriptiva de cada uno de los ‘conglomerados’ resultantes del Análisis de Clusters.

En relación con la consistencia de la conducta de los animales en los dos ensayos de aprendizaje espacial, podemos observar en el siguiente diagrama de dispersión, como los animales del grupo EE-PBle se sitúan a lo largo de la recta de regresión (lo cual significa que hay animales positivos, indiferentes y negativos) pero los datos se ajustan bastante bien a esta recta. Los animales del grupo EE-HTL, se sitúan en el cuadrante superior derecho de la ‘nube de puntos’ porque muestran clara preferencia por el lugar asociado a la estimulación. Finalmente, los datos del grupo Control (CON-NE) no muestran prácticamente ningún ajuste a dicha recta (Figura 6.2).

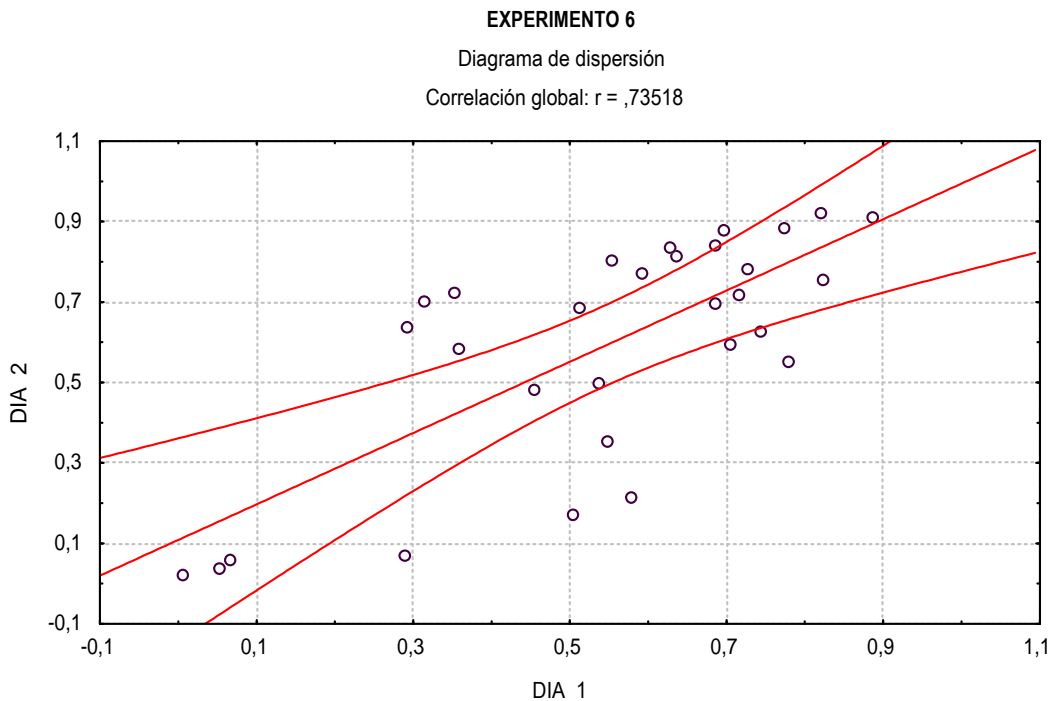


Figura 6.2: Diagrama de dispersión para las puntuaciones de los sujetos pertenecientes a los grupos EE-PBle (círculos abiertos), EE-HTL (círculos negros) y CON-NE (círculos rojos). Ajuste a una Recta de Regresión . (El valor de la correlación global es de $r = 0,7352$, $p < 0,001^{**}$).

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

El valor de la Correlación Lineal de Pearson para cada uno de los grupos es de:

EE-PBle: $r = 0,7450$ $p < 0,001^{**}$
EE-HTL: $r = 0,1933$ $p < 0,618$
CON-NE: $r = 0,1944$ $p < 0,754$

La ejecución de los animales del grupo EE-PBle es consistente entre ensayos, como se puede apreciar en el valor de la correlación ($r = 0,7450$), mientras que resulta aleatoria en el grupo Control ($r = 0,1944$). En el caso del grupo de animales experimentales con electrodo implantado en el HTL, se da el hecho paradójico de que al tratarse de un grupo de datos muy homogéneo, el cálculo del Coeficiente de Correlación de Pearson magnifica las pequeñas diferencias existentes entre estas puntuaciones y hace que el efecto se pierda ($r = 0,1933$), lo cual resulta ser un artefacto estadístico.

También se realizó un Análisis de Varianza Bifactorial Mixto, con dos factores (GrupoxDia), uno de los cuales había sido manipulado intra-sujetos (día). Los resultados muestran que es significativo el efecto de Grupo [$F(2, 27) = 5,0141$ $p < 0,014^*$], pero no el efecto Día [$F(1,27) = 0,4810$ $p < 0,4938$] ni la Interacción [$F(2,27) = 1,2832$ $p < 0,2934$].

Asimismo, se encuentran diferencias entre los grupos EE-PBle y EE-HTL [$F(1,27) = 6,7270$ $p < 0,015^*$], así como en el grupo EE-HTL frente a CON-NE [$F(1,27) = 8,0436$ $p < 0,008^{**}$], pero no entre EE-PBle y CON-NE [$F(1,27) = 0,9576$ $p < 0,3364$]. Esto significa que los grupos EE-PBle y EE-HTL son diferentes en cuanto a preferencias, pero al haber animales positivos, negativos e indiferentes en el primer grupo (EE-PBle), la media de todos ellos hace que muestre similitud con respecto al grupo Control, cuya conducta es completamente aleatoria.

Estos resultados se vuelven a repetir si comparamos todos los grupos en cada uno de los dos días de ensayo por separado:

- Día 1: EE-PBle / EE-HTL $F(1,27) = 5,2111$ $p < 0,030^*$;
EE-HTL / CON-NE $F(1,27) = 4,3017$ $p < 0,047^*$
- Día 2: EE-PBle / EE-HTL $F(1,27) = 5,9910$ $p < 0,0211^*$;
EE-HTL / CON-NE $F(1,27) = 9,2923$ $p < 0,0051^{**}$.

DISCUSIÓN:

El análisis de los resultados obtenidos en este experimento viene a confirmar y reforzar varias hipótesis anteriormente planteadas. En primer lugar, que el comportamiento de los animales sometidos a Estimulación Eléctrica (EE-HTL y EE-PBle) es consistente entre sesiones, tanto en el establecimiento de preferencias como de aversiones e incluso de indiferencia, frente a la conducta errática de los animales no sometidos a estimulación (CON-NE) que alternan entre los dos compartimentos en este paradigma de condicionamiento espacial ‘insesgado’.

En segundo lugar, se vuelve a comprobar que la estimulación eléctrica del NPble genera tanto preferencias como aversiones por los índices ambientales con que es asociada, lo cual pone de manifiesto que las vías que procesan información motivacional relevante para la conducta -reforzante y aversiva-, podrían estar entremezcladas anatómicamente, como han mostrado diferentes autores en el caso de utilizar estimulación gustativa (Yamamoto et al, 1994), índices gustativos que además producen beneficios metabólicos (Calingasan & Ritter, 1993; Yamamoto & Sawa, 2000 a; 2000b; Reilly & Trifunovic, 2000a), sustancias de abuso (Carr et al., 1991; Jaeger & Van der Kooy, 1993; 1996; Wolinsky et al., 1996; Sakai & Yamamoto, 1997), y estimulación visceral aversiva (Yamamoto et al., 1992; Mediavilla et al., 2000; Sakai & Yamamoto, 1997; Reilly & Trifunovic, 2000a; 2000b). Mas aún, el NPble es un núcleo de relevo de la vía Espino-(Trigémico)-Pontoamigdaloide, que procesa y transmite información nociceptiva periférica hacia centros autonómicos y superiores, donde tiene lugar el procesamiento afectivo-emocional, autonómico y visceral de eventos dolorosos (Bernard et al., 1991; 1994; 1995; Bester et al., 1995; 1997; Light et al., 1993; Saper, 1995a; Jasmin et al., 1997; Craig & Dostrovsky, 1999). Puede darse la probabilidad, también, de que la Estimulación Eléctrica active simultáneamente fibras reforzantes y aversivas, de ahí la existencia de animales cuya conducta no muestra una clara tendencia hacia la preferencia o el rechazo por los estímulos asociados, en consonancia con estudios realizados por otros autores, en donde la estimulación eléctrica provoca efectos marcadamente ambivalentes (Diotte et al., 2000; 2001; Anderson et al., 1995).

En el caso de los animales del grupo EE-HTL, la estimulación eléctrica de esta zona, cuando es administrada y controlada por el experimentador, generó preferencia por los índices ambientales asociados, lo cual viene a reproducir los resultados obtenidos por otros investigadores (Duvauchelle & Ettenberg, 1991

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

Tzschentke, 1998; Schechter & Calcacnetti, 1998). Este hecho viene a apoyar la idea de que el electrodo está activando un 'Sistema general de refuerzo', aunque no se puede determinar si de una manera directa o indirecta como proponían los estudios sobre estimación de periodos refractarios en animales que se autoestimulaban, realizados por Gallistel y citados en la Introducción de esta Tesis (Gallistel, 1976; Yeomans, 1982; Wise & Rompré, 1989; Wise, 1996; 1998; 2000; Yeomans et al., 1993; Gallistel et al., 1996).

Estos resultados, por último, no serían incompatibles con la Teoría de Deutsch, descrita en la introducción de este capítulo y recogida en varias revisiones sobre el 'Sistema de Recompensa del Cerebro' (Olds & Fobes, 1981; Geen et al., 1984; Wise & Rompré, 1989; White & Milner, 1992; Wise, 1996), según la cual la conducta autoestimuladora de los animales con electrodos situados en el Hipotálamo Lateral provocaría la activación simultánea de dos sistemas, uno procesador de señales de 'drive' y otro de 'refuerzo'. En nuestro caso actual, la estimulación eléctrica continua del HTL administrada por el experimentador concurrentemente a una determinada localización espacial del animal, con unos parámetros de corriente mas bajos que los usados durante el Condicionamiento Operante, podría haber actuado activando exclusivamente el S. Refuerzo.

EXPERIMENTO 7**Hipotálamo Lateral y Núcleo Parabraquial Lateral Externo en relación con el fenómeno de la Autoestimulación Intracerebral**

Entre los reforzadores mas potentes que se conocen, deben mencionarse las drogas de abuso y la estimulación eléctrica intracerebral: Las primeras constituyen una técnica neuroquímicamente selectiva para estudiar los Mecanismos Centrales del Refuerzo en tanto que su acción se restringe a determinado tipo de receptores, y a determinadas clases de neuronas. La Estimulación Eléctrica Intracerebral en cambio, es una técnica anatómicamente selectiva, en el sentido de que produce activación celular en un radio delimitado por el extremo del electrodo monopolar, en función de la intensidad de corriente que se esté utilizando. Por tanto, su potencia desciende con el cuadrado de la distancia desde la punta del electrodo, y decae hasta niveles inapreciables en fracciones de milímetro (Wise & Rompré, 1989; Yeomans, 1990).

En los primeros estudios de AEIC se utilizaron pulsos de corriente sinusoidal con una frecuencia de 60 Hz. En estos casos, la magnitud del refuerzo estaba en función de la intensidad de la estimulación, observándose elevadas tasas de respuesta con altas intensidades de corriente, lo cual significa que en algunas localizaciones cerebrales, el sistema de refuerzo está organizado de forma difusa, necesitando que la estimulación abarque un campo amplio de actuación para mostrar el efecto (Wise, 1996).

En el NPBl, junto a la existencia de células implicadas en el procesamiento de información relevante para el refuerzo (Yamamoto et al., 1994; Sakai & Yamamoto, 1997; Yamamoto & Sawa, 2000 a; 2000b; Carr et al., 1991; Jaeger & Van der Kooy, 1993; 1996; Wolinsky et al., 1996; Calingasan & Ritter, 1993; Reilly & Trifunovic, 2000a), está ampliamente demostrada la presencia de una vía colateral nociva, pues en esta zona se ha localizado un importante relevo de fibras del Haz Espino-(Trigémico)-Pontoamigdalóide, que procesa y transmite información nociceptiva periférica hacia centros autonómicos y anteriores, donde tiene lugar el procesamiento afectivo-emocional, autonómico y visceral de eventos dolorosos (Bernard et al., 1991; 1994; 1995; Bester et al., 1995; 1997; Light et al., 1993; Saper, 1995a; Jasmin et al., 1997; Craig & Dostrovsky, 1999). Esta proximidad anatómica de dos sistemas conductualmente contrapuestos podría impedir que el animal

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

aprenda una conducta operante de autoadministración de corriente eléctrica reforzante, ya que simultáneamente podríamos estar activando neuronas no solo reforzantes sino también nocivas.

Algunos estudios han puesto de manifiesto que la manipulación experimental de la frecuencia es preferible cuando la intensidad de la estimulación y, por consiguiente, el área estimulada, deben mantenerse constantes (Wise, 1996). En este sentido, la frecuencia mínima de estimulación para obtener efectos reforzantes tiende a ser del orden de 20 Hz, aunque se puede incrementar hasta 200 Hz o incluso 400 Hz (Yeomans, 1990; Wise, 1996). Por lo tanto, una manera de aumentar la eficacia de la estimulación para obtener esta conducta en el NPble, sin necesidad de aumentar el radio de acción de la corriente liberada en el extremo del electrodo, y evitando, por tanto, entrar en una zona nociceptiva, y por tanto, aversiva, sería manipulando la frecuencia de los pulsos eléctricos.

El objetivo de este experimento es lograr que los animales del subgrupo positivo de estimulación eléctrica en el NPble (EE-Pble), obtenido en el experimento anterior, adquieran una respuesta operante de AEIC, sin modificar para ello el tamaño del campo cerebral estimulado en el paradigma de Condicionamiento Espacial, manipulando exclusivamente la frecuencia de liberación de los pulsos eléctricos, y comparar su ejecución con la de los animales del grupo EE-HTL. Esta conducta sería comparada con la eficacia que se observa en los animales que muestran AEIC en el hipotálamo lateral.

MÉTODO:

SUJETOS Y PROCEDIMIENTO:

Se utilizaron los mismos animales experimentales del estudio anterior (16 del grupo EE-Pble y 9 del grupo EE-HTL).

En el caso de los animales del grupo EE-Pble, éstos fueron sometidos individualmente a un procedimiento de moldeamiento de la conducta de Autoestimulación en la caja de Skinner -cuyas características fueron descritas anteriormente-. Se partió de una fase exploratoria de 30 minutos de duración en la que se utilizaron los mismos valores de intensidad de corriente que se habían fijado

en el experimento anterior, y así evitar que se pudiesen alcanzar umbrales de dolor. Se programó inicialmente una frecuencia media de 66,6 Hz para los trenes de pulsos rectangulares de corriente anodal de 0,1 milisegundo y 0,25 segundos de duración de cada tren, que iban a ser administrados, primero por nosotros mismos en función de la conducta de aproximación de la rata a la palanca y, en su caso, por el propio animal. A continuación se inició una serie de cinco ensayos en que se fue modificando la frecuencia, alternando entre frecuencias altas (hasta 100 Hz) y bajas (hasta 16,66 Hz), de manera similar al procedimiento utilizado por Bauco & Wise (1994). Cada ensayo tenía una duración de 10 minutos, finalizado el cual, se acortaba o alargaba el periodo entre pulsos a intervalos regulares para modificar la frecuencia y empezar con el siguiente ensayo (Ver figura 7.1).

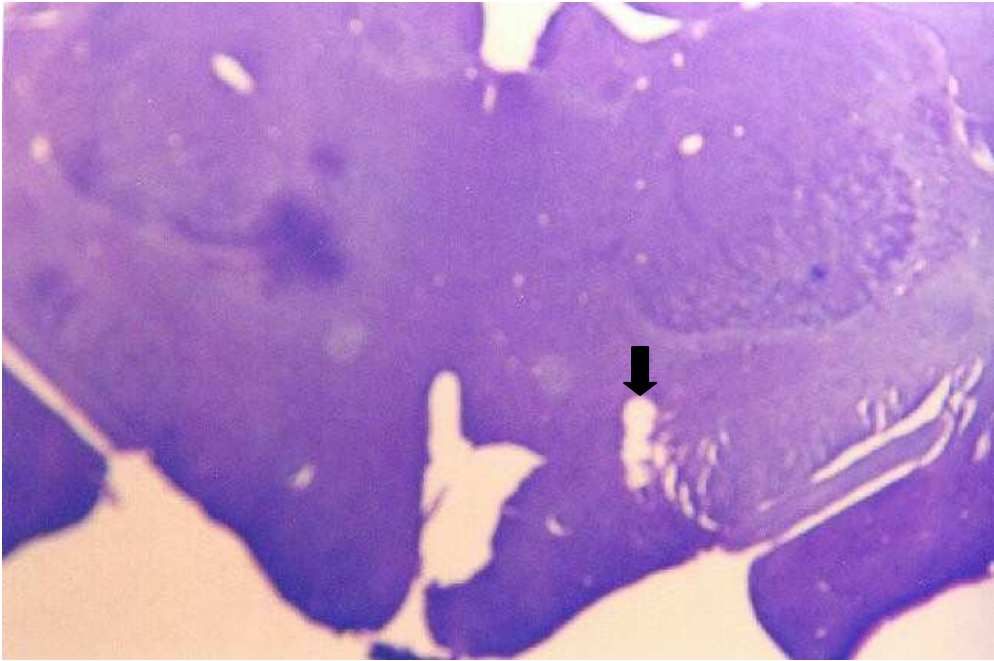
Para los animales del grupo EE-HTL, el período de moldeamiento fue solo de 10 minutos para cada animal, puesto que ya habían adquirido la conducta en la fase anterior y solo necesitaban unos ensayos de facilitación. A continuación también se procedió a fijar la intensidad de corriente óptima para cada animal de acuerdo con la fase de moldeamiento realizada en el experimento anterior, y evitando alcanzar umbrales de dolor, y se inició una serie de 5 ensayos de 10 minutos de duración cada uno, en los que se comenzaba por una frecuencia intermedia y se iban alternado ensayos de frecuencias altas (hasta 100 Hz) y bajas (hasta 16,66 Hz). En cada ensayo se dejaba a los animales presionar libremente la palanca de AEIC durante 7 minutos, aunque no se contabilizaba la tasa de respuesta en los 2 primeros minutos sino solo en los 5 últimos, para finalizar con 3 minutos de descanso, aproximadamente, antes de empezar el siguiente ensayo en el que se cambiaba la frecuencia.

HISTOLOGÍA:

Finalizado el experimento, todos los animales del grupo EE-HTL y del grupo EE-HTL fueron anestesiados profundamente. Tras marcar la zona de la estimulación mediante una pequeña lesión electrolítica, fueron profundidos con sendas soluciones de suero fisiológico isotónico y formaldehído al 4% según el procedimiento estándar descrito en el capítulo 1 de esta Tesis. Los cerebros fueron extraídos del cráneo, conservados en formaldehído al 4% y finalmente laminados, teñidos con violeta de Cresilo y fotografiados.

Imágenes representativas de la localización del electrodo en los grupos de EE-HTL y EE-PBle son incluidas en las microfotografías 7.1 y 7.2 correspondientes a este experimento.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES



Microfotografía 7.1: Imagen representativa de la localización del electrodo en los animales del grupo EE-HTL.



Microfotografía 7.2: Imagen representativa de la localización del electrodo en los animales del grupo EE-PBle.

RESULTADOS:

Ninguno de los animales experimentales con electrodo monopolar en el NPBe consiguió aprender la respuesta operante de presionar la palanca para autoadministrarse pulsos de corriente eléctrica en esta localización cerebral, a pesar del largo proceso de moldeamiento empleado en cada sujeto y de la modificación de los parámetros de la corriente para facilitar la eficacia de la estimulación.

En cambio, todos los animales experimentales con un electrodo monopolar en el HTL aprendieron la conducta, aunque había una gran variabilidad respecto a la intensidad óptima de corriente necesaria para elicitación de la conducta. Las variaciones en el intervalo entre pulsos (frecuencia), pusieron de manifiesto que la eficacia de la estimulación para elicitación de la respuesta aumenta de manera asintótica conforme se acorta el período entre pulsos. La figura 7.1 muestra una curva promedio de Tasa-Frecuencia para los animales del grupo experimental EE-HTL.

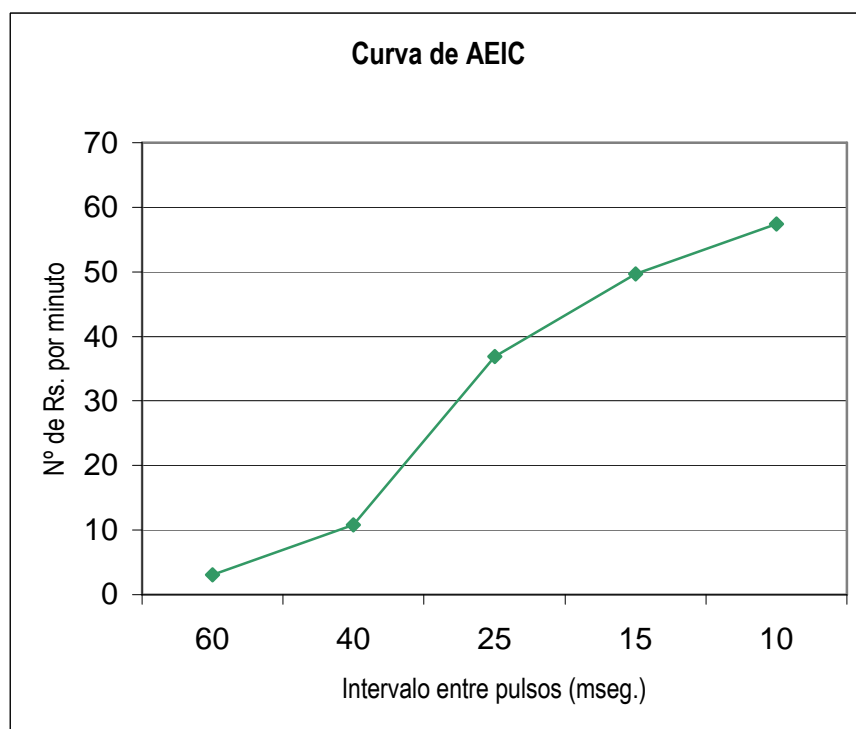


Figura 7.1: Función que relaciona Tasa-Frecuencia de AEIC promediada para los animales del grupo EE-HTL.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

DISCUSIÓN:

Los datos de este experimento muestran la incapacidad de los animales para la adquisición de una respuesta operante que puede generar la estimulación eléctrica del NPble en los animales experimentales de este grupo (EE-Pble), en contraposición con la rápida adquisición de la conducta que se observa en los animales del grupo EE-HTL. Se podría argumentar que éstos últimos tuvieron un entrenamiento previo en la fase preliminar del experimento 6, pero dado que el período de entrenamiento y los ensayos de moldeamiento de los animales parabraquiales han sido similares a los de los animales hipotalámicos en el experimento 6, la fase de adquisición de ambos grupos (EE-HTL en el experimento 6 y EE-Pble en el experimento 7) podría ser perfectamente comparable. Sin embargo, los resultados de estos dos grupos son totalmente diferentes.

En el caso de los animales con un electrodo implantado en el HTL, nuestros hallazgos coinciden con los de otros autores, quienes encuentran que en muchas zonas a lo largo del Haz Prosencefálico Medial, la adquisición de la conducta autoestimuladora ocurre con rapidez y facilidad, al tiempo que se alcanzan tasas de respuesta medias de alrededor de 60 pulsaciones por minuto (Yeomans, 1990; Wise, 1996).

En un experimento publicado por Ferssiwi y colaboradores, en el que se evoca conducta de autoestimulación en el tercio medio del N. Parabraquial medial, si bien no se especifica la duración del período de moldeamiento de la conducta, los ensayos de adquisición tenían una duración de 10 minutos y las intensidades de corriente comenzaban a partir de 10 μA , llegando hasta los 60 μA , valor a partir del cual se alcanzan tasas de respuesta asintóticas (Ferssiwi et al., 1987). En nuestro caso, el tiempo empleado para el moldeamiento de la conducta fue superior a 30 minutos por animal, ya que se hicieron 5 ensayos, en cada uno de los cuales se fijó un valor distinto de intensidad de corriente, y cada uno de ellos de 10 minutos de duración. La intensidad media de corriente fue de 77,5 μA [encontrando con este valor de corriente, preferencias por el lugar asociado a la estimulación]. Estos parámetros de estimulación están dentro del rango de los utilizados por los autores citados anteriormente, y cabría esperar, por lo tanto, una cierta tendencia al menos, de los animales a adquirir esta conducta de auto-refuerzo, todo ello suponiendo que la subdivisión lateral externa pudiera tomar parte del mecanismo responsable de la conducta autoestimuladora, pero nuestros datos son negativos en este sentido.

DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados del primer experimento de este capítulo nos han permitido, reproducir los datos obtenidos en el capítulo anterior acerca de la implicación del NPBl en los procesos adquisitivos-motivacionales, ya que de nuevo volvemos a comprobar que la Estimulación Eléctrica del NPBl genera, de manera consistente, preferencias o aversiones hacia los estímulos ambientales con que es asociada. De manera análoga, los animales hipotalámicos muestran preferencia por estas mismas claves ambientales con que es asociada la estimulación eléctrica del Hipotálamo Lateral, en concordancia con los resultados obtenidos por diferentes autores, entre ellos Duvauchelle y Ettenberg, así como Healey y colaboradores (–citados por Tzschentke, 1998 y por Schechter & Calcagnetti, 1998–). También concuerda con los resultados obtenidos por Rolls y asociados en tanto que las neuronas del HTL son capaces de responder ante estímulos neutros (ej.: visión de una jeringa) que previamente habían sido asociados con comida en animales privados (Rolls, 1982; 1994; 1997; 2000). En ambos grupos experimentales, el electrodo podría haber activado sistemas de refuerzo general –[y/o aversión, en el caso de los animales parabraquiales]–, aunque no está claro si nos encontramos ante componentes diferentes de un mismo mecanismo, o si se trata de dos mecanismos de refuerzo independientes, con efectos paralelos.

Al recordar las conexiones entre el Hipotálamo Lateral y el N. Parabraquial (ver Apartado VIII de la introducción de esta Tesis), podemos observar que, en sentido descendente, los axones de estas células hipotalámicas conectan principalmente con los subnúcleos lateral central y lateral dorsal (Moga et al., 1990; Krukoff et al., 1994). Por su parte, las proyecciones parabraquiales hacia el HTL parten desde las divisiones superior, central y extrema, y en menor grado desde el NPBl dorsal y NPBl externo (Fulwiler & Saper, 1984; Bernard et al., 1991; 1993; Halsell, 1992; Krukoff et al., 1993). La utilización de marcadores como por ejemplo inmunorreactividad al C-Fos muestra un marcaje ligero en el N. Parabraquial tras la AEIC del HTL sin que se pueda localizar en subregiones específicas (Arvanitogiannis et al., 1997). Por tanto, se puede afirmar que las proyecciones directas NPBl-HTL no son muy numerosas, aunque también podríamos hablar de conexiones indirectas a través de otros subnúcleos parabraquiales con los que hacen sinapsis las dendritas de las células del NPBl.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

Por otra parte, algunos autores han puesto de manifiesto que algunas subpoblaciones de neuronas hipotalámicas de la zona lateral podrían ejercer un papel modulador sobre el procesamiento del valor motivacional de los estímulos gustativos, que tienen su segundo relevo en el NPB medial, un efecto que estaría mediado por la liberación de opiáceos, los cuales actúan sobre receptores μ y κ (Moufid-Bellancourt & Velley, 1994; Moufid-Bellancourt et al., 1996) presentes en esta zona parabraquial (Mansour et al., 1988; 1995; Wolinsky et al., 1996).

Asimismo, se piensa que el sistema opiáceo endógeno tiene un importante papel en la regulación de los efectos de incentivo en relación con la ingesta y que determinadas manipulaciones como la privación de alimento producen modificaciones en este sistema (Carr, 2002). De hecho, la restricción de comida aumentó y disminuyó, respectivamente, la sensibilidad hacia receptores μ y κ de diversas zonas, entre ellas el extremo lateral del N. Parabraquial (Wolinsky et al., 1994; 1996), y la ingesta inducida por estimulación eléctrica del Hipotálamo Lateral ha podido ser bloqueada mediante la administración de antagonistas opiáceos específicos para los receptores μ y κ (Papadouka & Carr 1994).

Por otro lado, las hormonas periféricas responsables de la información sobre los niveles de adiposidad e implicadas en la regulación homeostática –insulina y leptina- son detectadas por receptores situados tanto en el hipotálamo, afectando indirectamente a la zona hipotalámica lateral (Figlewics et al., 1996; Hirschberg, 1998; Woods et al., 1998a), así como en el extremo lateral del NPB (Elmqvist, 1997; 1998; Ritter et al., 1992; Calingasan & Ritter, 1993) donde podrían modular las propiedades motivacionales de la ingesta y de la búsqueda de droga, modificando su papel como incentivo (Figlewicz & Woods, 2000; Carr, 2002) al actuar sobre células que inervan estructuras límbicas relacionadas con el refuerzo como el NAC y la Amígdala Extendida (Carr, 2002).

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este primer experimento permiten hipotetizar que la estimulación eléctrica que ha provocado un estado afectivo positivo en ambos grupos experimentales, puede haber activado un mecanismo regulador común de las propiedades de incentivo de los estímulos ambientales con que es asociada -en este caso, claves visuales-, pero podrían haber sido estímulos gustativos como los utilizados en los tres primeros capítulos de esta tesis, o bien drogas de abuso tal y como señala Carr (2002). Este efecto recompensante podría estar mediado en última instancia, por una actuación indirecta sobre las neuronas

dopaminérgicas del N. Accumbens (Ikemoto & Panksepp, 1999; Di Chiara, 1999; Carr, 2002).

Sin embargo, en el segundo estudio de este capítulo (experimento 7) encontramos que ambos grupos de animales experimentales (EE-HTL y EE-PBl) difieren en cuando a la facilidad para la adquisición de una conducta operante que tiene por objeto la autoadministración de corriente eléctrica reforzante. Los animales hipotalámicos aprenden esta conducta con gran facilidad y rapidez, cosa que no ocurre en los sujetos con electrodos situados en el NPBl externo.

Una posible explicación a esta diferencia radica en la presencia en la zona parabraquial lateral externa de fibras aferentes con información nociceptiva que participan en el procesamiento del componente afectivo del dolor (Bernard et al., 1991; 1994; 1995; Bester et al., 1995; 1997; Light et al., 1993; Saper, 1995a; Jasmin et al., 1997; Craig & Dostrovsky, 1999). Esta proximidad anatómica puede impedir los intentos de hacer que el animal aprenda una conducta operante que conduzca a la obtención de refuerzo, ya que simultáneamente se podrían estar activando neuronas de dolor. Para resolver esta problemática se realizó el experimento 7 en el cual se manipuló la frecuencia de la corriente eléctrica empleada, con objeto de conservar estable el radio de acción de la estimulación, a la vez que se mantiene su eficacia. Los resultados fueron negativos, a pesar de que los animales parabraquiales positivos siguen prefiriendo el compartimento asociado a la estimulación, lo que en última instancia nos lleva a descartar el hecho de que la estimulación en este grupo pueda evocar sensaciones nociceptivas.

Por otra parte, nuestros resultados podrían estar en consonancia con los aportados por el grupo de Carr y colaboradores en el sentido de que estos investigadores han comprobado que el bloqueo de los receptores μ y κ eleva el umbral de ingesta inducida por estimulación eléctrica del Hipotálamo Lateral pero no afecta a los umbrales de AEIC de esta zona (Papadouka & Carr, 1994; Carr & Papadouka, 1994). Por tanto, esto implicaría una disociación entre la actividad opiácea relacionada específicamente con la ingesta y la conducta instrumental de autoadministración de pulsos de corriente eléctrica reforzante. Esta disociación se vería apoyada, en el caso de la región parabraquial lateral externa, por el hecho de que no ha sido posible inducir refuerzo en los animales parabraquiales (ver experimento 7), pero al mismo tiempo, la estimulación eléctrica de esta zona genera preferencias por los estímulos gustativos asociados (experimentos 1 y 2). Este mismo

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

efecto podría ser explicado por el hecho de que la zona PBle es un lugar privilegiado de procesamiento de información gustativa y visceral (Yamamoto et al., 1994; Sakai & Yamamoto, 1997; Yamamoto & Sawa, 2000a) y contiene receptores opiáceos μ y κ cuya densidad puede ser modulada por el grado de privación de alimento (Mansour et al., 1988; 1994; Wolinsky et al., 1996).

Esta ausencia de conducta autoestimuladora en los sujetos con electrodo situado en el NPle, a diferencia del grupo de animales hipotalámicos, podría ser entendida también aludiendo a otro contexto teórico en el que, como señalan algunos autores estudiosos de la drogadicción, no se puede considerar que los substratos neurales que están a la base las consecuencias agradables/afectivas de la administración de una sustancia adictiva sean los mismos que subyacen a la conducta de búsqueda de estas sustancias (Berridge, 1996; Robinson & Berridge, 1998; McFarland & Ettenberg, 1998). En nuestro caso, podríamos proponer que mediante la estimulación eléctrica del NPle se podría estar actuando sobre substratos neurales apetitivos o aversivos, los cuales pueden ser asociados con cualquier estímulo que esté presente concomitantemente en el mismo momento de la estimulación (claves ambientales, sabores, posición,...) pero no se estaría actuando sobre el mecanismo de búsqueda. De hecho, algunos de los autores citados anteriormente han demostrado la existencia de interacciones complejas entre los opiáceos y el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico al demostrar que la naloxona bloquea los efectos de incentivo (*'reinforcement'*) pero no afecta a la motivación de búsqueda de droga (McFarland & Ettenberg, 1998), lo cual estaría en consonancia con nuevos resultados obtenidos en nuestro laboratorio en relación con la estimulación eléctrica de esta zona parabraquial (García-Pérez, R., datos no publicados).

En conclusión, es posible proponer, en función de los resultados obtenidos en el experimento 6 de este capítulo, que la estimulación eléctrica del Hipotálamo Lateral y del NPle podría haber activado un mecanismo regulador común de las propiedades reforzantes de los índices ambientales con que es asociada [en este caso, claves visuales, pero podrían haber sido estímulos gustativos como los utilizados en los tres primeros capítulos de esta tesis, o bien drogas tal y como señala Carr (2002)], provocando un estado afectivo positivo (McFarland & Ettenberg, 1998). Sin embargo, esta hipótesis inicial 'común' no se ve apoyada por los resultados del experimento 7, en el cual se demuestra la imposibilidad para inducir conductas de autoestimulación intracerebral en los animales parabraquiales, a diferencia de lo que sucede en los animales con electrodos implantados en el Hipotálamo Lateral. Estos

resultados sugieren que podríamos encontrarnos ante dos mecanismos de refuerzo no idénticos, con peculiaridades funcionales y teóricas aún por determinar.

CAPÍTULO VI

**EFECTOS DE LA ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA DEL NÚCLEO
PARABRAQUIAL LATERAL EXTERNO EN TAREAS ESPECÍFICAS DE
APRENDIZAJE ESPACIAL Y GUSTATIVO, ELIMINANDO LOS ÍNDICES
AMBIENTALES Y LAS CLAVES PROPIOCEPTIVAS.**

EXPERIMENTO 8**Efectos de la Estimulación Eléctrica del Núcleo Parabraquial Lateral Externo en Tareas específicas de Aprendizaje Espacial y Gustativo, eliminando los índices ambientales y las claves propioceptivas**

Los experimentos previos han puesto de manifiesto que los animales muestran, en unos casos, preferencia, o bien, rechazo hacia los estímulos con que es asociada la E.E del NPBl. Una cuestión que ha quedado abierta a lo largo del trabajo realizado en esta Tesis, es la referente a las características y el tipo de aprendizaje que los animales establecen al asociar los efectos de la Estimulación Eléctrica con índices externos como pueden ser los sabores o las claves ambientales.

El aprendizaje asociativo, como ya señaló Rescorla (Rescorla, 1988 –citado por Zigmond et al., 1999) es la forma mas general que tienen los organismos, incluidos los seres humanos, para aprender acerca de las relaciones causales existentes en el mundo. Durante mucho tiempo se pensaba que este tipo de aprendizaje podía ser inducido simplemente asociando dos estímulos arbitrariamente elegidos o una respuesta con un reforzador, pero estudios mas recientes han puesto de manifiesto que dentro de esta categoría se incluyen tipos de asociaciones que pueden tener importantes dependencias biológicas en la medida en que los animales muestran predisposiciones innatas para asociar aquellos estímulos que son importantes para su supervivencia. Así, por ejemplo, los animales tienden a asociar estímulos gustativos con malestar gastrointestinal, que es una señal visceral, o también señales exteroceptivas con un shock eléctrico, que es un estímulo nociceptivo (Puerto & Molina, 1980a; Molina & Puerto, 1981; García et al., 1985; Bures et al., 1998; Zigmond et al., 1999; Kandel et al, 2000; Welzl et al., 2001).

Estudios llevados a cabo en este y otros laboratorios han puesto de manifiesto la participación del Área Parabraquial en la inducción de Aprendizaje Aversivo Gustativo, dado que constituye uno de los primeros relevos centrales en el procesamiento de señales tanto gustativas como viscerales (Norgren & Leonard, 1971, Fulwiler & Saper, 1984; Kiefer, 1985; Lança & Van der Kooy, 1985; Herman & Rogers, 1985; Di Lorenzo, 1988; Halsell, 1992; Sakai & Yamamoto, 1997; 1998; Reilly, 1999). Además, se han logrado disociar dos modalidades de adquisición de este tipo de aprendizaje interoceptivo, denominadas concurrente y secuencial. En el

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

primer caso los animales aprenden a discriminar entre dos sabores, cada uno de los cuales es emparejado simultáneamente bien con la infusión intragástrica de productos tóxicos o bien con suero fisiológico, constituyendo una modalidad de aprendizaje implícito (Mediavilla et al., 2001b). A la base de este aprendizaje concurrente se hallan implicadas una serie de estructuras situadas a lo largo del eje gástrico-vagal-NTS-NPBm (Arnedo et al., 1990; 1991; 1993; Agüero et al., 1997) y del que parece formar parte también el núcleo parabraquial lateral externo (Mediavilla et al., 1999; 2000). En cambio, en el aprendizaje secuencial –considerado como una modalidad de aprendizaje relacional-, los animales aprenden a asociar, en días alternativos, un sabor con la administración intragástrica de un producto nocivo, y el otro con la inyección de suero fisiológico, tras, por ejemplo, un intervalo de 15 minutos entre ambos estímulos, ya que este aprendizaje requiere de la integridad de una vía humoral con relevos en el AP-NPBI (Gallo et al., 1991; Agüero & Puerto, 1986; Agüero et al., 1993a; 1993b; Mediavilla et al., 2001b).

Por otra parte, y como ya se ha indicado en varias ocasiones anteriores, la zona parabraquial lateral externa es también un lugar de relevo de la vía Espino-(Trigémico)-Pontoamigdalóide, que procesa información hacia estructuras mesencefálicas y diencefálicas, no tanto del aspecto discriminativo del dolor sino más bien de su componente afectivo/emocional, que es transferido a centros como la Amígdala (Bernard, 1991, 1994, 1995; Light et al., 1993; Bester, 1995; 1997; Saper, 1995a; Jasmin et al., 1997; Buritova et al., 1998; Craig & Dostrovsky, 1999). Tal hecho convierte a esta estructura PBlE en candidata a participar también en la clase de aprendizaje asociativo especializado que permite asociar estímulos exteroceptivos con señales nociceptivas.

En efecto, en la actualidad, la mayoría de los investigadores coinciden en reconocer múltiples sistemas de aprendizaje y memoria, que funcionan en paralelo e involucran a distintos mecanismos cerebrales, así como diversas modalidades de adquisición, almacenamiento y recuperación de la información (Zigmond et al., 1999; Kandel et al., 2000; Eichenbaum, 2002). La clasificación más básica y ampliamente aceptada hace distinción entre Memoria Declarativa/ Explícita y Procedimental/ Implícita: La primera se refiere a la adquisición de información sobre hechos objetivos o acontecimientos sobre los cuales, el ser humano es consciente, mientras que la segunda incluye habilidades motoras y perceptuales –hábitos motores, ‘*priming*’-, aprendizaje asociativo –condicionamiento clásico e instrumental- y aprendizajes no asociativos –habitación y sensibilización- (Mishkin

& Appenzeller, 1987; Squire, 1992; Squire et al., 1993; Eichenbaum, 1999; 2001; 2002). Y aunque esta distinción se ha demostrado principalmente en pacientes amnésicos, ha sido corroborada por experimentos realizados con seres humanos normales –sin lesión cerebral- y con animales de distintas especies como primates o ratas (Bachevalier & Mishkin, 1984; Packard & McGaugh, 1996; Eichenbaum, 2002).

Experimentos realizados en seres humanos muestran que ante un mismo tipo de material es posible establecer disociaciones en la ejecución de una tarea, que implican, por ejemplo, el establecimiento de un condicionamiento emocional, que depende de la integridad funcional de la amígdala y déficit en la memoria declarativa que sería provocado por lesiones del hipocampo (Bechara et al., 1995). Por otro lado, y mediante técnicas de condicionamiento espacial (por ejemplo, encontrar comida en uno de los brazos de un laberinto en T), Packard y McGaugh plantean la posibilidad de que la adquisición de un aprendizaje asociativo podría suponer al menos dos tipos de respuestas: unas de tipo estereotipado que implican la ejecución de una respuesta en las mismas condiciones en que fue adquirida -conducta de giro hacia un lado-, y otras que permiten flexibilidad comportamental en el sentido de poder utilizar la información aprendida para responder a una situación nueva (Packard & McGaugh, 1996; Reber et al., 1996; Kandel et al., 2000; Eichenbaum, 1999; 2001; 2002).

Analizando la naturaleza de los estímulos con los que ha sido asociada la Estimulación Eléctrica en los diferentes experimentos realizados en esta Tesis, los resultados obtenidos no nos permiten concluir que se trata de un aprendizaje específicamente gustativo ya que los animales han podido asociar la estimulación eléctrica del NPBe a cualquier tipo de claves, ya sea un determinado sabor (capítulos 1 y 2) ya sean señales ambientales (capítulos 4 y 5).

En el caso de los experimentos en los que se ha utilizado un estímulo gustativo emparejado con la estimulación (Capítulos 1 y 2), éste era situado siempre en el mismo orificio de la jaula, con lo cual cada ensayo experimental consistía en ofrecer al animal un estímulo gustativo ‘X’ presentado siempre en la posición ‘A’, el cual era emparejado con estimulación eléctrica del NPBe y un estímulo gustativo ‘Z’ presentado siempre en la posición ‘B’ el cual no era seguido por estimulación eléctrica. Tras dos ensayos de aprendizaje, la fase de prueba consistía en la presentación simultánea de los dos sabores en la misma posición en que se habían ofrecido durante la fase de entrenamiento para que el animal hiciese una elección.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

Por tanto, el animal siempre disponía simultáneamente de las mismas claves gusto-olfatorias, propioceptivas y de localización espacial, para ser asociadas con el efecto de la Estimulación Eléctrica. Esto supone que no es posible establecer con certeza si el aprendizaje generado se basa en uno u otro tipo de claves o en varias simultáneamente. O lo que es lo mismo, desconocemos si el animal elige ‘el sabor correcto’, o ‘realiza el giro correcto’ o ‘se dirige a la posición correcta’ o si su elección se basa en la integración de todas estas claves.

Para dilucidar algunas de estas cuestiones se llevó a cabo el siguiente experimento, en el cual, primeramente se realizó una clasificación de los animales en positivos, negativos e indiferentes, según su preferencia por el lugar asociado con la estimulación eléctrica del NPBe a través de un paradigma de condicionamiento espacial. A continuación, los animales debían aprender a asociar un sabor con la estimulación eléctrica del NPBe según un procedimiento en el que sucesivamente se iban alternando cada día la posición derecha o izquierda en la que se presentaban las buretas conteniendo los distintos sabores, y examinando así exclusivamente la variable gustativa y eliminando las otras claves propioceptivas y espaciales. En resumen, destacando de esta manera que el aprendizaje de los animales solo podría basarse en estímulos gustativos para establecer el condicionamiento y realizar la elección adecuada.

METODO:

SUJETOS:

Se utilizaron para este experimento, 23 ratas macho albinas, de la raza Wistar, suministradas por el Animalario de la Universidad de Granada, con pesos que oscilaron entre los 260 y 350 grs. al inicio del procedimiento quirúrgico, las cuales fueron distribuidas en jaulas de 4 en 4 y mantenidas con comida y agua ‘ad libitum’ durante la semana de habituación previa al comienzo de la cirugía. Las condiciones ambientales de luz y temperatura fueron mantenidas constantes, dentro de un rango similar al descrito en los experimentos previos y todas las manipulaciones fueron realizadas durante el período de luz.

PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO:

Estos 23 animales fueron sometidos a una intervención quirúrgica que tenía por objeto el implante de un electrodo monopolar en el NPBl izquierdo según el procedimiento quirúrgico descrito en el Experimento 1 de esta Tesis. Las coordenadas para la localización del electrodo intracerebral fueron idénticas a las utilizadas en los experimentos previos de esta tesis ($AP = -0,16$ V = 3,0 y L = $\pm 2,5$ según el atlas de Paxinos & Watson, 1996, tomando como referencia el punto 0 interaural).

Concluida la operación, todos los animales fueron instalados individualmente en jaulas de plexiglás con características similares a las descritas en los experimentos anteriores, donde permanecieron durante una semana de recuperación desde la finalización de cirugía del último animal. Durante este período los animales dispusieron de comida y agua 'ad libitum' y se les aplicó diariamente una solución antiséptica sobre el implante (*Betadine*, Povidona Yodada. Asta Medica. Madrid) para prevenir infecciones y acelerar el proceso de recuperación.

PROCEDIMIENTO CONDUCTUAL:

Fase de Exploración previa al Aprendizaje:

Se realizó una exploración inicial acerca de la intensidad de la corriente que era apropiada para los animales, con objeto de establecer una intensidad óptima. Para ello, tres días antes del inicio del procedimiento conductual, se sometió a cada animal a estimulación eléctrica del NPBl en una caja de Skinner. Se utilizó corriente directa pulsante y de voltaje creciente, comenzando desde 0,2 voltios y aumentando de 0,2 en 0,2 voltios hasta llegar al máximo capaz de soportar cada sujeto, intentado evitar a la par conductas de escape, saltos o vocalizaciones. En resumen, se fijó un criterio similar al del experimento 5, consistente en la aplicación de 'una corriente conductualmente noticable, pero siempre por debajo del umbral de dolor'. Entre cada ensayo de estimulación de aproximadamente 3 minutos, se introdujo un periodo de descanso de 2 minutos para evitar dañar la zona. Finalmente, una vez conocido el valor máximo de voltaje que habíamos liberado en cada animal, se procedió a calcular la intensidad de corriente que recibió cada animal, de manera similar a como lo hicimos en los experimentos anteriores. Los valores oscilaron entre 80 y 95 microamperios, con una media de 85,7 μ A (Ver Tabla 9 del Anexo II).

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

A) Fase de Condicionamiento al Lugar:

Con objeto de establecer los grupos de animales para los que la estimulación eléctrica del NPBL resulta aversiva, reforzante o indiferente, se llevó a cabo esta Fase de Condicionamiento Espacial:

Después de un día de descanso respecto a la fase anterior, en el que los animales dispusieron de comida y agua 'ad libitum', todos los sujetos fueron puestos a prueba en el 'Laberinto en Corredor', donde se realizó un Test de Aprendizaje Espacial en dos sesiones, según el procedimiento descrito en el experimento 5 de esta Tesis. La mitad de los animales recibieron estimulación en un lateral del corredor y el 50% restante en el otro lateral. Finalizados los ensayos individuales, cada animal era devuelto a su jaula, donde disponía de comida y agua 'ad libitum'. Los valores individuales relativos al tiempo que cada animal permaneció en el compartimento estimulado en cada una de las sesiones se recogen en la tabla 9 del Anexo II.

B) Fase de Aprendizaje Gustativo:

Se dejaron dos días de intervalo entre la fase de Condicionamiento Espacial, previa, y el comienzo del preentrenamiento, antes de iniciar la siguiente fase de Aprendizaje Interoceptivo. Durante estos dos días, los animales dispusieron de comida y agua 'ad libitum' y al finalizar el segundo día de descanso, fueron privados de agua para facilitar la ingesta durante el periodo de preentrenamiento, que también tuvo una duración de dos días. En este período, los animales dispusieron de agua durante solo 7 minutos diarios, en buretas situadas en uno u otro orificio de la jaula, de forma alternada, al tiempo que se limitó la comida a 15 gr. por día.

En la Fase Experimental de Aprendizaje Interoceptivo, se utilizó un procedimiento destinado a que los sujetos tuviesen que utilizar una asociación entre el índice gustativo y la estimulación cerebral basada exclusivamente en señales gustativas, ya que se había eliminando cualquier otro tipo de señales propioceptivas o de posición. En concreto, consistió en la presentación de dos estímulos gustativos neutros, "Fresa" y "Coco", similares a los utilizados en el experimento 1 de esta Tesis y presentados en días alternos en posiciones diferentes, uno de los cuales era seguido inmediatamente por la estimulación eléctrica del NPBL durante 7 minutos (Ver tabla 8.1).

PRIMERA SESIÓN: Cada uno de los animales disponía de una sola bureta con el estímulo gustativo "F" durante 7 minutos, colocado, para la mitad de los

animales en el orificio izquierdo de la caja, y para los restantes en el orificio derecho. Concluido el tiempo se procedía a la estimulación eléctrica del NPBe (estimulador Letica LI12100, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, conectado a un osciloscopio "Telequipment DM63", Textronic Ltd, London, U.K.) con corriente directa pulsante, cuya intensidad fijada en la fase previa al condicionamiento y administrada en pulsos individuales de 0,1 ms. de duración, separados por 15 milisegundos de intervalo (o lo que es lo mismo, con una frecuencia de 66,6 c.p.s.) durante otros 7 minutos. Se registraba la cantidad de líquido ingerida durante los 7 minutos iniciales así como durante el tiempo en que se administraba la estimulación.

La mitad de los animales fueron estimulados tras consumir "F" y el resto no recibió estimulación.

SEGUNDA SESIÓN: Se presentaba una bureta con el estímulo gustativo "C" en el orificio de la izquierda para los animales que el día anterior habían bebido del orificio derecho, y en el lado derecho para los que habían bebido previamente de la bureta izquierda, durante 7 minutos. Se estimuló al 50% de los animales, que el día anterior no habían recibido estimulación.

TERCERA SESIÓN: Se presentaba una bureta con el estímulo gustativo "F" en el orificio de la izquierda para los animales que habían bebido de este sabor en la bureta del lado derecho durante el primer día y viceversa. Fueron estimulados de nuevo los animales que recibieron estimulación en la primera sesión.

CUARTA SESIÓN: Se presentaba una bureta conteniendo "C" a la derecha para los animales que previamente habían bebido "F" en el lado izquierdo, y viceversa. Fueron estimulados los mismos animales que recibieron E.E. en la 2ª sesión experimental.

Al terminar esta fase de entrenamiento, cada sujeto había recibido dos ensayos de asociación de uno de los sabores con la estimulación eléctrica, cada vez en una posición diferente, mientras que el otro estímulo –también balanceado en cuando a posición- no quedó asociado a estimulación alguna.

PRUEBA I: Los animales dispusieron simultáneamente de dos buretas con los sabores "F" y "C" durante los 7 minutos de rigor y en la misma posición en que habían sido presentados durante los dos últimos días de entrenamiento. Se registraron

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

las cantidades que cada individuo consumió de una y otra, y al finalizar, la bebida fue retirada y los animales dispusieron de sus correspondientes 15 grs. de comida diarios, según lo establecido previamente.

A continuación se llevaron a cabo otras cuatro sesiones experimentales más, similares a las anteriores en las que de nuevo se balanceó la posición de las buretas, que finalizó con otra sesión de prueba en la que los animales dispusieron durante 7' de dos buretas con los sabores "F" y "C". (Los detalles sobre el procedimiento experimental se reflejan en la Tabla 8.1).

Durante todos los días que duró el experimento, se finalizaba con la administración de una solución antiséptica sobre los bordes del implante para evitar infecciones que pudiesen causar su desprendimiento. Se utilizó además ruido blanco de fondo para evitar posibles sonidos fortuitos que pudiesen modificar las condiciones ambientales.

Acabada la fase experimental, los animales permanecieron en sus jaulas durante dos semanas con comida y agua 'ad líbitum', y posteriormente fueron sometidos a una sesión de estimulación eléctrica del NPBe con objeto de inducir inmunorreactividad al C-Fos (Ver Anexo I de esta Tesis).

	Estimulación + 'F'				Estimulación + 'C'			
	50%		50%		50%		50%	
Día 1		Fd	Fi		Fd	Fi		
Día 2	Ci			Cd	Ci			Cd
Día 3	Fi			Fd	Fi			Fd
Día 4		Cd	Ci		Cd	Ci		
Prueba I	Fi	Cd	Ci	Fd	Fi	Cd	Ci	Fd
Día 1		Fd	Fi		Fd	Fi		
Día 2	Ci			Cd	Ci			Cd
Día 3	Fi			Fd	Fi			Fd
Día 4		Cd	Ci		Cd	Ci		
Prueba II	Fi	Cd	Ci	Fd	Fi	Cd	Ci	Fd

Tabla 8.1: Paradigma experimental utilizado en la fase de Aprendizaje Gustativo del Experimento 8 ('F': fresa, 'C': coco, 'i': izquierda, 'd': derecha).

RESULTADOS:

De estos 23 animales, 2 tuvieron que ser eliminados por mostrar conducta de giro y otro más por desprendimiento del electrodo, por lo que ambas fases de Condicionamiento Espacial y Gustativo se llevaron a cabo con 20 animales.

A) Aprendizaje Espacial:

La correlación entre ensayos respecto a la actuación de los sujetos en el Laberinto en Corredor es: $r = 0,4672$, $p < 0,038^*$, lo cual significa que la conducta de los animales es consistente entre ensayos.

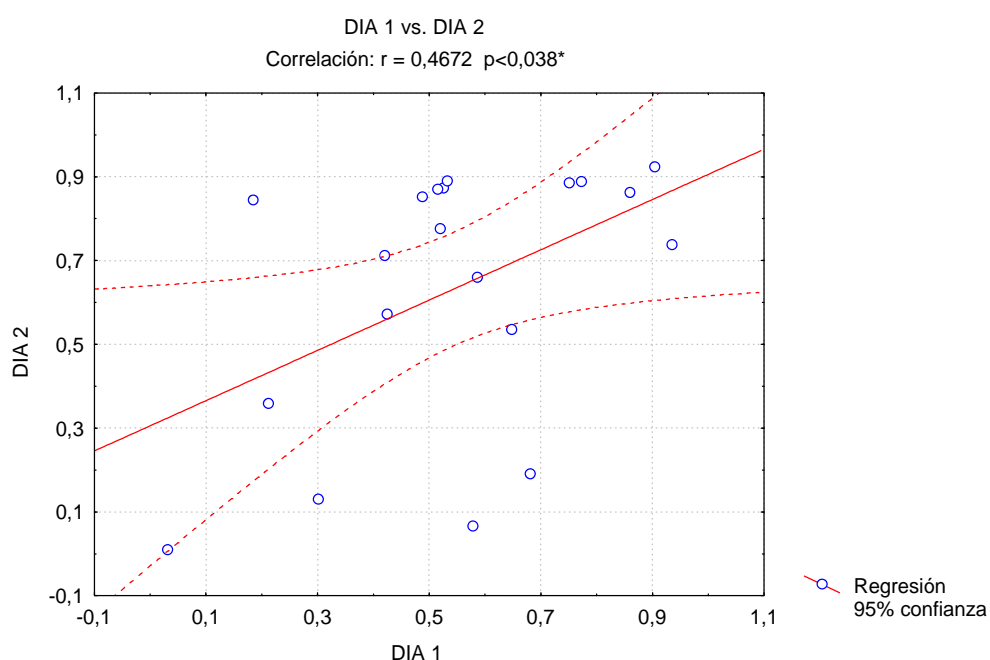


Figura 8.1: Matriz de correlación respecto a la proporción de tiempo que los animales permanecen en el Compartimento asociado a estimulación eléctrica del NPBl en los dos ensayos de condicionamiento.

Se estableció un criterio conductual similar al utilizado en los experimentos 5 y 6 de esta Tesis, para determinar si la estimulación eléctrica del NPBl provoca respuestas apetitivas o aversivas por los estímulos asociados, tomando como referencia la actuación de los animales en el Corredor donde se llevó a cabo esta fase de Condicionamiento Espacial. Para ello se tuvo en cuenta la proporción media de tiempo que cada animal pasó en el compartimento asociado a la estimulación eléctrica del NPBl. Según este criterio, se consideraba que los animales eran

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

positivos si pasaban más del 60% del tiempo en el lugar asociado a la estimulación y negativos si pasaban menos del 30% del tiempo total en este compartimento. El resto de los animales, que pasaban entre el 30%-60% del tiempo en el lugar estimulado los consideramos indiferentes (Ver Fig. 8.2: parte izquierda).

Este criterio fue corroborado estadísticamente mediante un Análisis de Clusters, como se puede observar comparando las partes izquierda y derecha de la Figura 8.2, pues entre ambas, se pueden observar solamente ligeras variaciones que pueden suponer una alteración en la clasificación de no más de 1-2 animales por grupo.

CRITERIO CONDUCTUAL		ANÁLISIS DE CLUSTERS		
Nº DE CASO	GRUPO	Nº DE CASO	CONGLOMERADO	DISTANCIA
PB1	1	PB1	1	0,0224
PB2	1	PB2	1	0,0036
PB3	3	PB3	3	0,2078
PB4	3	PB4	3	0,1412
PB5	2	PB5	3	0,0398
PB6	2	PB6	2	0,0690
PB7	2	PB7	1	0,0226
PB8	1	PB8	1	0,0564
PB9	1	PB9	1	0,0074
PB11	1	PB11	1	0,0234
PB14	1	PB14	2	0,0940
PB15	2	PB15	2	0,1080
PB16	1	PB16	1	0,0184
PB17	2	PB17	3	0,0852
PB18	2	PB18	2	0,0720
PB19	1	PB19	2	0,0170
PB20	1	PB20	1	0,0146
PB21	3	PB21	3	0,0212
PB22	1	PB22	1	0,0906
PB23	1	PB23	1	0,0034

Figura 8.2: Agrupamiento de los sujetos en conglomerados, según su actuación en el segundo ensayo del Laberinto en corredor: a) Tabla izquierda: según el criterio conductual definido previamente. b) Tabla derecha: basándonos en los resultados estadísticos del 'Análisis de Clusters'. En esta tabla se muestra también la distancia de cada individuo a la media de su conglomerado. (Conglomerado 1: animales positivos; conglomerado 2: animales indiferentes; conglomerado 3: animales negativos).

A su vez, la tabla 8.2 muestra la estadística básica (media y desviación típica de cada conglomerado) resultante del Análisis de Clusters.

	CONGLOMERADO 1	CONGLOMERADO 2	CONGLOMERADO 3
Media	0,8666	0,6430	0,1512
DT	0,0388	0,0876	0,1345

Tabla 8.2: Resumen de la estadística descriptiva de cada uno de los ‘conglomerados’ resultantes del Análisis de Clusters.

B) Aprendizaje Gustativo:

Para el Análisis Estadístico de los resultados de esta fase se llevó a cabo un ANOVA con dos factores: Grupo x Sabor para cada una de las pruebas de elección. Para la asignación de los sujetos a los tres grupos (positivo, negativo, indiferente) se tuvieron en cuenta los conglomerados obtenidos mediante el Análisis de Clusters (Figura 8.2, parte derecha), que fueron muy parecidos a los resultantes de la aplicación del Criterio Conductual que habíamos fijado previamente.

En la Prueba I no encontramos efectos significativos en ninguno de los factores ni en la interacción [Grupo: $F(2,17) = 0,0200$ $p < 0,9802$; Sabor: $F(1,17) = 2,4521$ $p < 0,1357$; Interacción: $F(2, 17) = 0,4151$ $p < 0,6667$]. (Figuras 8.3 y 8.5).

Sin embargo, en la Prueba II encontramos que la interacción resultó ser significativa [$F(2,17) = 4,9360$ $p < 0,0204^*$], aunque no los Efectos Principales de Grupo [$F(2,17) = 0,5038$ $p < 0,6129$] ni de Sabor [$F(1,17) = 0,2266$ $p < 0,6401$]. (Los resultados de cada prueba se recogen en la Tabla 8.3). (Figuras 8.4 y 8.6).

Las Comparaciones planeadas muestran que hay diferencias significativas entre el sabor asociado a estimulación (Sabor + EE) y el no asociado a estimulación (Sabor + NE) en el Grupo positivo [$F(1,17) = 6,5463$ $p < 0,0203^*$], pero no en los grupos negativo [$F(1,17) = 2,8323$ $p < 0,1106$] e indiferente [$F(1,17) = 0,7724$ $p < 0,3917$].

Por otro lado encontramos diferencias entre el Grupo Positivo y el Negativo tanto en las cantidades ingeridas de Sabor+EE [$F(1,17) = 38,2649$ $p < 0,00001^*$] como en las de Sabor+NE [$F(1,17) = 32,2037$ $p < 0,00002^*$]. Si comparamos el

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

grupo Positivo con el Indiferente, solo encontramos diferencias significativas en Sabor+NE [$F(1,17) = 4,4851$ $p < 0,0492^*$], pero no en las cantidades ingeridas de sabor asociado a estimulación, Sabor+EE [$F(1,17) = 3,5537$ $p < 0,0766$]. Tampoco hay diferencias significativas entre el Grupo Negativo y el Indiferente en Sabor+EE ni en Sabor+NE.

NOTA:

Los resultados del Análisis Estadístico basados en los agrupamientos realizados siguiendo el criterio conductual, definido previamente, son muy similares a los realizados sobre la clasificación que ha proporcionado el Análisis de Clusters:

Tomando como referencia este criterio conductual (Figura 8.1, tabla izquierda), se llevó a cabo un ANOVA con dos factores: Grupo x Sabor para cada una de las pruebas de elección.

En la Prueba I no se han encontrado efectos significativos en ninguno de los factores ni en la interacción [Grupo: $F(2, 17) = 0,0884$ $p < 0,9157$; Sabor: $F(1,17) = 1,9164$ $p < 0,1841$; GrupoxSabor: $F(2, 17) = 0,0592$ $p < 0,9426$].

Al igual que en el análisis previo, basado en el agrupamiento resultante del Análisis de Clusters, en la Prueba II, encontramos que la interacción resultó ser significativa [**Grupo x Sabor: $F(2,17) = 5,8247$ $p < 0,0118^*$**], pero no lo fueron los Efectos Principales de Grupo [$F(2, 17) = 2,2433$ $p < 0,1365$] ni de Sabor [$F(1,17) = 0,8525$ $p < 0,3687$].

Las Comparaciones Planeadas ponen de manifiesto que hay diferencias significativas entre el sabor asociado a estimulación (Sabor + EE) y el no asociado a estimulación (Sabor + NE) en el Grupo de animales positivos [$F(1,17) = 7,1910$ $p < 0,0157^*$] pero no en el grupo negativo [$F(1,17) = 2,3500$ $p < 0,1436$] ni en el de animales indiferentes [$F(1,17) = 2,4058$ $p < 0,1393$].

Por otro lado encontramos que hay diferencias significativas entre el Grupo Positivo y el Indiferente, tanto en las cantidades ingeridas de 'Sabor + EE' [$F(1,17) = 6,1016$ $p < 0,0244^*$] como de 'Sabor + NE' [$F(1,17) = 7,6464$ $p < 0,0132^*$]. Si comparamos el Grupo Positivo con el Negativo, volvemos a encontrar diferencias en las cantidades ingeridas del estímulo gustativo no asociadas a estimulación (Sabor + NE) [$F(1,17) = 10,4186$ $p < 0,005^{**}$], pero no hay diferencias entre el Grupo Negativo y el Indiferente en 'Sabor+EE' ni en 'Sabor+NE'.

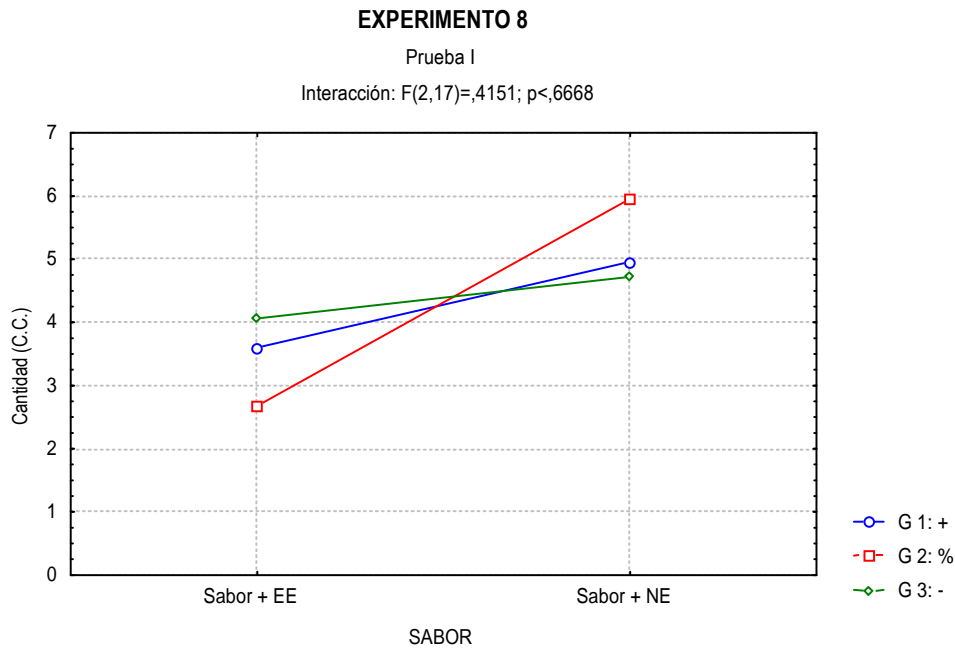


Figura 8.3: Ingesta en centímetros cúbicos de cada uno de los estímulos gustativos asociados a estimulación eléctrica (Sabor+EE) o a ausencia de estimulación (Sabor+NE) en cada uno de los grupos (G1: positivo; G2: indiferente; G3: negativo) resultantes del Análisis de Clusters en el experimento 8 en la primera prueba de elección.

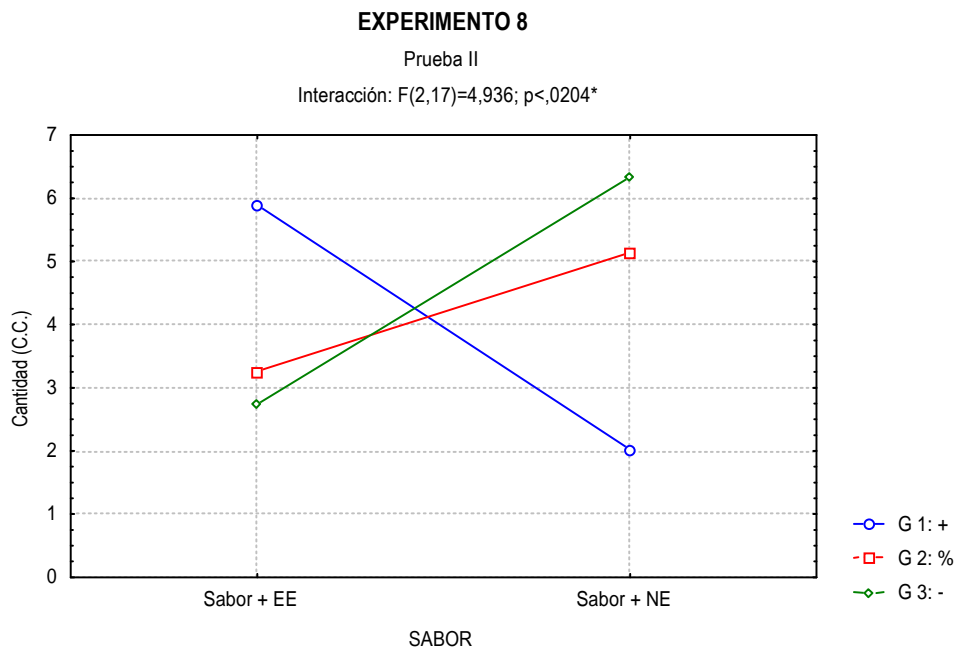


Figura 8.4: Ingesta en centímetros cúbicos de cada uno de los estímulos gustativos asociados a estimulación eléctrica (Sabor+EE) o a ausencia de estimulación (Sabor+NE) en cada uno de los grupos (G1: positivo; G2: indiferente; G3: negativo) resultantes del Análisis de Clusters en el experimento 8 en la segunda prueba de elección.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

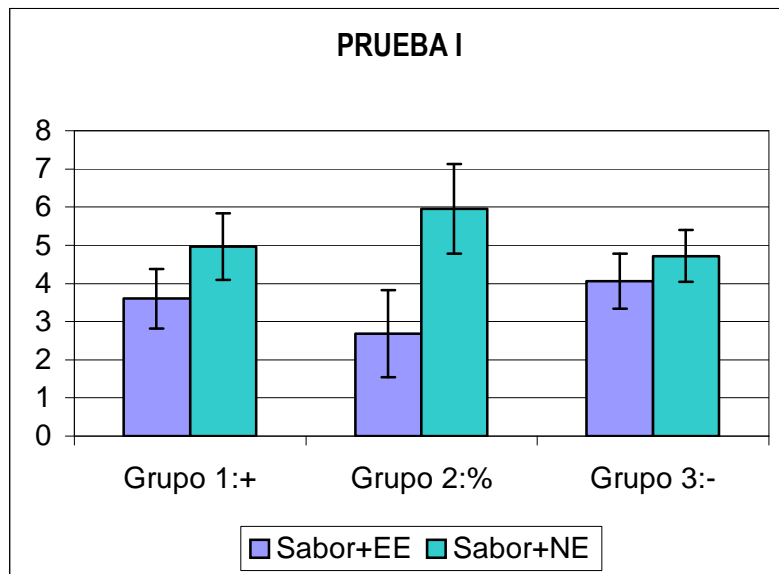


Figura 8.5: Ingesta media en centímetros cúbicos de cada uno de los estímulos gustativos (Sabor asociado a estimulación = Sabor + EE; Sabor no asociado a estimulación= Sabor+NE) por parte del grupo positivo (Grupo1:+), del Grupo Indiferente (Grupo 2:%) y del grupo de sujetos para los que la estimulación resulta aversiva (Grupo 3:-), en la primera prueba, realizada tras dos ensayos de entrenamiento.

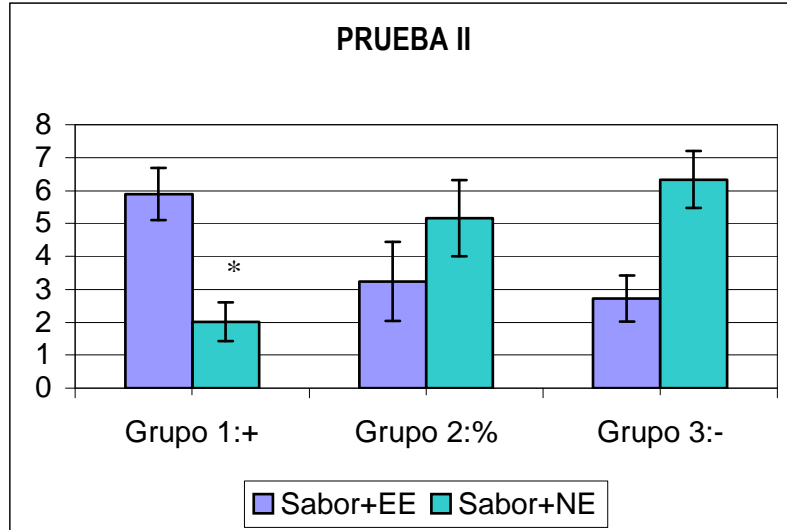


Figura 8.6: Ingesta media en centímetros cúbicos de cada uno de los estímulos gustativos (Sabor asociado a estimulación = Sabor + EE; Sabor no asociado a estimulación= Sabor+NE) por parte del grupo positivo (Grupo1:+), del Grupo Indiferente (Grupo 2:%) y del grupo de sujetos para los que la estimulación resulta aversiva (Grupo 3:-), en la segunda prueba, realizada después de otros dos ensayos de entrenamiento posteriores a la primera prueba.

C) Relación entre el Aprendizaje Espacial y el Gustativo:

Para comprobar si los animales muestran consistencia en su conducta entre la Fase de Condicionamiento Espacial y la de Aprendizaje Gustativo, se hicieron Contrastes relativos al Coeficiente de Correlación de Pearson. En primer lugar, se calculó el promedio de tiempo que cada animal pasó en el compartimento del Laberinto donde recibía estimulación eléctrica en el NPBe, y después, la proporción del estímulo gustativo asociado a estimulación que cada animal ingiere en cada una de las Pruebas.

La correlación entre el tiempo que los animales pasan en contacto con los índices ambientales asociados a estimulación eléctrica del NPBe y la cantidad de estímulo gustativo asociado con la estimulación eléctrica de esta zona parabraquial en la primera prueba no fue significativo ($r = -0,049$ $p < 0,838$), pero sí lo fue con respecto a los datos de la Prueba II ($r = 0,593$ $p < 0,006^{**}$).

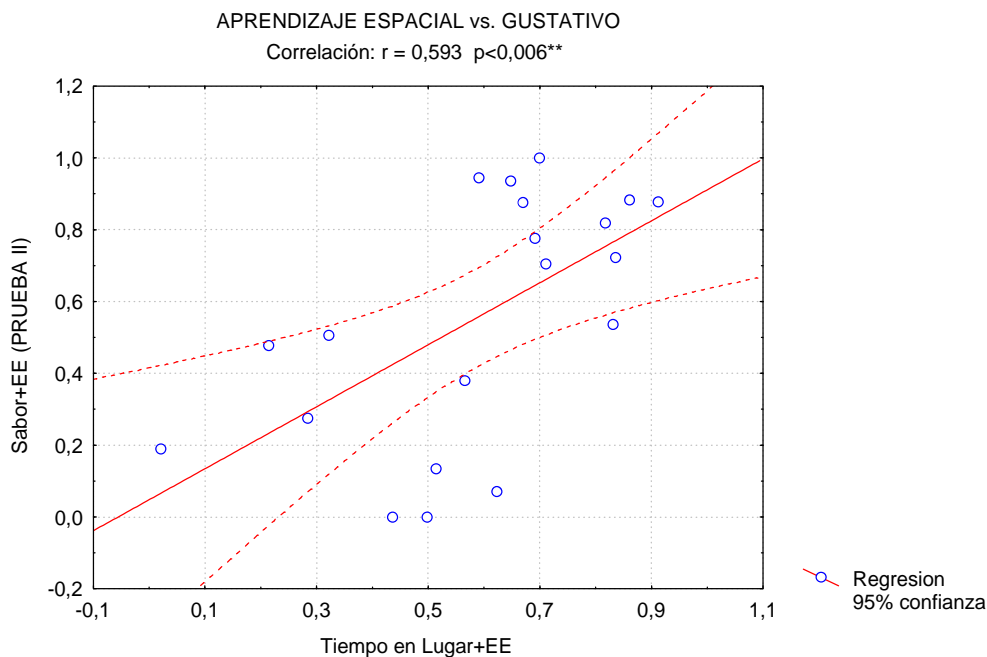


Figura 8.7: Matriz de correlación entre el Promedio de Tiempo que los animales del Experimento 8 pasan en el lugar asociado a estimulación eléctrica del NPBe durante el Aprendizaje Espacial y la proporción de estímulo gustativo asociado a estimulación, ingerido en la Prueba II de Aprendizaje Gustativo.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

DISCUSIÓN:

Los resultados de este experimento muestran que los animales, en pruebas de Condicionamiento Espacial, son capaces de aprender a asociar la estimulación eléctrica del NPBe, sustitutiva de procesos biológicos no bien determinados, con las claves del entorno que los sujetos encuentran en el lugar donde reciben Estimulación Eléctrica, y que este efecto se mantiene consistentemente en los dos ensayos de condicionamiento, en consonancia con los resultados obtenidos en los experimentos 5 y 6 de esta Tesis.

Sin embargo, estos mismos animales, tras dos ensayos de aprendizaje, no logran establecer la asociación sabor-estimulación eléctrica del NPBe en un paradigma en el que se ha incrementado la dificultad, manipulado la posición de las buretas en que es presentado el estímulo gustativo, con objeto de evitar que los sujetos puedan utilizar los índices propioceptivos y/o espaciales para la adquisición del aprendizaje. Éste sí tiene lugar tras aumentar el número de ensayos de condicionamiento, lo cual significa que los animales son capaces de adquirir un condicionamiento basándose exclusivamente en claves gustativas, aunque requieren de un mayor número de ensayos de entrenamiento. Estos datos podrían ser compatibles con investigaciones previas realizadas en nuestro laboratorio en las que animales neurológicamente intactos eran incapaces de establecer un aprendizaje interoceptivo en base a señales espaciales/propioceptivas exclusivamente (Mediavilla et al., 2001a). De este mismo experimento se deduce que en el caso de tener simultáneamente varios tipos de claves -gustativas y espaciales/propioceptivas-, serían las primeras las que, probablemente, tomarían prioridad en el condicionamiento.

Los sujetos de este experimento muestran tanto preferencias como aversiones por las señales con que es asociada la estimulación eléctrica, manteniéndose este efecto invariable incluso aunque, como hemos visto, se modifique la naturaleza del estímulo asociado, dado que en la primera fase se utilizan claves del entorno y posteriormente gustativas. Este dato concuerda ampliamente con los resultados obtenidos en este y otros laboratorios respecto a la implicación del NPBe en aprendizaje asociativo. En concreto, experimentos previos han puesto de manifiesto que las lesiones del NPBe interrumpen el aprendizaje interoceptivo inducido por productos tóxicos como el CINa (Mediavilla et al., 2000) así como por la inyección intragástrica de productos predigeridos, con efectos reforzantes (experimento 3 de

esta Tesis), cuando estos son administrados en un paradigma no demorado –o implícito-, pero no tienen efecto si se intercala una demora entre ambos estímulos, –es decir en un aprendizaje explícito- (Mediavilla et al., 2000; experimento 4 de esta tesis). Alternativamente, la estimulación eléctrica del NPBe indujo tanto preferencias como aversiones por los estímulos gustativos asociados en contigüidad temporal con ella y este efecto se mantuvo tras utilizar, en una segunda fase, otros estímulos gustativos diferentes (resultados del experimento 2 de esta Tesis).

Por tanto, en este experimento, el factor de consistencia de las consecuencias motivacionales apetitivas/aversivas/mixtas de la estimulación eléctrica se mantiene incluso aunque el aprendizaje se establezca mediante la utilización de estímulos de una modalidad sensorial diferente, como es el gusto, en relación a los usados en la primera parte del experimento, que eran claves espaciales del entorno. Este hecho vuelve a corroborar que tal aprendizaje inducido por estimulación, no es específico a una sola modalidad sensorial, sino que los efectos de la estimulación eléctrica del NPBe pueden ser asociados a cualquier tipo de estímulos. Nuestros datos coinciden, en este sentido, con los de otros autores, quienes han observado que, a pesar de la tendencia natural a asociar estímulos gustativos con sensaciones viscerales, es posible, por ejemplo, inducir preferencia espacial por una localización donde los animales encuentran comida (Parkinson et al., 1999; Arnould & Agmo, 1999; Schroeder & Packard, 2000).

Una cuestión adicional a tratar es la relacionada con las condiciones en las que se adquiere y utiliza posteriormente el aprendizaje. Estudios recientes señalan que un mismo material puede ser aprendido simultáneamente de maneras diferentes, involucrando la participación de distintos circuitos cerebrales de memoria que podrían funcionar en paralelo (Packard & McGaugh, 1996; Eichenbaum, 1999; 2001; 2002). Así, la memoria declarativa requiere flexibilidad para transferir el conocimiento adquirido a una situación nueva para el sujeto, y depende de la integridad de las estructuras hipocampales, mientras que la adquisición de conocimiento acerca de relaciones entre estímulos en el contexto en que se desarrolla la conducta y sus consecuencias requiere la participación de un sistema diferente, del que formaría parte el Núcleo Estriado (Reber et al., 1996; Eichenbaum, 1999; 2001; 2002). Adicionalmente, se ha señalado la participación de la Amígdala en aprendizajes tanto apetitivos como aversivos, al ser una estructura clave en el sistema de memoria emocional (Eichenbaum, 2002). En nuestro trabajo, la prueba de elección consistente en la presentación de dos buretas, cada una de ellas con un

ESTUDIOS EXPERIMENTALES

estímulo gustativo diferente, supone una situación experimental novedosa pero en la que los animales deben mostrar una conducta similar a la que han desarrollado durante la fase de adquisición, a saber, de ingesta/rechazo del estímulo gustativo asociado a la estimulación eléctrica del NPBe, lo que permitiría pensar, probablemente, en una modalidad de aprendizaje implícito.

Sin embargo, no podemos descartar en sentido estricto que los animales no puedan aprender la asociación mediante un mecanismo explícito, aunque ciertos indicios parecen indicar lo contrario:

En primer lugar destacaremos que la asociación sabor-estimulación eléctrica del NPBe se ha conseguido siempre en paradigmas que implican contigüidad estimular (experimentos 1 y 2 de esta Tesis), mientras que datos preliminares obtenidos en nuestro laboratorio han arrojado resultados negativos cuando se introduce un intervalo temporal entre la presentación del sabor y la Estimulación Eléctrica de esta estructura PBe. Por el contrario, la Estimulación Eléctrica de la Corteza Insular, conectada anatómicamente con el NPBe (Fulwiler & Saper, 1984; Halsell, 1992; De Lacalle & Saper, 2000) si permite generar preferencias por los estímulos gustativos asociados cuando se intercala una demora de 15 minutos (Cubero y Puerto, 2000a), lo cual implicaría la participación de esta estructura en el recuerdo explícito de la tarea.

Por otro lado, la lesión del NPBe interrumpe el condicionamiento apetitivo y aversivo inducido por administración intragástrica de productos reforzantes y tóxicos, respectivamente, solo cuando éstos son presentados concurrentemente a la aparición del estímulo gustativo y, por tanto, en una tarea implícita (Mediavilla et al., 2000; experimento 3 de esta Tesis). Esta interrupción no se produce cuando el aprendizaje inducido aversivo o reforzante, se lleva a cabo según la modalidad secuencial o relacional (Mediavilla et al., 2000; Experimento 4 de esta Tesis).

Finalmente, resultados recientes obtenidos en nuestro laboratorio indican que el efecto reforzante de la estimulación no se mantiene cuando en la fase de evaluación –test de elección- se invierte la posición de los estímulos gustativos, con respecto a la que ocuparon durante el proceso de aprendizaje, que podría ser interpretado en el sentido de ausencia de flexibilidad, propia del aprendizaje explícito (García-Pérez et al., manuscrito en preparación).

En conclusión, este experimento muestra que los animales generan preferencias o aversiones hacia la estimulación eléctrica del NPBe, cuando es asociada con índices tanto ambientales como gustativos, aunque cuando éstos últimos son presentados en diferentes posiciones espaciales, los animales requieren de un mayor número de ensayos de condicionamiento. A su vez los resultados obtenidos indican que los animales aprenden la asociación, probablemente, mediante un mecanismo implícito aunque no se puede descartar la posibilidad de que, en algunas circunstancias, puedan aprender ciertas tareas mediante la participación de sistemas de memoria declarativa.

DISCUSIÓN FINAL

DISCUSION FINAL

La participación del Área Parabraquial Troncoencefálica, y en concreto del Núcleo Parabraquial Lateral Externo en procesos adquisitivos y regulatorios ha sido el objetivo de esta Tesis doctoral y ha estado motivada por la situación central de este subnúcleo pontino en el procesamiento de información periférica de diversa índole:

Diferentes estudios previos llevados a cabo en este y otros laboratorios habían implicado al Complejo Parabraquial en procesos motivacionales aversivos, y, concretamente en la generación de Aprendizaje Aversivo Gustativo, un tipo de aprendizaje que, como ya se ha señalado en anteriores apartados, tiene una gran relevancia biológica, pues permite a los animales evitar la ingesta de aquellos productos que tienen consecuencias negativas (generación de malestar gastrointestinal) rechazando los sabores con los que han sido asociadas, siendo ésta, una asociación filogenéticamente habitual en el entorno del animal, ya que estímulos gustativos y consecuencias aversivas pueden aparecer frecuentemente en una misma sustancia tóxica (Agüero & Puerto, 1986; Di Lorenzo, 1988; Agüero et al., 1993a; 1993b; 1997; Swank & Bernstein, 1994; Bielavska & Bures, 1994; Spector et al., 1992; Scalera et al., 1995; Nader et al., 1996; Sakai & Yamamoto, 1997; 1998; Shimura et al., 1997; Reilly, 1999; Reilly & Trifunovic, 2000b; Bielavska et al., 2000; Mediavilla et al., 2000; 2001a; 2001b; Cubero et al., 2000a; 2000b; 2001).

Dentro de este proceso adquisitivo, se han distinguido dos modalidades de aprendizaje, denominadas ‘concurrente’ y ‘secuencial’ que involucran a distintos subnúcleos dentro del complejo parabraquial así como diferentes redes de estructuras interconectadas (Gallo et al., 1988; 1990; 1991; Arnedo et al., 1990; 1991; 1993; Agüero et al., 1993a; 1993b; 1997; Mediavilla et al., 2000; 2001a; Cubero & Puerto, 2000b; Cubero et al., 2001) a las que nos referiremos mas adelante. En esta línea, los estudios previos realizados por nuestro grupo habían puesto de manifiesto que las lesiones del N. Parabraquial Lateral externo interrumpen el aprendizaje aversivo gustativo en tareas concurrentes, en las que las demandas temporales son muy exigentes, es decir, en donde el procesamiento de la información visceral ha de hacerse rápidamente, utilizando vías neurales (Mediavilla et al., 2000).

Los resultados obtenidos en el capítulo 1 de esta tesis han puesto de manifiesto, también, la participación del NPBLE en procesos motivacionales

DISCUSIÓN FINAL

apetitivos, puesto que los animales, en un test de elección, prefieren el estímulo gustativo que ha sido consistentemente asociado con la estimulación eléctrica de esta estructura (experimento 1). Este hallazgo estaría en consonancia con las investigaciones previas realizadas por nuestro Grupo de Investigación, en las que se obtuvieron preferencias gustativas inducidas por la infusión intragástrica de productos nutritivos (Puerto et al., 1976a; 1996b; Puerto & Molina, 1977; Molina & Puerto, 1986), una información visceral que es procesada por el Núcleo Parabraquial.

En efecto, estos resultados obtenidos en el Experimento 1, son compatibles con los datos obtenidos mediante técnicas inmunohistoquímicas en las que se demuestra que esta zona parabraquial lateral externa puede ser activada por el procesamiento de información acerca de productos nutritivos procedentes del estómago -lactosa, sacarosa, glucosa- (Yamamoto & Sawa, 2000a; Wang et al., 1999), antimetabólicos como el 2,5-anhidro-D-mannitol o el Mercaptoacetato (Calingasan & Ritter 1993; Ritter, 1994; Ritter et al., 1994; Horn & Friedman, 1998a) y apetitosos -sacarina, CLNa- (Yamamoto et al., 1994; Yamamoto & Sawa, 2000b), cuyas consecuencias positivas se podrían relacionar bien con una reducción de los estados de necesidad / privación, o bien con el valor hedónico del sabor en sí -palatabilidad- (Le Magnen, 1990; Carr, 1996; Nencini, 1996). Alternativamente, las lesiones del Área Parabraquial Lateral que incluyen el subnúcleo lateral externo eliminaron la preferencia por aquellas sustancias innatamente preferidas que tienen consecuencias postingestivas como la sacarosa o el CLNa (Reilly & Trifunovic, 2000a) o bien de productos apetitosos -galletas- (Edwards & Ritter, 1989) al interrumpir, quizá, el procesamiento de las señales viscerosensoriales procedentes del sistema gastrointestinal.

La estimulación eléctrica intracerebral ha sido utilizada en sustitución de los estímulos naturales para realizar un mapeo, -es decir, una exploración- de las estructuras cerebrales relacionadas con una determinada función fisiológica. Así, en el caso del condicionamiento clásico se ha visto que puede sustituir al estímulo condicionado y al incondicionado (Thompson, 1988), además de servir como señal discriminativa en otros modelos de condicionamiento operante (Gallo et al., 1988; Capdevila-Ortis et al., 1988). De hecho, los animales son capaces de evitar estímulos gustativos asociados a la estimulación eléctrica del Área Postrema, una zona que en condiciones naturales suele ser activada por agentes aversivos que son procesados por vía humoral (Gallo et al., 1988; Agüero et al., 1993a).

En nuestro caso, la estimulación eléctrica del NPBe generó preferencias por los estímulos gustativos asociados (experimento 1), con lo cual parece que puede actuar como un sustituto eficaz de procesos fisiológicos no bien determinados, un resultado similar al obtenido por Cubero y Puerto en la Corteza Insular (Cubero & Puerto, 2000a), una estructura anatómicamente conectada, por otra parte, con el NPBe (Fulwiler & Saper, 1984; Halsell, 1992; De Lacalle & Saper, 2000). Pero, la estimulación eléctrica administrada en este experimento, tuvo lugar en un momento inmediatamente posterior a la presentación del estímulo gustativo, a diferencia de lo sucedido en todos los casos anteriormente citados, que introducen una demora entre ambos estímulos (Gallo et al., 1988; Agüero et al., 1993a; Cubero & Puerto, 2000a). Este aspecto temporal puede ser teóricamente relevante y será tratado en un apartado posterior. En conclusión, se puede afirmar que la inducción de preferencias gustativas, es también posible mediante estimulación eléctrica del NPBe, aunque resulta difícil determinar sobre qué sistema biológico concreto está actuando esta estimulación.

Como se ha mencionado anteriormente, se pueden inducir preferencias gustativas mediante la administración de productos reforzantes naturales, como es el caso de la infusión intragástrica de alimentos predigeridos (Puerto et al., 1976a; 1996b; Puerto & Molina, 1977; Molina & Puerto, 1986; Zafra, 2000). Este efecto es bloqueado mediante lesiones específicas del NPBe –cuando la administración es concurrente- (Capítulo. 3 de esta Tesis). Este tipo de estimulación gástrica tiene la peculiaridad de que además de ser un producto nutritivo y, como tal, permite obtener beneficios metabólicos (Puerto et al., 1976a; 1976b; Puerto y Molina, 1977; Le Magnen, 1990), se trata de un alimento similar al que los animales ingieren en condiciones fisiológicas porque ha pasado por la fase cefálica de la digestión, lo que optimiza sus efectos beneficiosos (Pavlov, 1910; Puerto & Molina, 1977; Molina & Puerto, 1986; Zafra, 2000), contrariamente a lo que sucede cuando se utilizan alimentos en condiciones no fisiológicas (Molina et al., 1977).

Por su parte, Reilly y colaboradores han interrumpido las preferencias gustativas hacia la sacarosa, en una tarea permite evaluar las consecuencias postingestivas a largo plazo de esta sustancia, tras realizar lesiones del Área Parabraquial Lateral mediante ácido iboténico, que incluyen el subnúcleo Lateral Externo pero también los demás subnúcleos (Reilly & Trifunovic, 2000b). Por el contrario, en nuestras investigaciones, la interrupción del efecto apetitivo como consecuencia de la lesión, solo tiene lugar cuando los productos reforzantes (EI) son

DISCUSIÓN FINAL

administrados simultáneamente a la ingesta de un determinado Estímulo Gustativo (experimentos 3 y 4 de esta Tesis), y no en un procedimiento demorado.

Estas diferencias podrían ser explicadas en función de la amplitud de la zona destruida por la lesión: en nuestro caso es mas restringida, y por tanto, el bloqueo afectaría solo a aquellos mecanismos que intervienen en tareas en las que se requiere un procesamiento rápido de la información periférica, mientras que en los experimentos de Reilly se podría haber visto afectado un sistema que interviene en el procesamiento y/o integración de información que admite largos períodos de demora, aunque este aspecto temporal será tratado posteriormente.

La preferencia por los índices gustativos asociados a la estimulación eléctrica del NPle (experimento 1) fue observada en una mayoría significativa de animales, pero no en todos ellos. Con el objetivo de examinar la consistencia del efecto observado, se llevó a cabo otro experimento (experimento 2) en el cual, los animales fueron sometidos a dos pruebas, con condiciones similares, pero con sabores diferentes. Los resultados demostraron el carácter consistente de los resultados en cada individuo, en el sentido de que, si bien no todos los animales mostraron preferencia por el sabor asociado a la estimulación, pues también hubo aversiones, los comportamientos eran estables, independientemente de las circunstancias estimulares (experimento 2). A su vez corrobora la mayor dificultad para obtener preferencias, en comparación con aversiones, ya señalada por Rozin y Kalat, a principios de los años setenta (Rozin & Kalat, 1971). Por tanto, la estimulación eléctrica del NPle genera conductas de preferencia o aversivas (experimento 2), lo cual es compatible con datos como los aportados por el grupo de Yamamoto, quienes han identificado en esta zona, células sensibles al valor hedónico positivo o negativo de diversos estímulos gustativos y sustancias químicas (Yamamoto et al., 1994; Yamamoto & Sawa, 2000a; 2000b) o con estudios electrofisiológicos que muestran interacciones mutuamente inhibitorias entre estos tipos de células sensoriales-gustativas (Smith et al., 1994).

En el mismo sentido, las lesiones de esta región troncoencefálica producen efectos disruptores sobre las preferencias / aversiones innatas (Reilly & Trifunovic, 2000a), o bien, adquiridas, hacia un sabor asociado a la infusión de productos reforzantes nutritivos o tóxicos que actúen sobre el sistema gastrointestinal (Mediavilla et al., 2000a; Trifunovic & Reilly, 2000b; Capítulo 3 de esta Tesis). También se han observado efectos aversivos / reforzantes, tras la administración de

sustancias antagonistas opiáceas (Moufid-Bellancourt et al., 1996), lo cual es compatible con la presencia en esta zona de receptores opiáceos μ y κ (Mansour et al., 1988; 1994; 1995; Wolinsky et al., 1996; Chamberlin et al., 1999).

Este doble efecto de preferencias / aversiones inducidas por estimulación eléctrica del NPBe no es específico a una modalidad estimular ya que se puede extender a estímulos de otras modalidades sensoriales, como ocurre en el caso de la utilización de claves espaciales / del entorno (experimentos 5 y 6). Más aún, se ha observado una correlación significativa en el efecto de la estimulación sobre la preferencia por estímulos de diferentes modalidades sensoriales, como ocurre cuando se pone en relación el tiempo que pasan los animales en un determinado contexto y la ingesta de un estímulo gustativo que ha sido asociado con estimulación eléctrica del NPBe (experimento 8). Estos hechos permiten apoyar el carácter de generalidad, frente a la especificidad del efecto hacia una determinada modalidad sensorial.

Con respecto al sistema neurobiológico activado, existe la posibilidad de que la Estimulación eléctrica de esta zona PBe haya podido actuar como sustituto del estímulo visceral. Esta hipótesis es compatible con el hallazgo de que la Estimulación Eléctrica de las ramas aferentes del nervio vago induce inmunorreactividad y activación de sus relevos neuroanatómicos, entre los cuales se encuentra el extremo lateral del N. Parabraquial (Gieroba & Blessing, 1994; Saleh & Cechetto, 1993). Igual sucede tras la administración de sustancias químicas que estimulan receptores situados a nivel periférico –CINa hipertónico, CILi, agentes eméticos, irritantes abdominales, etanol, drogas de abuso, glucosa, sucrosa, lactosa... (Yamamoto et al., 1992; Kobashi et al., 1993; Hochstenbach et al., 1993; Hayward & Felder, 1995; Sakai & Yamamoto, 1997; Wang et al., 1999; Yamamoto & Sawa, 2000a; 2000b; Karimnamazi et al., 2002).

En relación con este punto, se puede proponer que la estimulación eléctrica de NPBe ha podido actuar sobre mecanismos implicados en la ingesta, bien imitando los efectos viscerales provocados por la llegada de alimentos al sistema gastrointestinal, induciendo señales de saciación o bien participando en el procesamiento de los aspectos afectivos de esta conducta:

Así, en condiciones naturales, la infusión intragástrica de productos nutritivos fisiológicos -alimentos predigeridos, aminoácidos resultantes de la ruptura de los nutrientes- genera preferencias por los estímulos gustativos asociados y puede servir

DISCUSIÓN FINAL

como indicador de los niveles de hambre-saciedad del individuo (Deutsch & Tabuena, 1986; Puerto et al., 1976a; 1976b). Asimismo, y como ya he mencionado, agentes antimetabólicos, estimuladores de la ingesta, como el 2,5-AM o el Mercaptoacetato, requieren la integridad del vago así como de los primeros relevos centrales, AP/NTS y NPBl para ejercer su efecto (Calingasan & Ritter, 1993; Horn & Friedman, 1998a; 1998b; Ritter, 1994; Ritter et al., 1994).

Con respecto al carácter afectivo de la ingesta, algunos investigadores han demostrado preferencias en un paradigma de condicionamiento al lugar en el que la bebida/ infusión intragástrica de diversos productos fisiológicos (sacarosa, agua) se hizo inmediatamente antes del confinamiento de los animales en un determinado espacio de un laberinto en T (Arnould & Agmo, 1999). Este efecto fue potenciado por la administración de un antagonista de los receptores CCK_A, una sustancia liberada por el estómago en respuesta a la llegada de nutrientes (Arnould & Agmo, 1999).

Por otra parte, el NPBl es también lugar de actuación de sustancias relacionadas con la ingesta como la Colecistoquinina y la Fenfluramina, cuyos efectos sobre esta región ha podido ser reproducido mediante la estimulación eléctrica: La colecistoquinina (CCK) es una hormona liberada por el tracto gastrointestinal en respuesta a la llegada de nutrientes –aunque también está presente en el SNC–, que actúa para regular procesos digestivos y generar señales de saciación (Gibbs et al., 1993; Cooper & Higgs, 1994; Rowland et al., 1996; Moran, 1996; Sördersten et al., 1996), mientras que la Fenfluramina es un agonista serotoninérgico que actúa como agente anoréctico incrementando los niveles sinápticos de 5-HT y reduciendo la ingesta (Cooper & Higgs, 1994; Rowland et al., 1996; Orosco & Nicolaïdis, 1996; Simansky, 1996; Samanin & Grignashi, 1996; Simansky & Nicklous, 2002).

Estos efectos nutritivos podrían ser interpretados como reforzantes por un organismo en estado de balance energético negativo, o lo que es lo mismo, en condiciones de privación de alimento. De hecho, se ha visto que la administración periférica de ambas sustancias, genera inmunorreactividad para C-Fos en el NPBl (Li & Rowland, 1995; Trifunovic & Reilly, 2001a; Li & Rowland, 1993; 1995; Li et al., 1994...), efecto que es bloqueado por la vagotomía en el caso de la CCK (Li & Rowland, 1995; Trifunovic & Reilly, 2001a) pero no queda eliminado completamente en el caso de la Fenfluramina (Li & Rowland, 1995). Igualmente, las

lesiones de la zona parabraquial lateral eliminan el efecto supresor de la ingesta mediado por CCK pero no por Fenfluramina (Trifunovic & Reilly, 2001b), lo que nos lleva a pensar que ambas sustancias podrían activar mecanismos viscerales distintos, aunque relacionados. En conjunto, estos resultados así como los derivados de los experimentos 3 y 4 de esta Tesis, en los que las lesiones del NPBl eliminaban la preferencia por el sabor asociado a la infusión intragástrica inmediata de alimentos reforzantes apoyan la hipótesis de que la estimulación eléctrica de esta estructura puede haber actuado como sustituto del estímulo visceral.

Aunque la existencia de información visceral en el NPBl, como ya hemos visto, se conoce desde hace mucho tiempo (Fulwiler & Saper, 1984; Herman & Rogers, 1985; Lança & Van der Kooy, 1985; Papas & Ferguson, 1990; Herbert et al., 1990; Moga et al., 1990; Bernard et al., 1991; 1993; Halsell, 1992; Krukoff et al., 1993; 1994; Saleh & Cechetto, 1993; Kobashi et al., 1993; Light et al., 1993; Jia, et al., 1994; Slugg & Light, 1994; Alden et al., 1994; Saper, 1995b; Krout & Loewi, 2000; De Lacalle & Saper, 2000), la presencia de información gustativa en esta zona solo se ha demostrado recientemente (Yamamoto et al., 1994; Halsell & Travers, 1997; Yamamoto & Sawa, 2000b; Karimnamazi et al., 2002). Este último hecho no permite descartar la posibilidad de que la Estimulación Eléctrica pueda haber actuado como sustituto del estímulo gustativo, potenciando las cualidades sensoriales del sabor asociado a la estimulación y/o modificando su valor hedónico. En contra de esta hipótesis hay varios indicios que desarrollamos a continuación:

En primer lugar, los datos aportados por autores como Yamamoto y colaboradores, así parecen corroborarlo. En efecto, la administración intraoral de estímulos enormemente preferidos por los animales como la sacarosa, sacarina o policosa generan inmunorreactividad en algunos otros subnúcleos parabraquiales laterales como el dorsal, y solo en menor grado en el NPBl (Yamamoto et al., 1994; Yamamoto & Sawa, 2000a; 2000b). Mas aún, si se compara la activación celular provocada por administración intraoral de sacarosa –que generó inmunorreactividad C-Fos a distintos niveles del eje rostral/caudal de la zona PBl y dorsal-, con la provocada por un estímulo gustativo carente de calorías como es la sacarina –y que solo generó inmunorreactividad en la región PBl dorsal-, podemos deducir que el marcaje del Núcleo PBl se podría deber mas bien al efecto visceral postingestivo de la sacarosa que a su valor como estímulo gustativo (Yamamoto & Sawa, 2000b).

DISCUSIÓN FINAL

Por otro lado, y como se pudo ver en el experimento 4 de esta Tesis, con lesiones del NPBl, los animales siguen mostrando preferencia por el sabor asociado a la infusión intragástrica de productos predigeridos cuando se intercala un tiempo extra de demora, es decir, cuando se lleva a cabo un aprendizaje de tipo secuencial que también requiere de un sistema gustativo intacto. Esto, por otra parte también demuestra que no se ha visto afectada su capacidad para realizar discriminaciones gusto-olfatorias como consecuencia de la lesión, y viene a sumar otro dato en contra de la actuación sobre un mecanismo gustativo.

Existe una posibilidad, que no es incompatible con la primera de las hipótesis propuestas, de que la Estimulación Eléctrica del NPBl haya podido actuar sobre un mecanismo opiáceo relacionado con la ingesta. En efecto, estas sustancias actúan, al parecer, potenciando la ‘palatabilidad’ –el valor hedónico- de los alimentos haciéndolos especialmente atractivos o apetitosos para el paladar (Le Magnen, et al., 1980; Le Magnen, 1990; 1992; 1999; Gosnell et al., 1990; Gosnell & Levine, 1996; Evans & Vacarino, 1990; Vacarino, 1996; Cooper & Higgs, 1994; Koch & Bodnar, 1994; Bodnar, 1996; Drewnowski, et al., 1992; Drewnowsky, 1998; Levine & Billington, 1997; Mercer & Holder, 1997), como se ha demostrado en el relevo inmediatamente anterior al NPBl, el NTS (Giraud et al., 1998; Li et al., 2003). Además, algunos autores, en relación con diferentes investigaciones llevadas a cabo bajo estados de privación/ saciedad, han señalado que este valor hedónico de los ‘sabores’ de los alimentos –o sea, el valor afectivo del estímulo gustativo en sí-, podría verse potenciado en la medida en que es asociado con la eliminación de estados de desequilibrio metabólico tras la ingesta (Le Magnen, 1992; Carr, 1996; Nencini, 1996; Zhang et al., 1998; Carr, 2002).

En efecto, en esta región parabraquial lateral externa se han encontrado cantidades notables de receptores μ y κ (Mansour et al., 1988; 1994; 1995; Lynch, 1986) así como fibras aferentes y eferentes inmunorreactivas a neuropéptidos opiáceos, -encefalinas, fundamentalmente- (Maley & Panneton, 1988; Chamberlin et al., 1999; Engström et al., 2001). En relación con ello, Carr y colaboradores, han puesto de manifiesto que la administración de antagonistas opiáceos en esta zona parabraquial lateral elevó el umbral para la ingesta inducida por Estimulación Eléctrica del Hipotálamo lateral (Carr et al., 1991), y que la restricción crónica de alimento modificó la actividad de los receptores μ y κ del NPBl y NPBlme (Wolinsky et al., 1996). Asimismo estos autores han demostrado que la restricción crónica de alimento reduce o elimina el control inhibitorio que los opiáceos

endógenos ejercen normalmente -o sea, en estado de actividad basal- sobre neuronas presentes en regiones anatómicamente conectadas con el NPBl como son el NLET y NCeA (Carr et al., 1998). A su vez se ha descubierto que la activación de los dos tipos de receptores opiáceos, μ y κ , presentes en la región parabraquial tiene efectos diferentes sobre la ingesta de soluciones apetitosas –sacarina-, a saber, de estimulación/ inhibición, respectivamente, aunque no se conocen las posibles interacciones entre ambos de cara a la generación de preferencias/aversiones (Moufid-Bellancourt et al., 1996).

Por tanto, y de acuerdo con los estudios del grupo de Carr, anteriormente citados, así como con los datos neuroanatómicos disponibles sobre la presencia de receptores opiáceos en el extremo ventrolateral del N. Parabraquial y los resultados que muestran la existencia en esta zona de cierto grado de convergencia de información gustativa y visceral (Halsell & Travers, 1997; Baird et al., 2001; Karimnamazi et al., 2002), se puede plantear la hipótesis de que la estimulación eléctrica de esta región parabraquial lateral externa ha podido reproducir la actividad de los péptidos opiáceos que están fisiológicamente activos en esta zona durante la conducta ingestiva y actúan modificando la palatabilidad. Los resultados del capítulo 3 de esta Tesis, en los que la lesión del NPBl eliminó la preferencia por el estímulo gustativo asociado a la infusión intragástrica concurrente de nutrientes en condiciones fisiológicas, también son compatibles con esta hipótesis.

Además, hay que señalar que, aunque en ninguno de los experimentos realizados por nosotros se establecía un procedimiento de restricción crónica de alimento, ya que los animales contaban con 15 gramos de comida diaria, esto no invalida los datos mencionados, ya que, según las investigaciones citadas (Carr & Papadouka, 1994; Wolinsky et al., 1996; Carr, 2002) el estado de privación no tendría otro efecto que incrementar las preferencias hacia una gama mas amplia de nutrientes –no solo los apetitosos- (Carr, 1996; Zhang et al., 1998).

Por otra parte, estos resultados de preferencias / aversiones obtenidos en nuestro laboratorio utilizando las mismas coordenadas de localización del electrodo (Capítulo 2 de esta Tesis), también podrían ser compatibles con los efectos estimuladores / inhibidores resultantes de la activación química diferencial de los distintos receptores opiáceos (Moufid-Bellancourt et al., 1996).

DISCUSIÓN FINAL

El hecho de que la Estimulación eléctrica del NPBe actúe modificando la conducta del individuo al generar preferencias / aversiones por los sabores con que es asociada (capítulos 1 y 2 de esta Tesis), nos lleva a plantear si este efecto estaría relacionado con una modulación del valor afectivo del estímulo al que sustituye y/o si actúa como incentivo guiando la conducta posterior y favoreciendo el aprendizaje. Aunque los mecanismos neurales responsables de la motivación y el refuerzo han sido estudiados últimamente en el contexto de la drogadicción, los resultados de las distintas investigaciones se han basado sobre todo en el estudio de procesos regulatorios naturales tales como la comida o la regulación de fluidos (Wise & Rompré, 1989; White & Milner, 1992; Nader et al., 1997; Schultz, 1997; 2002; Robbins & Everitt, 1999; Rolls, 2000; Berridge & Robinson, 1998; Robinson & Berridge, 2002; Wise, 2002; Carr, 2002; Saper et al., 2002).

Así, algunos autores, como por ejemplo Berridge y colaboradores, disocian entre los sistemas responsables del efecto hedónico y otros encargados de la atribución de 'saliencia' o valoración de incentivo, según los cuales un estímulo inicialmente neutro que es asociado o seguido por consecuencias positivas, se convierte en 'atractivo', se le presta atención y el sujeto se compromete en su búsqueda (Berridge & Robinson, 1998; Kelley & Berridge, 2002). Tras examinar los efectos de lesiones en la vía mesolímbica, estos autores proponen que los circuitos neurales implicados en ambos procesos, es decir, en el procesamiento del 'impacto hedónico' y la atribución de 'saliencia de incentivo', estarían fuertemente interrelacionados aunque no serían idénticos (Berridge & Robinson, 1998). Además éstos y otros autores consideran que ambos procesos estarían mediados por distintos neurotransmisores, a saber, opiáceos y dopamina, respectivamente (Treit & Berridge, 1990; Agmo et al., 1995; Peciña & Berridge, 2000; Berridge & Robinson, 1998; McFarland & Ettenberg, 1998; 1999; Kelley & Berridge, 2002).

Sin embargo, otros investigadores proponen que un único mecanismo podría ser responsable del efecto reforzante y del aprendizaje de incentivo en la medida en que la señal inicial -el correlato neural- del refuerzo ante un estímulo innatamente preferido (reforzador primario), que podría ser un aumento en la liberación de dopamina en el N. Accumbens (sistema mesolímbico), va siendo transferida a ECs que permiten hacer predicciones acerca de la aparición del evento reforzante, primero próximos y después cada vez mas alejados, los cuales, en virtud de un proceso de condicionamiento pavloviano, se convertirían ellos mismos en

reforzadores secundarios o condicionados, los cuales permiten establecer y consolidar hábitos de conducta (Wise, 2002; Schultz, 2002).

Nuestros datos podrían ser compatibles con los que implican al NPBe, como mínimo, en el *procesamiento afectivo-emocional* de eventos reforzantes/aversivos: Así, ya se ha visto que ésta es una zona de relevo de la vía Espino-(Trigémico)-Parabraquial, relacionada no tanto con el procesamiento sensorial del dolor, sino más bien de su componente afectivo (Bernard et al., 1991, 1994; 1995; Bester et al., 1995; 1997; Saper, 1995a; Jasmin et al., 1997; Craig & Dostrovsky, 1999). Por otro lado, diversas manipulaciones farmacológicas, como la infusión intraparábraquial de benzodiazepinas, estimulan la ingesta modulando la palatabilidad de los alimentos, es decir afectando a la valoración hedónico-afectiva que los sujetos hacen de estos estímulos gustativos –medida mediante el Test de Reactividad Gustativa ideado por Norgren- (Söderpalm & Berridge, 2000), y, por otra parte, las lesiones y el bloqueo de los receptores opiáceos del extremo ventrolateral del N. Parabraquial, eliminan las preferencias de los sujetos hacia productos apetitosos (Edwards & Ritter, 1989; Moufid-Bellancourt et al., 1996).

Por tanto, es posible que la estimulación eléctrica del NPBe haya podido activar neuronas responsables del procesamiento apetitivo –hedónico- del estímulo sensorial/gustativo o visceral. Nuevos resultados obtenidos en nuestro laboratorio mediante la técnica de condicionamiento espacial concurrente vienen a apoyar esta idea e implican a los receptores opiáceos de esta zona en el ‘impacto reforzante’ de la estimulación, pues los animales dejaron de mostrar preferencias por el lugar asociado a la estimulación eléctrica del NPBe tras la administración de naloxona cuando se les entrenaba en un nuevo corredor, pero no ocurría este efecto si habían tenido un aprendizaje previo de asociación de esta estimulación eléctrica del NPBe con claves ambientales en el mismo laberinto, que seguían recordando como ‘preferido’ (García-Pérez et al., en preparación).

Por otro lado, es posible que la estimulación eléctrica del NPBe haya podido activar alternativa o simultáneamente, mecanismos neurales relacionados con el ‘*aprendizaje de incentivo*’, haciendo que los estímulos gustativos (en los experimentos 1 y 2) o las claves ambientales (en los experimentos 5 y 6) asociadas a la estimulación eléctrica del NPBe resulten especialmente ‘atractivas’ o ‘salientes’ para los sujetos y actúen guiando las preferencias futuras. Menor es la evidencia en este sentido, aunque nuestros datos podrían estar relacionados con los del grupo de

DISCUSIÓN FINAL

Van der Kooy, quienes encuentran que la estimulación química del N. Parabraquial, mediante la inyección de morfina, actúa como estímulo discriminativo, favoreciendo el aprendizaje de una asociación gustativo-visceral (Jaeger & Van der Kooy, 1993; 1996).

Algunos investigadores consideran que la ‘adquisición de motivación de incentivo’, supone un proceso más complejo que el condicionamiento por el cual un animal, en base a la experiencia previa, ante una determinada señal espera la aparición de un evento reforzante y establece una correlación entre ambos eventos. Para estos autores, este aprendizaje más complejo implicaría la adquisición de una representación cognitiva del valor del estímulo y de su relación con las diferentes posibilidades de respuesta, requiriendo, por tanto, un conocimiento explícito acerca de estas opciones de respuesta y sus consecuencias (Dickinson & Balleine, 1994 –citado por Berridge & Robinson, 1998). Igualmente, Ikemoto y Panksepp defienden que el sistema Mesoaccumbens es un sistema de ‘búsqueda’ en el sentido de que permite a los animales aprender a predecir la percepción de estímulos incondicionados apetitivos/aversivos y hacer que puedan anticiparse a ellos (Ikemoto & Panksepp, 1999). Según estos últimos autores, el papel de la liberación de dopamina en el Accumbens tiene que ver con la facilitación de respuestas de aproximación ‘flexibles’ en presencia de estímulos atractivos o ‘salientes’ (Ikemoto & Panksepp, 1999).

Estas hipótesis teóricas no han sido contrastadas experimentalmente en la presente Tesis, pues hasta el momento, los resultados obtenidos en los distintos experimentos han sido evaluados en condiciones experimentales similares a aquellas en las que tuvo lugar el aprendizaje, y por lo tanto valorados en un contexto teórico de aprendizaje implícito. Aún así, no se puede descartar el que se haya podido producir un aprendizaje declarativo –explícito-, por el cual los animales habrían aprendido flexiblemente a usar y/o transferir información acerca de los sabores / claves ambientales presentados para dirigir su conducta. Por otro lado, no se han descrito en la bibliografía disponible al respecto, conexiones directas entre el área parabraquial y el sistema dopaminérgico mesolímbico, pero resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio muestran que la Estimulación Eléctrica del NPBL induce expresión de C-Fos en el N. Accumbens- Shell (Ver Anexo I a esta Tesis), una zona especialmente implicada en procesamiento del refuerzo y/o motivación de incentivo (Di Chiara, 1998; Berridge & Robinson, 1998; Ikemoto & Panksepp, 1999; Koob & Le Moal, 2001). Finalmente, y como ya se ha mencionado, datos

preliminares obtenidos en nuestro laboratorio han permitido dissociar entre motivación y refuerzo, pues la administración de naloxona no eliminó la motivación de los animales a permanecer en el lugar que previamente había sido asociado a estimulación eléctrica del NPBl pero sí bloqueaba la adquisición de preferencias en un nuevo corredor (García-Pérez et al., en preparación).

En suma, nuestros datos apoyan la hipótesis de que el NPBl estaría involucrado en el procesamiento de información afectivo-hedónica positiva y negativa, ya que la activación de este núcleo mediante estimulación eléctrica induce preferencias/aversiones por los estímulos asociados. Sin embargo, no está tan clara su implicación en aprendizaje de incentivo, por lo que se requieren nuevas investigaciones para determinar exactamente cual es el papel y la aportación de esta estructura en el(los) circuito(s) neural(es) anteriormente mencionado(s) de motivación de incentivo y refuerzo así como sobre la posible interrelación entre ellos.

Hasta ahora hemos señalado que la estimulación eléctrica del NPBl puede haber actuado como sustituto del estímulo sensorial/gustativo y/o visceral. Otra posibilidad apunta a que podría haber actuado activando mecanismos generales de refuerzo. Sin embargo, esta última opción resulta difícil sustentar teniendo en cuenta, en primer lugar, los resultados negativos de autoestimulación observados reiteradamente en los experimentos 1, 5, y 7 de esta Tesis. De hecho, los animales parabraquiales no soportan los estímulos eléctricos con intensidades que se aproximan a los que son habituales en la estimulación de otras zonas cerebrales como, por ejemplo, en el Hipotálamo Lateral.

En efecto, aunque algunos investigadores han demostrado que el área parabraquial podría poseer los mecanismos neurales para generar esta conducta, la región clave parece estar lejos de nuestro objeto de estudio –el NPBl–, situándose en el tercio medio de la subdivisión medial, en posición ventral al Pedúnculo Cerebeloso Superior (Ferssiwi et al., 1987; Arvanitogiannis, et al., 1997). Por el contrario, se ha comprobado que las lesiones del extremo ventrolateral de esta región parabraquial apenas tienen efecto sobre la conducta autoestimuladora generada por activación de fibras del Haz Prosencefálico Medial (Waraczynsky & Shizgal, 1995).

Se podría argumentar que la ausencia de resultados positivos de AEIC en el NPBl podría deberse a la proximidad de una vía de procesamiento de dolor, el haz

DISCUSIÓN FINAL

espinoparabraquial (Bernard et al., 1991; 1994; 1995; Bester et al., 1995; 1997; Saper, 1995a; Jasmin et al., 1997; Craig & Dostrovsky, 1999), cuya activación podría haber sido concomitante a la estimulación eléctrica del substrato reforzante de esta zona. Pero al menos en las manipulaciones experimentales llevadas a cabo por nosotros para maximizar el efecto positivo de la estimulación, reduciendo al máximo su área de influencia y evitando, por lo tanto, entrar en una zona aversiva, no hemos podido conseguir que los animales adquieran la conducta autoestimuladora (experimento 7). No obstante, este argumento puede no ser totalmente concluyente y existir alguna otra posibilidad de observar conducta autoestimuladora en este subnúcleo. Pero éste no ha sido el caso, al menos en esta Tesis Doctoral así como en otros trabajos experimentales en curso (García-Pérez, en preparación)

Algunos autores han logrado disociar, mediante estudios realizados con microsensores de voltametría, el efecto sobre la liberación de dopamina, de la Estimulación Eléctrica administrada por el experimentador frente al provocado por AEIC del ATV/ Sustancia Negra, al comprobar que en el primer caso apenas se produjo liberación de DA en el N. Accumbens, a diferencia del amplio registro obtenido tras la conducta operante (Garris et al., 1999). Siguiendo esta misma línea argumental, investigaciones previas llevadas a cabo en nuestro laboratorio, han encontrado que la estimulación eléctrica de la Corteza Insular, una estructura anatómicamente interconectada con el NPB, genera preferencias por los estímulos gustativos asociados pero resultaron igualmente infructuosos los intentos para inducir conducta de autoestimulación en estos mismos animales (Cubero & Puerto, 2000a).

Finalmente, al revisar las diferentes investigaciones realizadas utilizando técnicas inmunohistoquímicas, y en las que se evalúa el marcaje de células activadas por AEIC del Hipotálamo lateral, se ha comprobado una amplia activación de estructuras cerebrales: En efecto, los estudios muestran que el número de regiones activadas es extenso, tanto en el prosencéfalo (Tubérculo Olfatorio, Corteza Prefrontal, Septum, N. Accumbens, Caudado-Putamen, Complejo Amigdalino, NLET, SI...) como en regiones diencefálicas (APO medial y lateral, N. Paraventricular; N. Arqueado, Hipotálamo Lateral y Dorsomedial...) y en el Tronco Cerebral (Área Tegmental Ventral, Sustancia Gris Central, y Colículo Superior, NTPP con marcaje moderado, pero intenso en el Locus Coeruleus y N. del Rafe; el marcaje en el N. Parabraquial fue escaso y difuminado sin que pudiesen apreciarse diferencias en función de los distintos subnúcleos) [(Arvanitogiannis et al., 1997; Flores et al., 1997; Hunt & McGregor, 1998)].

Estudios preliminares resultantes de la estimulación eléctrica del NPBe (Ver Anexo I) han permitido constatar que este patrón es parcialmente coincidente con los datos mencionados anteriormente, con respecto a la AEIC. En nuestro caso, se ha observado activación contralateral de toda la zona Parabraquial Lateral, Sustancia Gris Central en su parte dorsal, área dorsomedial y paraventricular hipotalámica, y Tálamo Medial, BNST y SI y una zona restringida de la amígdala medial, así como N. Accumbens Shell, Corteza Prefrontal Medial, Prelímbica, Infralímbica e Insular (Anexo I). Se puede comprobar que aunque muchas de estas regiones son coincidentes, en otras y tras la AEIC del HTL se ven algunas zonas activas como el Septum, Habénula, Área Preóptica lateral e Hipotálamo Lateral, y Área Tegmental Ventral, que no lo están tras Estimulación Eléctrica administrada independientemente de la conducta operante, en esta misma zona hipotalámica (Hunt & McGregor, 1998), en coincidencia con nuestros resultados respecto al NPBe. Además, en nuestro caso, tampoco se encontró marcaje en zonas como el Caudado-Putamen, NTPP, Locus Coeruleus y N. del Rafe. Alternativamente, la estimulación eléctrica del NPBe produjo activación en el Tálamo Medial y en las Cortezas Prelímbica, Infralímbica e Insular que no aparecen tras AEIC del Hipotálamo Lateral (Anexo I).

Existe también la posibilidad de que las regiones parabraquiales activadas por la inducción de preferencias gustativas y espaciales generadas en los distintos experimentos de esta Tesis, puedan estar relacionadas con la activación de vías nerviosas de refuerzo sobre las que pueden actuar algunas sustancias psicoactivas, en particular las relacionadas con el sistema opiáceo, teniendo en cuenta la presencia en esta zona de neuronas inmunorreactivas a encefalinas y receptores μ y κ , ya mencionadas anteriormente (Mansour et al., 1988; 1994; 1995; Lynch, 1986; Maley & Panneton, 1988; Ding et al., 1996; Chamberlin et al., 1999; Engström et al., 2001).

En efecto, los estudios llevados a cabo por Van der Kooy y colaboradores han implicado a esta región en la mediación de los efectos aversivos de la morfina, que –según los autores– podría tener un origen periférico, pues las lesiones del extremo ventrolateral del N. Parabraquial eliminan el condicionamiento aversivo gustativo inducido por morfina sin afectar al generado por la administración de CILi (Bechara et al., 1993; Nader et al., 1997). Estos investigadores han observado asimismo, que tal estructura puede resultar clave en la mediación de las propiedades discriminativas de esta sustancia facilitando el aprendizaje de asociaciones, dado que las inyecciones

DISCUSIÓN FINAL

intraparabraquiales de morfina facilitaron el aprendizaje de una asociación gustativo-visceral en donde la ingesta de sacarina era asociada consistentemente con la administración de CILi (Jaeger & Van der Kooy, 1993; 1996; Nader et al., 1997), pero, sin embargo, no han podido demostrar la participación del N. Parabraquial lateral en los aspectos reforzantes de la morfina en paradigmas de condicionamiento a señales exteroceptivas o interoceptivas. En cambio, si obtuvieron efectos reforzantes en el ATV, pues la inyección local de esta sustancia generó preferencia por el sabor y el lugar con que fue asociada pero no demostró capacidad para actuar como estímulo discriminativo.

No obstante, la discrepancia entre estos resultados y nuestros datos podrían explicarse por diferencias metodológicas, ya que estos autores no manipulan específicamente la variable temporal. En este sentido, dado que en nuestros experimentos la Estimulación Eléctrica es concurrente a la presentación del estímulo gustativo/ambiental, podría especularse que la activación del NPBlé habría activado algún sistema neurobiológico reforzante en el que la contigüidad temporal fuese decisiva, como trataremos en un apartado posterior.

Por otra parte, es un hecho bien conocido la participación de los sistemas opiáceos en el alivio del dolor. En este sentido, Le Magnen propuso que ‘refuerzo’ y ‘modulación del dolor’ podrían ser mediados por substratos neurales, al menos parcialmente coincidentes (Le Magnen et al., 1980; Le Magnen, 1992).

Así, algunos autores han comprobado que el área parabraquial es capaz de desempeñar un papel modulador, provocando la inhibición de las respuestas neuronales evocadas por estímulos nocivos localizados a nivel cutáneo y/o profundo, (Chen Yu Chiang, et al., 1995). En efecto, como ya se ha señalado con anterioridad, parte de la información visceral que recibe el N. Parabraquial es de carácter nociceptivo, formando parte del sistema Espino-(Trigémico)-Parabraquio-Hipotalámico y Espino-(Trigémico)-Parabraquio-Amigdaloides. Estas señales sensoriales tienen su origen en las astas dorsales medulares (Láminas I y II, principalmente) y proyecta hacia estructuras mesencefálicas y diencefálicas (Bernard et al., 1991; Light et al., 1993; Bernard et al., 1994; Bester et al., 1995; Saper, 1995a; Craig & Dostrovsky, 1999).

Se podría pensar que la estimulación eléctrica del NPBlé ha podido activar, de algún modo, un mecanismo de analgesia opiácea. Así, nuestros datos serían

compatibles con los de otros experimentos en los que la administración de morfina, además de generar Aprendizaje Aversivo Gustativo, tras su asociación con un estímulo gustativo en un paradigma no demorado, fue capaz de inducir analgesia, un efecto que desaparecía al introducir un intervalo temporal de seis horas (Bardo & Valone, 1994).

En este sentido, se puede señalar que numerosos hallazgos recientes vienen a sugerir, que en diferentes tipos de refuerzo –nutritivo, inducido por sustancias de abuso o por estimulación- podría ser activado un mismo substrato neuroanatómico (Nader & Van der Kooy, 1994; Nader et al., 1997; Berman et al., 1994; Wolinsky et al., 1994; 1996; Ikemoto & Panksepp, 1999; Di Chiara, 1999; Spanagel & Weiss, 1999; Wise, 1998; 2000; 2002; Wywell & Berridge, 2001; Kelley & Berridge, 2002).

Concretamente, en una de estas series experimentales mencionadas se ha observado que los animales muestran patrones comportamentales similares ante los efectos reforzantes de la comida y los opiáceos. En un paradigma de condicionamiento al lugar, lesiones del N. Tegmental Pedúnculo-Pontino (NTPP) eliminaron la preferencia de los individuos por el lugar asociado a la consecución de comida/morfina, pero solamente en condiciones de equilibrio homeostático (Bechara & Van der Kooy, 1992a), lo que ha permitido establecer una disociación en función del estado de privación. Por otro lado, las consecuencias reforzantes de la comida en animales privados fueron sustituidas por las derivadas de la administración de morfina, involucrando al sistema dopaminérgico Mesolímbico (Nader & Van der Kooy, 1994; Nader et al., 1997), lo cual, -una vez mas-, ha permitido establecer diferencias en función del estado de ‘equilibrio’/’desequilibrio’ homeostático.

Igualmente y como ya se ha señalado, la restricción crónica de comida genera alteraciones en los niveles de receptores opiáceos de determinadas regiones cerebrales (Wolinsky et al., 1994). En el Área Parabraquial se observó un descenso de los receptores μ en los núcleos PBle y Pbme, así como un incremento de receptores κ en el NPBle (Wolinsky et al., 1996) Estos resultados concuerdan con datos preliminares obtenidos en nuestro laboratorio, en los que la privación de alimento aumentó el valor reforzante de la estimulación.

El descubrimiento de preferencias / aversiones inducidas por Estimulación Eléctrica del NPBle ha sido obtenido en un paradigma de Aprendizaje Asociativo en el que determinados estímulos gustativos (capítulos 1, 2 y 6) o determinados índices

DISCUSIÓN FINAL

del entorno (capítulos 4, 5 y 6) son asociados de manera consistente con la activación de esta zona parabraquial, siempre en contigüidad temporal (Capítulos 1 y 2) o, lo que es lo mismo, según un aprendizaje concurrente (Capítulos 4, 5 y 6). De hecho, esta es una de las modalidades de que disponen los organismos para aprender a predecir y responder ante eventos importantes presentes en su ambiente, y por otro lado, es la manera en que los estímulos novedosos se convierten en reforzadores reales (Rescorla, 1988 –citado por Zigmond, 1999-; Robinson & Berridge, 1998; Dayan & Balleine, 2002).

En la actualidad, se tiene el convencimiento de que existen ciertas predisposiciones biológicas que favorecen la asociación de ciertos estímulos con determinadas consecuencias, sobretodo si son esenciales para la supervivencia, en contraste con la idea inicial de equipotencialidad estimular para todo aprendizaje. En este sentido, se ha propuesto que la evolución habría favorecido la aparición de dos subsistemas defensivos relativamente independientes: uno relacionado con los mecanismos generales de afrontamiento por medio de los cuales los vertebrados hacen frente a los retos del medio externo, para alcanzar sus objetivos en el espacio y el tiempo, y otro perteneciente al sistema regulatorio interno, según el cual los estímulos son valorados en función de su capacidad para mantener el equilibrio homeostático. En función del primero, los animales tienden a asociar selectivamente estímulos nociceptivos con señales externas, mientras que el segundo facilitaría el establecimiento de asociaciones viscerogustativas (García et al., 1985; Rescorla, 1988 –citado por Zigmond, 1999-; Bures et al., 1998; Welzl et al., 2001).

Existe un amplio cuerpo de investigación que apoya la participación del Complejo Parabraquial en la inducción de Aprendizaje Interoceptivo de tipo negativo (Norgren & Leonard, 1971; Fulwiler & Saper, 1984; Herman & Rogers, 1985; Di Lorenzo, 1988; Yamamoto, 1993; Bielavsca & Bures, 1994; Sakai & Yamamoto, 1997; 1998; Reilly, 1999; Agüero et al., 1993 a; 1993b; Mediavilla et al., 2000; 2001b), aunque nuevos datos implican también a esta zona en la adquisición de Preferencias Gustativas (Reilly & Trifunovic, 2000b; Capítulo 3 de esta Tesis).

Ahora bien, en los primeros experimentos de esta Tesis (Capítulos 1, 2 y 3), la presentación del estímulo gustativo asociado a la estimulación eléctrica siempre tenía lugar en la misma posición, –orificio izquierdo o derecho de la jaula-, lo cual significa una misma organización espacial y también una misma reacción motora por parte de los animales, todo lo cual hace que no se pueda descartar que el aprendizaje

se haya podido establecer en base a claves propioceptivas y/o espaciales además de las propiamente gustativas. A todo ello hay que añadir el hecho de que los animales también son capaces de asociar la estimulación eléctrica con unas determinadas claves del entorno, como se demuestra en los siguientes capítulos con tareas de condicionamiento espacial (Capítulos 4 y 5 de esta tesis). Por otro lado, la mencionada vía de procesamiento de información nociceptiva a través del subnúcleo NPble –Vía Espino(Trigémico)Pontoamigdaloides- (Bernard et al., 1991; 1994; 1995; Bester et al., 1995; 1997; Saper, 1995a; Jasmin et al., 1997; Buritova et al., 1998; Craig & Dostrovsky, 1999), convierte a esta región, en posible candidata a participar en aprendizajes que impliquen estímulos exteroceptivos en asociación con señales nociceptivas.

Los resultados del capítulo 6 de esta Tesis han pretendido examinar esta cuestión. Así, en el experimento 8 se ha utilizado un procedimiento en el que se balanceaba la posición de las buretas, el cual permite anular e impedir la participación de las señales propioceptivas y espaciales, para, de este modo, evitar que éstas puedan ser utilizadas en el aprendizaje. En estas condiciones, sin embargo, los animales fueron todavía capaces de aprender la asociación sabor-estimulación eléctrica del NPble solo en base a señales gustativas, aunque necesitaron un mayor número de ensayos de aprendizaje.

Otra cuestión relevante es la relacionada con la modalidad de aprendizaje utilizada por los animales en este proceso y a través de la cual se adquieren y establecen las preferencias y aversiones. Investigaciones previas llevadas a cabo en nuestro laboratorio mediante el paradigma de Aprendizaje Aversivo Gustativo han permitido disociar dos modalidades dentro de este aprendizaje, denominadas ‘concurrente’ y ‘secuencial’, con características funcionales y anatómicas diferentes y que involucran a distintos subnúcleos dentro del complejo parabraquial así como diferentes redes de estructuras interconectadas (Gallo et al., 1988; 1990; 1991; Arnedo et al., 1990; 1991; 1993; Agüero et al., 1993a; 1993b; 1997; Mediavilla et al., 2000; 2001a; Cubero & Puerto, 2000b; Cubero et al., 2001).

En la primera modalidad de aprendizaje –es decir, en el concurrente-, los animales adquieren la capacidad para discriminar rápidamente la presencia de productos nocivos administrados en el tracto gastrointestinal, e implica la participación de una serie de estructuras situadas a lo largo del eje gástrico-vagal-NTS-NPBm-NPble, siendo un aprendizaje eficaz pero rígido, de tipo implícito

DISCUSIÓN FINAL

(Arnedo et al., 1990; 1991; 1993; Agüero, 1997; Mediavilla et al., 2000; 2001a). La segunda modalidad de aprendizaje, –demorado-, está considerado como un aprendizaje flexible o explícito, y por ello, permite intercalar largos intervalos temporales entre los estímulos, al tiempo que requiere de la integridad de una vía humoral con relevos en el AP-NTS-NPBl (Gallo et al., 1991; Agüero & Puerto, 1991; Agüero et al., 1993a; 1993b; Mediavilla et al., 2000; 2001a).

Desde esta perspectiva y al examinar los datos obtenidos, comparándolos con los anteriormente citados, se pone de manifiesto que la adquisición de preferencias y aversiones gustativas inducida por la estimulación eléctrica del NPBl, se ajusta en gran medida a la modalidad implícita y a los modelos de contigüidad estimular (Capítulos 1, 2, 3 y 6). De hecho, las lesiones electrolíticas de esta zona PBl bloquearon la adquisición de preferencias (experimento 3) y aversiones (Mediavilla et al., 2000) al sabor en tareas concurrentes / implícitas con demandas temporales muy exigentes, pero no tuvieron efecto en aprendizajes secuenciales cuando se intercalaban demoras de 15 minutos (experimento 4; Mediavilla et al., 2000).

Por otro lado, la estimulación eléctrica administrada por el experimentador en contigüidad temporal y concurrentemente a la estancia del animal en uno de los dos compartimentos del laberinto -en corredor- generó preferencias/aversiones por las claves ambientales espaciales/del entorno presentes en ese compartimento de manera consistente (Capítulos 4, 5 y 6 de esta Tesis), resultado que es compatible con el de otros autores que encuentran que los animales son capaces de adquirir un condicionamiento espacial hacia el compartimento asociado con la ingesta/infusión intragástrica de sucrosa en un paradigma de contigüidad, pero no tras la inclusión de un intervalo de 15 minutos (Arnould & Agmo, 1999). Teniendo en cuenta todos estos resultados, podemos proponer que nuestros datos apoyan la participación del NPBl en una modalidad de aprendizaje ‘a corto plazo’ en el que intervienen mecanismos de detección rápida, que permitan la coincidencia temporal de ambos estímulos.

En la actualidad está ampliamente reconocida y aceptada la existencia de múltiples sistemas de memoria que pueden ser disociados en función de diversos criterios, que actúan en paralelo e involucran a distintos mecanismos cerebrales (Zigmond et al., 1999; Kandel et al., 2000; Eichenbaum, 2002). Así, se ha distinguido entre Memoria Declarativa y No Declarativa (o Implícita) no solo en términos de la anatomía implicada, sino también en base a características operacionales, al tipo de información procesada y al propósito de cada uno de estos

sistemas (Squire, 1992; Squire et al., 1993; Reber et al., 1996; Packard & McGaugh, 1996; Eichenbaum, 2002).

En líneas generales, la primera se refiere a la adquisición de información sobre hechos objetivos o acontecimientos conscientes relacionados con la vida de un individuo mientras que la segunda incluye habilidades motoras y perceptuales, aprendizaje asociativo, habituación y sensibilización (Bachevalier & Mishkin, 1984; Reber et al., 1996; Eichenbaum, 2002). Pero aunque la ‘consciencia’ es importante al hablar de mecanismos de memoria declarativa en humanos, tiene poca utilidad cuando nos referimos a los estudios realizados con animales, y entonces, es importante destacar una segunda característica como es su ‘flexibilidad’, o capacidad para transferir la información adquirida a un contexto nuevo, diferente de las situación en que tuvo lugar el aprendizaje (Reber et al., 1996; Eichenbaum, 2002).

Las investigaciones llevadas a cabo tanto en sujetos humanos como con animales muestran que un mismo tipo de material puede ser procesado y adquirido utilizando diferentes modalidades adquisitivas, cada una de las cuales puede ser relevante en función del tipo de ejecución requerida en las pruebas de aprendizaje (Bechara et al., 1995; Packard y McGaugh, 1996; Reber et al., 1996; Kandel et al., 2000; Eichenbaum, 2002). Por ejemplo, se ha sugerido que el Condicionamiento Pavloviano, involucra la participación de tres mecanismos básicos que funcionan en paralelo: un sistema sensoriomotor que refleja la asociación entre la información sensorial y la ejecución de la respuesta; un sistema afectivo, determinado por las propiedades hedónicas de los estímulos implicados en la situación de aprendizaje, y un mecanismo cognitivo que elabora una representación mental del episodio de condicionamiento, aunque los dos primeros serían suficientes para la expresión del aprendizaje (Stanton, 2000).

Cabría plantearse, entonces, si las preferencias/ aversiones manifestadas por nuestros animales en un contexto de aprendizaje asociativo reflejan la posibilidad de transferencia del conocimiento y/o suponen la elaboración de una representación mental que guíe el comportamiento –aprendizaje explícito-. En este sentido, y por el momento, la respuesta debe ser negativa, dado que el paradigma experimental usado tanto en los experimentos en los que se utilizan claves gustativas (Capítulos 1, 2, 3 y 6) como ambientales (Capítulos 4, 5 y 6), implica que los animales son evaluados en un contexto similar a donde tuvo lugar el aprendizaje, aunque esto no nos permite descartar en sentido estricto que los animales no puedan aprender mediante un

DISCUSIÓN FINAL

mecanismo explícito. Sin embargo, la introducción de demoras elimina el efecto (experimento 4), a lo que debemos añadir nuevos datos obtenidos en nuestro laboratorio apuntan a que el aprendizaje desaparece cuando en la fase de 'test' se invierte la situación estimular, es decir, cuando se requiere un comportamiento flexible/ explícito (García-Pérez, et al., en preparación)

En este sentido, algunos autores sugieren que la capacidad de un reforzador para guiar la conducta actuando como incentivo requiere flexibilidad, y por tanto, la participación de mecanismos explícitos de memoria (Berridge & Robinson, 1998; Ikemoto & Panksepp, 1999). Así pues, la posibilidad esbozada anteriormente, por la cual involucrábamos al NPBe en el procesamiento del valor hedónico de los estímulos o en los mecanismos implicados en la motivación de incentivo, parece descartarse, de acuerdo con la opinión de estos últimos autores a favor de un proceso adquisitivo de carácter implícito. En cualquier caso, y por el momento, es difícil establecer una conclusión definitiva y no puede excluirse que los animales puedan transferir el conocimiento adquirido de una manera explícita.

Finalmente, y en relación a la localización anatómica de la zona estimulada, el examen histológico de la posición y dimensiones de los electrodos utilizados en nuestros experimentos no excluye inicialmente la posibilidad de haber activado al Núcleo Tegmental Pedúnculo-Pontino (NTPP), una formación heterogénea compuesta por dos poblaciones neuronales, unas colinérgicas de tamaño grande y otras mas pequeñas no colinérgicas, todas ellas en posición inmediatamente anterior al NPB, aunque algo mas medial –como se puede observar en las figuras 51-52 y 81-82 del Atlas Estereotáxico de Paxinos & Watson, 1990- (Rugg et al., 1992; Dunbar et al., 1992).

La mención de esta problemática en este contexto viene justificada por el hecho de que este núcleo ha sido implicado de forma consistente en procesos de refuerzo/recompensa. Por ejemplo se ha investigado su participación en el refuerzo de tipo nutritivo (Trojnar & Staszewska, 1995). Concretamente en un experimento en el que la ingesta, inducida por estimulación del ATV y seguida por lesiones del NTPP, provocó en unos casos deterioro y en otros facilitación de la conducta. Los resultados fueron interpretados en el sentido de que la destrucción del NTPP interrumpe un circuito a través del cual la conducta nutritiva inicia la activación del sistema dopaminérgico mesolímbico, dadas sus conexiones con el Área Tegmental Ventral.

Igualmente, Yeomans y colaboradores (Proudfit & Yeomans, 1995), han puesto de relieve la existencia de neuronas encefalinérgicas en el Núcleo Tegmental Pontino dorsolateral, que intervengan las astas dorsales y que podrían mediar gran parte de los efectos antinociceptivos producidos por la Estimulación Eléctrica de la Sustancia Gris Periacueductal y Médula Ventrolateral. En concreto, la estimulación eléctrica de esta zona pontina produjo analgesia, que pudo ser reducida por inyecciones de naltrexona, pero no invertida, posiblemente porque existen neuronas noradrenérgicas en A7 que proyectan a la médula y estarían implicadas en la nocicepción.

En otros casos, las lesiones del NTPP bloquearon el refuerzo inducido por morfina, anfetaminas o comida en paradigmas de condicionamiento al lugar (Bechara & Van der Kooy, 1989; 1992 a; 1992b; Bechara et al., 1992; Olmstead & Franklin, 1993; 1994; Nader et al., 1997; Bechara et al., 1998). Concretamente, Van der Kooy y colaboradores sugieren que este núcleo podría formar parte de un mecanismo de refuerzo que operaría en paralelo respecto a otros y en el que la influencia del desequilibrio homeostático es mínima e irrelevante para la conducta, pues sus lesiones solo eliminan el aprendizaje en las condiciones experimentales en las que no hay déficit, o sea en sujetos no adictos y saciados. Teniendo en cuenta que en los experimentos de estos autores, las lesiones mas efectivas afectaron a las células no colinérgicas situadas en posición ventral y medial, por razones anatómicas los resultados obtenidos por nosotros no pueden ser explicados en el mismo sentido que estas investigaciones.

Por último, conviene mencionar que algunos autores han logrado AEIC en los grupos celulares Ch5 y Ch6 de esta formación pedúnculo-pontina, los cuales conectan a su vez con neuronas de la Sustancia Negra/ATV (Yeomans et al., 1993). Pero una vez mas los datos negativos obtenidos en los ensayos de AEIC de los animales parabraquiales nos llevan a descartar la posibilidad de que estemos tratando un mismo fenómeno comportamental.

Aunque sería necesario realizar nuevos estudios que permitan definir con la máxima precisión, la localización del electrodo en la dimensión rostro-caudal del NPB, para determinar si de alguna manera se ha podido activar colateralmente algunas células del NTPP situadas en una dimensión inmediatamente anterior, los datos preliminares obtenidos mediante C-Fos, que producen un marcaje en la zona

DISCUSIÓN FINAL

Parabraquial Contralateral, y por otra parte, la ausencia de células activas en esta región pedúnculo-pontina (Anexo II), supone una prueba mas para descartar que los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral puedan ser debidos a la estimulación de esta zona pedunculopontina.

En resumen, se puede concluir que la Estimulación Eléctrica del NPBe genera individualmente preferencias o aversiones por los estímulos con que es asociada, tanto en modelos de aprendizaje gustativo como espacial. Aunque la naturaleza de las reacciones fisiológicas desencadenadas por la activación de esta zona aún es desconocida, se puede proponer que podría tratarse de una potenciación de las propiedades hedónicas del estímulo sensorial, a consecuencia de la actuación sobre mecanismos de procesamiento de información nutritiva, probablemente a través de la activación de sistemas opiáceos. El efecto de la estimulación eléctrica básicamente consiste en la generación de reacciones hedónicas, aunque no se puede descartar, por el momento, una actuación que modifique el valor de incentivo - 'saliencia'- de este tipo de estimulación frente a todas las demás claves presentes en el contexto. Estos resultados han sido obtenidos mediante un modelo de aprendizaje Implícito en el procesamiento sensorial ha de ser rápido, para permitir una mayor coincidencia temporal en la asociación estimular establecida, aunque tampoco se puede descartar definitivamente la posibilidad de que los animales puedan utilizar la información adquirida de manera flexible. Estas investigaciones han sido corroboradas mediante estudios en los que utilizando técnicas lesivas en la zona parabraquial lateral externa se han disociado e interrumpido el aprendizaje concurrente/ implícito pero no el secuencial/ explícito.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1- La Estimulación Eléctrica del NPBe induce preferencias o aversiones selectivas hacia los estímulos gustativos y espaciales con que es asociada.
- 2- La región anatómica activada por los electrodos implantados estereotáxicamente estaría situada en el subnúcleo Parabraquial Lateral Externo del Tronco Cerebral.
- 3- Este efecto es consistente para cada sujeto experimental independientemente de las características de los estímulos gustativos y de la reorganización espacial impuesta a los animales.
- 4- Lesiones electrolíticas del subnúcleo PBe impiden el establecimiento de preferencias gustativas inducidas por la infusión intragástrica de productos naturales reforzantes –alimentos predigeridos- en tareas de Aprendizaje Concurrente/ Implícito.
- 5- Por el contrario, estas mismas lesiones no interfieren en el Aprendizaje Discriminativo Secuencial/ Explícito inducido por la administración enteral de estos productos nutrientes reforzantes.
- 6- Los animales con electrodos implantados en el NPBe, no pueden sustentar una conducta operante con el objeto de inducirse autoestimulación eléctrica cerebral reforzante.
- 7- Esta ausencia de autoestimulación eléctrica reforzante no puede ser atribuida al carácter aversivo asociado a la intensidad de la corriente, puesto que manipulaciones en el parámetro de frecuencia, con el objetivo de mantener estable el radio de acción de la estimulación, tampoco permiten generar una conducta de autoestimulación.
- 8- Los animales con electrodos implantados en el Hipotálamo Lateral, por su parte, si pueden adquirir esta conducta operante de autoestimulación cerebral reforzante, al tiempo que muestran preferencia por los índices espaciales con que es asociada la estimulación eléctrica administrada.

CONCLUSIONES

- 9- Los animales estimulados eléctricamente en el NPBe, muestran también preferencia hacia índices gustativos, independientemente de la posición en que son presentados, es decir, del componente espacial, pero en este caso requieren de un mayor número de ensayos de aprendizaje.

- 10- La inducción de conducta de preferencias o aversiones generadas por la estimulación eléctrica del NPBe se ha logrado en esta Tesis Doctoral a través de pruebas comportamentales pertenecientes a la modalidad 'no demorada', característica de los Aprendizajes Implícitos. Sin embargo, este hecho no excluye la posibilidad de que este comportamiento también pueda generarse según procedimientos explícitos.

ANEXO I

**EXPRESION DE INMUNORREACTIVIDAD AL C-FOS TRAS
ESTIMULACION ELECTRICA REFORZANTE DEL NUCLEO
PARABRAQUIAL LATERAL EXTERNO**

INTRODUCCION

Como ya se ha señalado en esta Tesis, el Area Parabraquial es un complejo neuronal que rodea al Pedúnculo Cerebeloso Superior (PCS) a lo largo del puente, y queda dividido por esta estructura en dos partes: medial y lateral. La región 'lateral' se inicia rostralmente con un grupo de células pequeñas y diseminadas, dorsales al PCS y ventrales al núcleo Cuneiforme, que se abren hacia los bordes en el punto en el que el Acueducto de Silvio se ensancha para formar el IV Ventrículo (Fulwiler & Saper, 1984; Moga et al., 1990; Herbert & Bellintani-Guardia, 1995). Junto a éstas, la extensión ventrolateral conocida como "Núcleo de Kolliker" también se considera parte integrante de tal estructura (Figs. 1 y 2 de la Introducción de esta Tesis).

El Subnúcleo Parabraquial Lateral Externo ocupa la posición mas lateral de este Complejo, rodeando dorsolateralmente al Pedúnculo Cerebeloso Superior, casi en el punto en que esta estructura hace contacto con la superficie dorsal del puente (Fulwiler & Saper, 1984; Moga et al., 1990). Aunque no todos los autores estan de acuerdo respecto a su organización neuroanatómica, algunos investigadores (Herbert & Bellintani-Guardia, 1995) han considerado recientemente la existencia de tres subregiones: A) Una porción Externa y B) otra interna, orientadas en paralelo respecto al Pedunculo Cerebeloso superior y formadas por dos tipos de células: 1.- Neuronas cuyas dendritas se extienden en posición dorsomedial-ventrolateral respetando los límites de este subnúcleo, aunque las ramas mas distales excedan estos límites para hacer contacto con otros subnúcleos adyacentes localizados en posición dorsal o ventrolateral, y 2.- un segundo tipo de células cuya arborización dendrítica se extiende en la misma dirección pero es mas reducida circunscribiendose a los límites del subnucleo PBI externo. Finalmente, C) una tercera división la constituye la porción Ventral del NPBI externo cuyas neuronas extienden sus ramificaciones perpendicularmente a las anteriores, contactando medialmente con el NPBme, lateralmente con el NPB lateral 'crescent', y extendiendose ventralmente hacia el Núcleo de Kolliker (Herbert & Bellintani-Guardia, 1995).

Se trata de una zona de finalización de haces nerviosos procedentes del Núcleo del Tracto Solitario caudal (Fulwiler & Saper, 1984; Hermann & Rogers, 1985; Herbert et al., 1990; Kobashi et al., 1993; Jia et al., 1994; Saper, 1995b) y el área Postrema (Herbert et al., 1990; Papas & Ferguson, 1990; Lança & Van der Kooy, 1985; Yamamoto et al., 1992; Saper, 1995b), que transmiten información visceral-vagal y humoral, respectivamente (Lança y Van der Kooy, 1985; Herbert et

ANEXO I

al., 1990; Yuan & Barber, 1991; Yamamoto et al., 1992; Saleh & Cechetto, 1993; Gieroba & Blessing, 1994), aunque recientemente se ha descubierto que puede ser incluso una zona de convergencia de información oral, la cual sería procesada en paralelo con respecto a las anteriores (Karimnamazi et al., 2002).

Distintos autores han señalado que, en general, estas aferencias viscerales son procesadas y enviadas hacia estructuras rostrales haciendo sus primeros relevos en el NPBL externo y otros subnúcleos (PBL central), para establecer conexiones con el Hipotálamo Anterior, Tálamo Ventral Postero-medial, Núcleo Central de la Amígdala y Núcleo Lecho de la Estría Terminal dorsal (Fulwiler & Saper, 1984; Halsell, 1992). Por otro lado las fibras que parten del NPBL externo (parte interna) y NPBL dorsal hacia porciones caudales hipotalámicas, porción capsular de la amígdala (CeLC) y NLET lateral forman parte del Fascículo Espino(Trigémico)-Ponto-Amigdaloides, encargado de transmitir información nociceptiva (Bernard et al., 1991; Bernard et al., 1993; Alden et al., 1994; Bester et al., 1995; Gauriau & Bernard, 2002).

Los resultados obtenidos en los distintos experimentos de esta Tesis han implicado a esta zona PBL en la adquisición de Preferencias Gustativas y Espaciales tras un proceso de aprendizaje asociativo entre determinadas claves gustativas o ambientales y la activación de las neuronas de esta región mediante Estimulación Eléctrica intracerebral (Capítulos I, II, IV, V y VI). Estos resultados están en concordancia con las investigaciones realizadas por diferentes autores con diversos procedimientos de investigación, y así, por ejemplo, se ha logrado implicar a esta estructura en procesos motivacionales de carácter apetitivo (Edwards & Ritter, 1989; Calingasan & Ritter, 1993; Hoebel, 1997; Reilly et al., 1993; Reilly & Trifunovic, 2000a; 2000b; Yamamoto & Sawa, 2000a, 2000b; Li & Rowland, 1993; 1995; Li et al., 1994; Carr et al., 1991; Bechara et al., 1993; Jaeger & Van der Kooy, 1993; 1996; Wolinsky et al., 1996). Esta participación en procesos reforzantes se ha observado también a través de la inyección intragástrica de productos fisiológicos –alimentos predigeridos- administrados en contigüidad temporal respecto al estímulo gustativo (Capítulo III).

Por otra parte, nuestros resultados han permitido establecer, al menos desde el punto de vista conductual, una disociación entre los efectos motivacionales positivos generados tras la Estimulación Eléctrica del NPBL y el refuerzo inducido por la Autoestimulación Intracerebral del Hipotálamo Lateral (Capítulo V). Este hecho

plantea una importante disyuntiva, a saber, si nuestro efecto reforzante se debe a la activación de un substrato neuroanatómico diferente, o, por el contrario, podría compartir conexiones comunes con respecto al bien establecido circuito de recompensa cerebral que está a la base de la AEIC del hipotálamo lateral (Routtenberg, 1976; Wise & Rompré, 1989; Gallistel et al., 1996; Kandel, et al., 2000).

Por otra parte, se ha podido observar que la Estimulación Eléctrica de esta zona Pble también puede generar reacciones motivacionales aversivas (Capítulos II, IV, V y VI), en consonancia con investigaciones previas llevadas a cabo en este y otros laboratorios (Agüero et al., 1993a; 1993b; Mediavilla, 1995; Yamamoto, 1993). De hecho, esta zona Pble puede ser activada por la administración de diversos productos aversivos -CILI, CINA- sustancias eméticas, drogas de abuso y tratamientos generadores de malestar (Hochstenbach et al., 1993; Yamamoto et al., 1992; 1994; Kobashi et al., 1993; Gu et al., 1993; Sakai & Yamamoto, 1997).

En este contexto, la investigación en el campo de la Neurobiología Molecular ha proporcionado nuevas técnicas que permiten identificar y trazar redes –o sistemas- neurales que pueden ser activados funcionalmente. Así, diferentes autores han demostrado que la actividad neuronal puede conducir a la expresión de proteínas procedentes de la activación de determinados genes (denominados protooncogenes) que a su vez modifican la actividad de otros genes. Algunos de los mas estudiados han sido los protooncogenes c-fos y c-jun, los cuales a su vez pueden ser utilizados como marcadores metabólicos de alta resolución para trazar sistemas polisinápticos en el SNC (Curran & Morgan, 1986; Morgan et al., 1987; Sagar et al., 1988; Morgan & Curran, 1989; 1991; Dragunow & Faull, 1989; Herrera & Robertson, 1996; Tischmeyer & Grimm, 1999; Nestler, 2001).

Esto es, las técnicas inmunohistoquímicas consistentes en la utilización de anticuerpos dirigidos contra estas proteínas expresadas por protooncogenes (Curran & Morgan, 1986; Morgan et al., 1987; Sagar et al., 1988; Morgan & Curran, 1989; 1991), están siendo muy utilizadas en la actualidad para explorar diversas redes anatómicas que pueden ser activadas por diferentes estímulos y procedimientos de entrenamiento conductual, actividad motora, estados de estrés, etc. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la expresión de c-fos, junto con otros factores de transcripción génica, constituyen un eslabón en la cadena de eventos metabólicos producidos por la actividad neuronal, que tiene lugar durante el proceso de

ANEXO I

aprendizaje y conduce a la formación de trazos de memoria (Herrera & Robertson, 1996; Tischmeyer & Grimm, 1999).

Es un hecho bien establecido que la Estimulación Eléctrica intracerebral provoca la despolarización de un grupo de neuronas situadas alrededor del extremo del electrodo, a lo largo de un radio que es proporcional a la intensidad de la corriente utilizada (Yeomans, 1990). Así, una señal externa a las células, desencadena una cascada de actividad neuronal que podría quedar marcada y trazada a través de esta técnica. De hecho, este procedimiento ha resultado útil para estudiar los sistemas que sustentan la conducta de autoestimulación (Arvanitogiannis et al., 1997; 2000; Flores et al., 1997; Hunt & McGregor, 1998; Nakahara et al., 2001) y podría servir, igualmente, para estudiar las estructuras neuroanatómicas implicadas en el efecto reforzante de la estimulación eléctrica del NPBe.

Por tanto, el objetivo de este estudio preliminar ha sido identificar las regiones cerebrales implicadas en el efecto reforzante provocado por la estimulación eléctrica del NPBe. Posteriormente, nuestros resultados serían comparados con los obtenidos por otros autores en las distintas modalidades de refuerzo. Así, la pretensión final es dilucidar la existencia de mecanismos comunes o de circuitos independientes para cada modalidad de refuerzo, o en su defecto, la posibilidad de mecanismos comunes junto a otros exclusivos de cada sistema de recompensa.

METODO

Se utilizaron como sujetos experimentales 16 animales procedentes del experimento 8 –capítulo VI de esta Tesis-, de los cuales, 7 formaban parte del grupo positivo, 3 del negativo y los 6 restantes pertenecían al grupo que se había mostrado indiferente ante la estimulación eléctrica del NPBe. Estos 6 últimos fueron utilizados como grupo de ‘control sin estimulación’.

Todos los animales experimentales fueron sometidos a una sesión de 45 minutos de Estimulación Eléctrica del NPBe, cuya intensidad y frecuencia fue idéntica a la utilizada para cada individuo en el experimento 8, y recogida en la tabla de datos correspondiente a este capítulo. El procedimiento experimental fue llevado a cabo para todos los animales en sus jaulas respectivas, donde disponían de comida y agua ‘ad libitum’ y bajo condiciones estándar de luz, temperatura, humedad, y ruido ambiental, similares a las descritas en los experimentos realizados previamente. Por

su parte, los animales del grupo 'control sin estimulación' disponían de los conectores de corriente durante 45 minutos pero no se les pasó estimulación alguna.

Transcurridos 90 minutos después de la finalización de la estimulación, cada animal era pesado, anestesiado con Pentobarbital Sódico y perfundido mediante la infusión intracardial de 300 ml. de PBS seguidos por otros 300 ml. de Paraformaldehído diluido en PBS al 4%. Los cerebros, seguidamente fueron extraídos, conservados durante 24 horas en Paraformaldehído y procesados para Inmunohistoquímica.

Seguidamente se procedió a la laminación de los cerebros en secciones de 50 micras de grosor en la dimensión rostro-caudal a lo largo de todo el cerebro, mediante un vibrotomo (752M Vibroslice, Campden Instruments), eligiendo solo las alternas, que fueron conservadas en PBS.

Estas secciones fueron introducidas en PBS e incubadas durante 20 minutos en una mezcla de metanol absoluto y H₂O₂ al 3% con el propósito de inhibir las Peroxidasas endógenas. A continuación fueron lavadas varias veces en esta solución tamponada e incubadas durante una hora en una mezcla de gelatina al 1% y 'normal goat serum' al 3%, diluidos en PBS. Después se transfirieron a una solución que contenía el primer anticuerpo disuelto en PBS a una concentración de 0,005 gr./ml. ('Polyclonal Rabbit IgG antibody', 1:20.000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California), el cual es capaz de reconocer los fragmentos 3-16 de la proteína Fos. Transcurridas 48 horas de incubación a una temperatura de 4°C, las secciones fueron enjuagadas y procesadas utilizando el método ABC (Vector Laboratories, Burlingame, California): Según este procedimiento, las secciones eran transferidas a una solución que contenía en segundo anticuerpo 'Biotinylated Goat Antirabbit' e incubadas durante una hora, para ser aclaradas posteriormente y sometidas a un proceso de revelado mediante Diaminobenzidina intensificada con Sulfato de Níquel, que produjo un marcaje de color marrón oscuro/ negro para los núcleos que mostraron inmunorreactividad al c-Fos.

Finalizado el proceso, todas las secciones fueron mantenidas durante un tiempo mínimo de 24 horas en PBS, aclaradas, montadas en portaobjetos, cubiertas y pegadas mediante DPX (DPX Mountant for Histology. Fluka. Sigma).

ANEXO I

Durante todo este proceso, y dado que algunas secciones sufrieron daños importantes y otras se perdieron, no pudo obtenerse un número de láminas suficiente y equivalente para cada una de las zonas cerebrales donde se hallaron estructuras marcadas por el anticuerpo, lo que impidió que el resultado final pudiese ser cuantificado para ser analizado estadísticamente. Por ello aquí solo se presenta una descripción preliminar cualitativa de los resultados obtenidos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Tras la estimulación eléctrica del NPBlc, se obtuvo un patrón de actividad C-Fos entre moderado y bajo a lo largo de varias estructuras relacionadas anatómicamente con el NPBlc:

Tronco Cerebral:

- Área Parabraquial: En primer lugar se obtuvo un marcaje distribuído a lo largo de toda la zona Parabraquial lateral del lado contralateral al lugar de la Estimulación Eléctrica, algo mas intenso en el extremo ventrolateral, que incluiría células del NPBlc, NPBlc y NPBl 'crescent' (Microfotografía 1). Esta observación resulta compatible con los datos anatómicos relativos a esta zona, que incluyen fibras que conectan con el NPBl del lado contralateral (Fulwiler & Saper, 1984; Moga et al., 1990; Herbert & Bellintani-Guardia, 1995).

Diencéfalo:

- Tálamo: Con respecto al Tálamo, se han identificado células marcadas en los núcleos mediales, y concretamente en una zona que se corresponde con los núcleos DorsoMedial y Centromediano, principalmente (Microfotografías 2.1 y 2.2). Estudios anatómicos previos han demostrado la existencia de conexiones de esta zona PBlc con estructuras talámicas, formando parte, probablemente de un sistema sensorial ascendente que conectaría con áreas corticales y límbicas, pero cuyas funciones concretas no son bien conocidas, aunque quizás representen un sistema a través del cual la información sensorial influye sobre las funciones cerebrales de orden superior (Saleh & Cechetto, 1993; Reilly, 1999; Krout & Loewy, 2000).

- Hipotálamo: La mayoría de las fibras parabraquiales eferentes que alcanzan el Hipotálamo, se originan en subnúcleos del complejo lateral –incluyendo el NPBl- y a su vez proyectan principalmente a la zona Paraventricular, así como en menor grado a las áreas Preóptica Medial e Hipotalámica Lateral hacia donde van la mayoría de los axones de células presentes en el NPBl (Fulwiler & Saper, 1984; Bernard et al., 1991; 1993; Krukoff et al., 1993; Alden et al., 1994; Halsell, 1992; Bester et al., 1997). Sin embargo, los resultados obtenidos ahora mediante C-Fos muestran un marcaje –aunque débil- localizado en el Hipotálamo Dorsomedial (Microfotografía 3), una zona cuyas conexiones con el NPBl lateral son mas difusas (Fulwiler & Saper, 1984; Bernard et al., 1991; 1993; Krukoff et al., 1993; Alden et al., 1994; Bester et al., 1997). Este Núcleo Dorsomedial hipotalámico formaría parte de una columna de células hipotalámicas periventriculares interconectadas entre sí y con otras partes del Diencefalo y Tronco Cerebral, que han sido relacionadas con el control visceromotor de la conducta (Thompson & Swanson, 2003).

Sistema Límbico:

- Núcleo Accumbens: En posición medial a la parte inferior del Ventrículo Lateral se ha localizado otra zona con inmunorreactividad al C-Fos y que se correspondería con la parte mas medial del N. Accumbens ‘shell’ (Microfotografía 4), una región que forma parte de la Vía Mesolímbica del refuerzo (Di Chiara, 1998; Koob & Le Moal, 2001). Esta zona también mantiene conexiones recíprocas con la Amígdala extendida (Koob, 1999; Berke & Hyman, 2000; Koob & Le Moal, 1997; 2001) y ha sido implicada en el procesamiento tanto de estímulos naturales como de drogas de abuso. En general, se ha sugerido que esta estructura podría actuar como mediadora entre las señales biológicas/ motivacionales y la conducta (Koob & Bloom, 1988; Koob, 1999; Tassin, 1998; Hyman & Malenka, 2001). Concretamente y en relación con la drogadicción, se ha propuesto que podría estar implicada en la generación de huellas de memoria, haciendo que el contexto en el que se ingieren estas sustancias se convierta en un factor clave para las recaídas (Sell et al., 1998; Wise, 2000; Hyman & Malenka, 2001). La activación de esta zona mediante C-Fos supone un dato novedoso a la hora de identificar las estructuras anatómicamente relacionadas con el Área Parabraquial, aunque, teniendo en cuenta las limitaciones de esta técnica, no puede establecerse con

ANEXO I

certeza si el marcaje es resultado de activación trans-sináptica de células nerviosas.

- Amígdala: Aunque, en general han sido pocas las células marcadas, se han encontrado zonas de inmunorreactividad en una zona importante por sus conexiones con el NPB, como es la Amígdala (Microfotografía 5) [Fulwiler & Saper, 1984; Bernard et al., 1991; Alden et al., 1994; Jia et al., 1994; De la Calle & Saper, 2000). En este caso, hemos observado células que expresan C-Fos en la parte mas medial de este núcleo, que se correspondería con las áreas mediales anterodorsal, posterodorsal y posteroventral (MePD, MeAD y MePV, según la terminología utilizada por Paxinos & Watson (1995). Esta zona es poco conocida anatómicamente en relación con las conexiones parabraquiales, ya que éstas últimas se centran en el Núcleo Central Amigdaloides, y a su vez han sido relacionadas funcionalmente con el procesamiento de estímulos nociceptivos (Bernard et al., 1991; De LaCalle & Saper, 2000).

Corteza Cerebral

- C. Insular: La Microfotografía 6 muestra cierto grado de actividad en una franja lateral de la Corteza Frontal, por encima de la Fisura Rinal correspondiente, al parecer, a la Corteza Insular, otra estructura anatómicamente conectada con el NPB y en la cual se ha localizado información visceral transmitida secuencialmente por el NTS, NPB y Tálamo ventrobasal, aunque también se han descrito conexiones recíprocas directas NPB-CI (Cechetto & Saper, 1987; Moga et al., 1990; Saper, 1995b; Zhang & Oppenheimer, 2000; De Lacalle & Saper, 2000). En este sentido, algunos autores han identificado en esa zona, grupos neuronales en los que se da cierto grado de convergencia de información gustativa y visceral (Hanamori et al., 1998; Yamamoto, 1998 –En Bures et al., 1998-), algo, por otra parte, similar a lo hallado en la zona parabraquial (Hermann & Rogers, 1985; Karimnamazi et al., 2002). Igualmente y desde el punto de vista comportamental, estudios previos realizados por nuestro Grupo de Investigación han relacionado a esta estructura -Corteza Insular- con procesos de aprendizaje interoceptivo tanto de carácter aversivo como reforzante (Cubero et al., 1995; Cubero & Puerto, 2000a) de manera análoga a los resultados obtenidos ahora en el Núcleo Parabraquial (Capítulo 2 de esta Tesis).

- Corteza Límbica: Finalmente, se han identificado células que expresan C-Fos en una banda situada a lo largo de la dimensión dorso-ventral de la Corteza Prefrontal Medial, incluyendo las áreas Prelímbica e Infralímbica, así como la Corteza Cingulada (Microfotografía 7). Esta última estructura ha sido relacionada con el procesamiento del aspecto emocional del dolor (Rainville, 2002).

Análisis Comparativo con la Conducta de Autoestimulación Intracerebral:

Se han revisado diferentes investigaciones realizadas mediante técnicas de inmunohistoquímica, en las que se evalúa el marcaje de células activadas por AEIC del Hipotálamo Lateral, y que coinciden en muchos aspectos con el patrón observado tras la Estimulación Eléctrica del NPBl, aunque en algunas regiones existen diferencias. Brevemente, y en el primer caso, los estudios mencionados muestran que el número de regiones activadas es muy extenso, tanto en el Prosencéfalo (Tubérculo Olfatorio, Corteza Prefrontal, Septum, N. Accumbens, Caudado-Putamen, Complejo Amigdalino, NLET, Sustancia Innombrada...) como en regiones diencefálicas (APO medial y lateral, N. Paraventricular, N. Arqueado, Hipotálamo Lateral y Dorsomedial,...); en el Tronco Cerebral (Área Tegmental Ventral, Sustancia Gris Central y Colículo Superior; NTPP con marcaje moderado, pero intenso en el Locus Coeruleus y N. del Rafe. El marcaje en el NPB fue escaso y difuminado sin que pudiesen apreciarse diferencias en función de los distintos subnúcleos). [Arvanitogiannis et al., 1997 ; Flores et al., 1997; Hunt & McGregor, 1998].

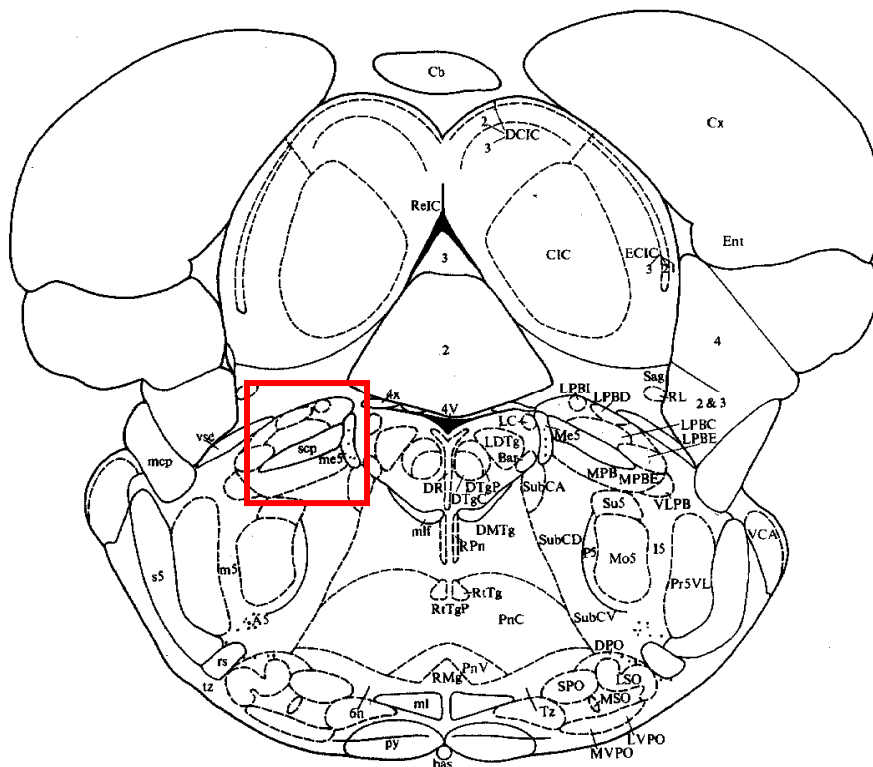
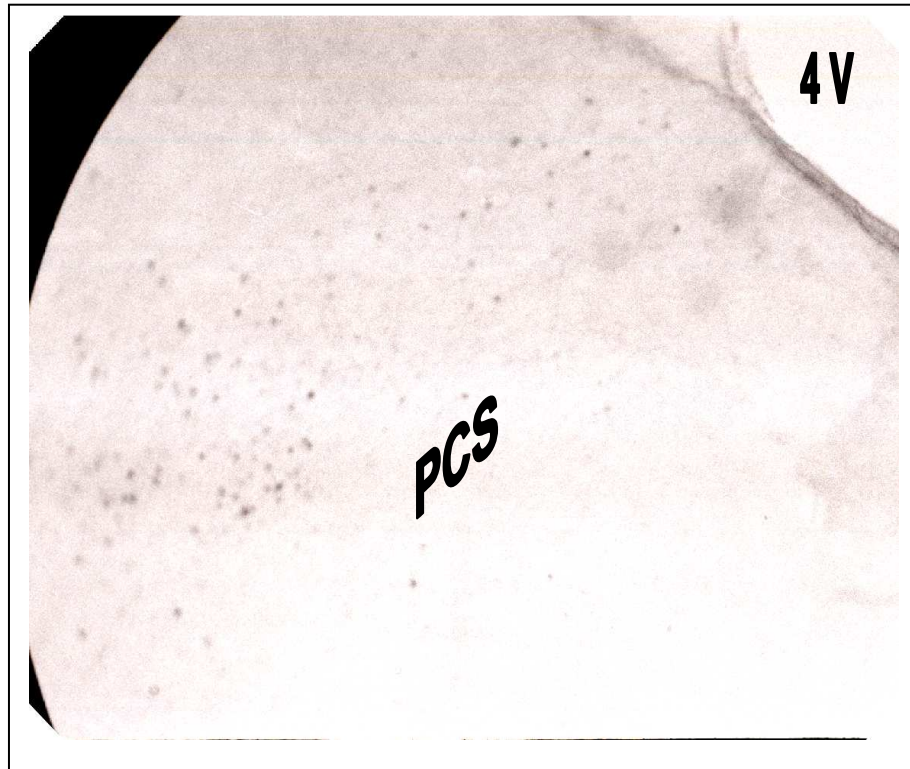
Este patrón es parcialmente coincidente con los datos preliminares incluidos en este Anexo y realizados con anticuerpos contra C-fos, tras estimulación eléctrica del NPBl. En este último caso, se observó activación contralateral de toda la zona Parabraquial Lateral, Sustancia Gris Central en su parte dorsal, área dorsomedial y paraventricular hipotalámica y Tálamo Medial, BNST y SI y una zona restringida de la Amígdala Medial, así como en el N. Accumbens 'shell', Corteza Prefrontal Medial, Prelímbica, Infralímbica e Insular. Se puede observar que, aunque hay muchas regiones coincidentes, tras la AEIC del HTL se ven algunas zonas activas como el Septum, Habénula, Área Preóptica Lateral e Hipotálamo Lateral y Área Tegmental Ventral, que no lo están tras la Estimulación Eléctrica no asociada a conducta operante, en esta misma zona (Hunt & McGregor, 1998), coincidiendo con nuestros resultados respecto al

ANEXO I

NPBle. Sin embargo, y a diferencia de estos últimos estudios citados, la estimulación parabraquial no generó marcaje en zonas como el Caudado-Putamen, NTPP, Locus Coeruleus y N. del Rafe, pero sí produjo activación en el Tálamo Medial y en las Cortezas Prelímbica, Infralímbica e Insular, que no aparecen tras la AEIC del Hipotálamo Lateral (Ver Figura 1, a continuación).

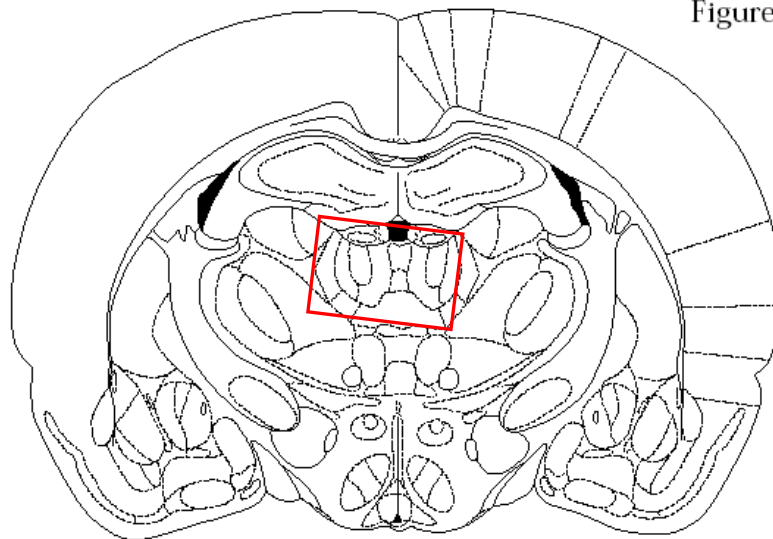
		Flores et al. (1997)	Arvanitogiannis et al. (1997)	Hunt & McGregor (1998)		Presente Estudio
		AEIC	AEIC	AEIC	E.E.	E.E.
CORTEZA	C. Orbital	---	---	●	●	---
	CPF medial	●	---	●	●	●
	T. Olfatorio	○	---	---	---	○
	C. Insular	---	---	---	---	●
S. LIMBICO	Septum lateral	●	---	●	●	---
	N. Acc. shell	●	---	●	●	●
	“ “ core	○	---	○	○	---
	C.-Putamen	●	---	○	○	---
	NLET	●	---	●	●	○
	Habénula Lateral	---	●	○	---	---
DIENCEFALO	Talamo PVP	---	●	---	---	---
	“ DM	---	---	---	---	●
	“ CM	---	---	---	---	●
	HTdorsomedial	●	●	●	---	●
	“ Ventromedial	---	○	○	○	---
	“ Paraventricul.	●	---	●	●	---
	“ Lateral	●	●	●	---	---
	“ Posterior	●	○	---	---	---
	A. Preopt. Medial	●	---	●	●	---
	“ “ Lateral	●	---	●	---	---
	N. Arqueado	---	●	---	---	---
	N. Supramamilar	---	●	---	---	---
	N. Tuberal Medial	---	●	---	---	---
MESENCEF.	A. T. Ventral	●	○	●	---	---
	N. Retrorrubral	---	○	○	---	---
	Colículo superior	---	○	---	---	○
	S. Gris Cental	---	○	---	---	○
	NTPP y NTLD	---	○	---	---	---
TRONCO C.	N. Parabraquial	---	○	---	---	●
	Núcleos del Rafe	---	○	---	---	○
	Locus Coeruleus	---	●	●	●	---
	NTS	---	○	---	---	---

Figura 1: Estudio comparativo de estructuras marcadas con C-Fos tras activación por AEIC y Estimulación Eléctrica (E.E.), según diferentes autores.



Microfotografía 1: Sección correspondiente al NPBE contralateral al hemisferio donde los animales recibieron estimulación eléctrica (x 100). En el dibujo de abajo se representa mediante un cuadrado la zona correspondiente a la fotografía (Figura 54 del Atlas de Paxinos & Watson). [PCS: Pedúnculo Cerebeloso Superior; 4 V: Cuarto Ventriculo].

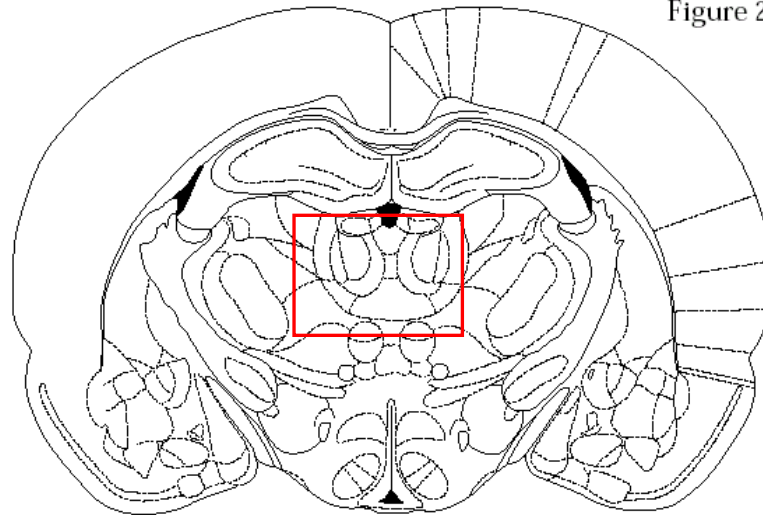
Figure 27



Interaural 6.70 mm

Bregma -2.30 mm

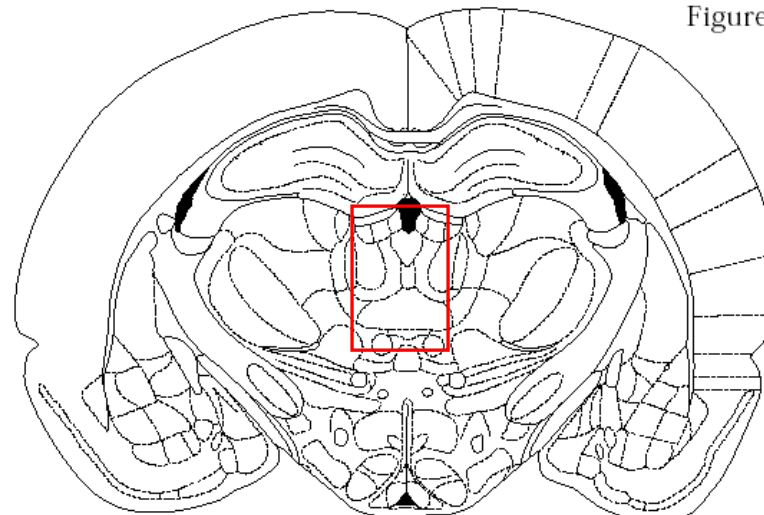
Figure 29



Interaural 6.20 mm

Bregma -2.80 mm

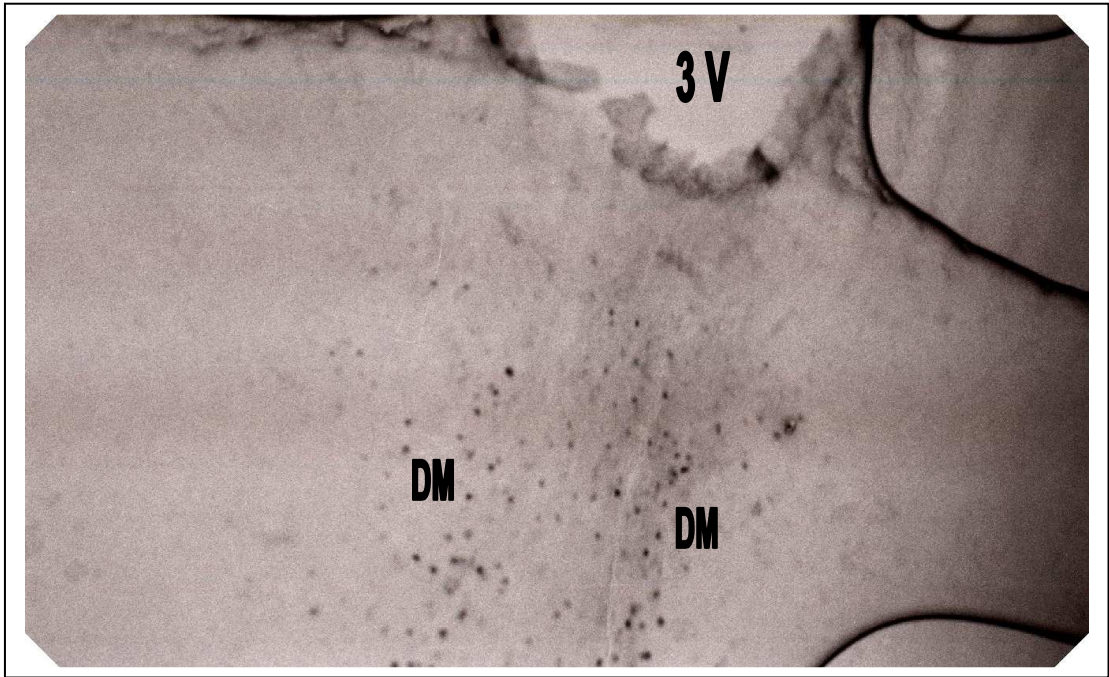
Figure 30



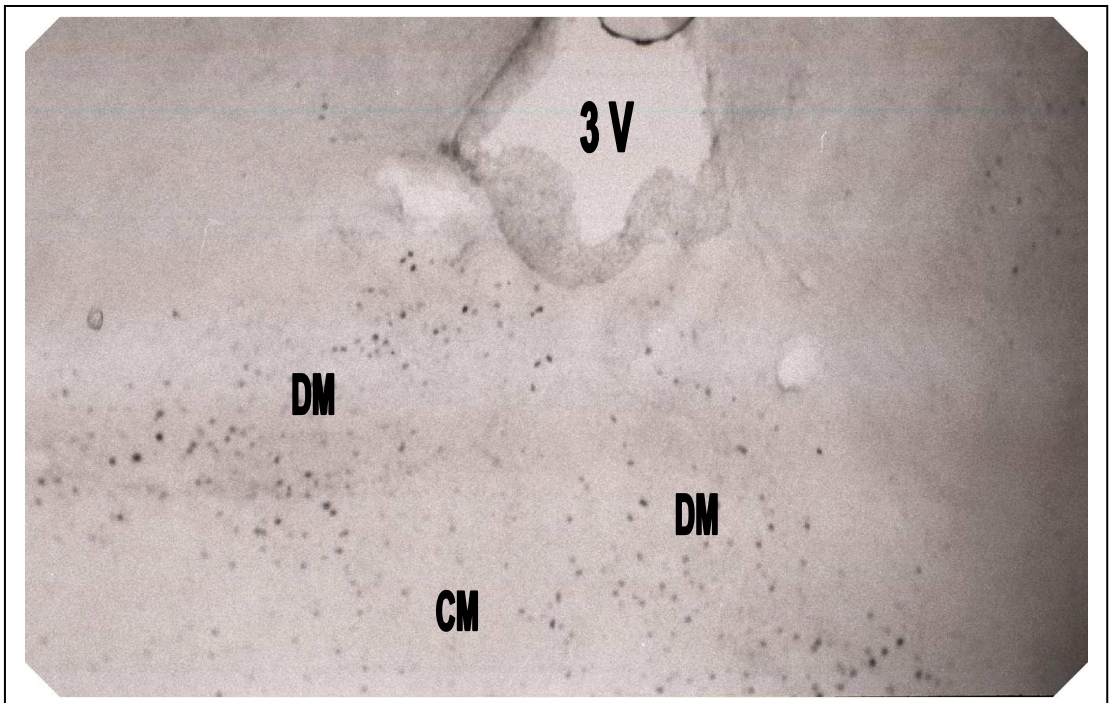
Interaural 5.86 mm

Bregma -3.14 mm

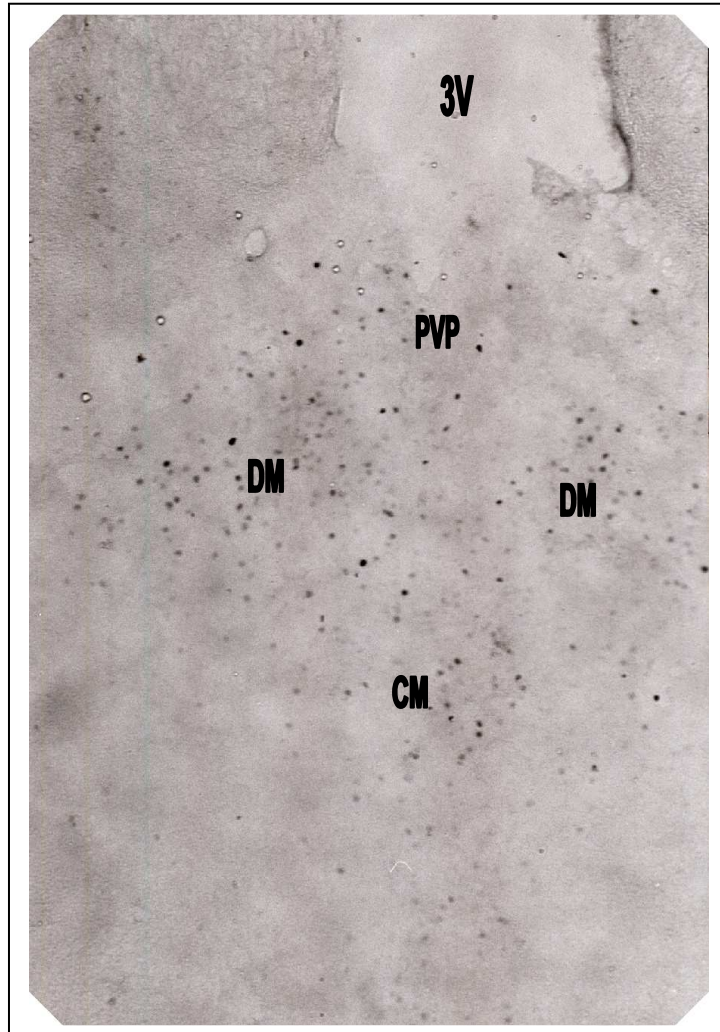
Secciones del Atlas de Paxinos & Watson correspondientes a las microfotografías 2(1), 2(2) y 2(3).



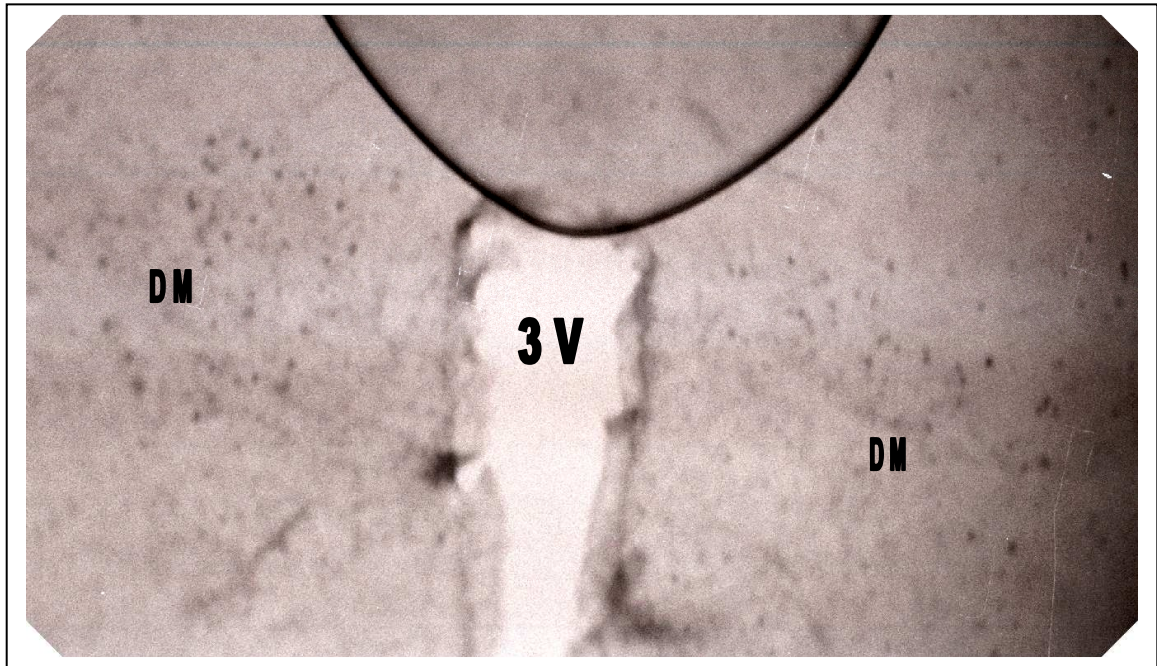
Microfotografía 2 (1): Distribución de inmunorreactividad al C-fos a lo largo del Tálamo Medial (x 100). Se corresponde aproximadamente con la figura 27 del Atlas de Paxinos & Watson (1996). [3V: tercer ventrículo; DM: Núcleo Dorsomedial del Tálamo].



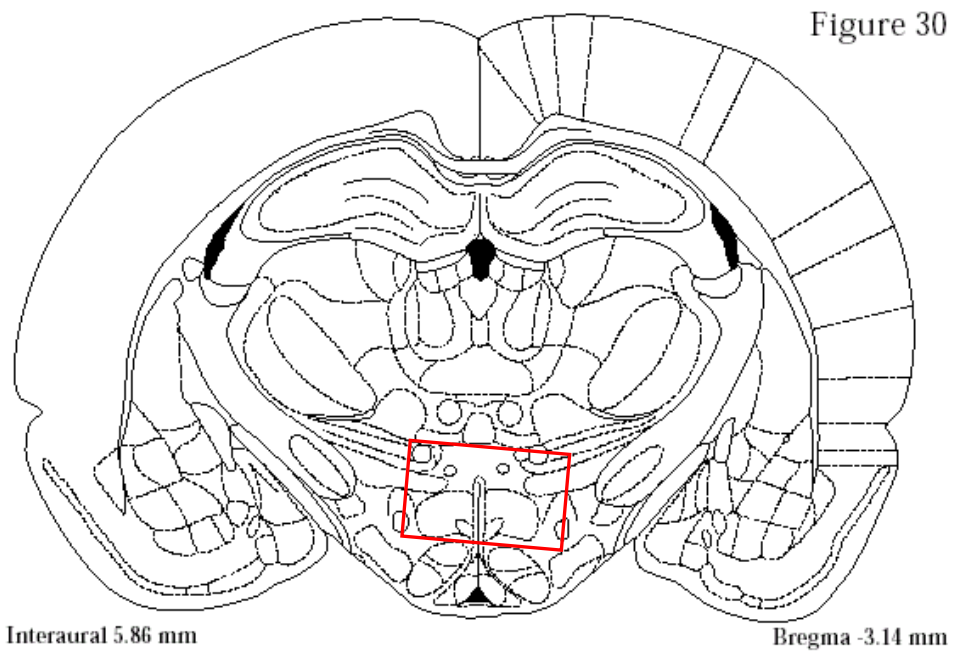
Microfotografía 2 (2): Distribución de inmunorreactividad al C-fos a lo largo del Tálamo Medial (x 100). Se corresponde aproximadamente con las figuras 29-30 del Atlas de Paxinos & Watson (1996). [3V: Tercer Ventrículo; DM: Núcleo Dorsomedial; CM: Núcleo Centromediano].

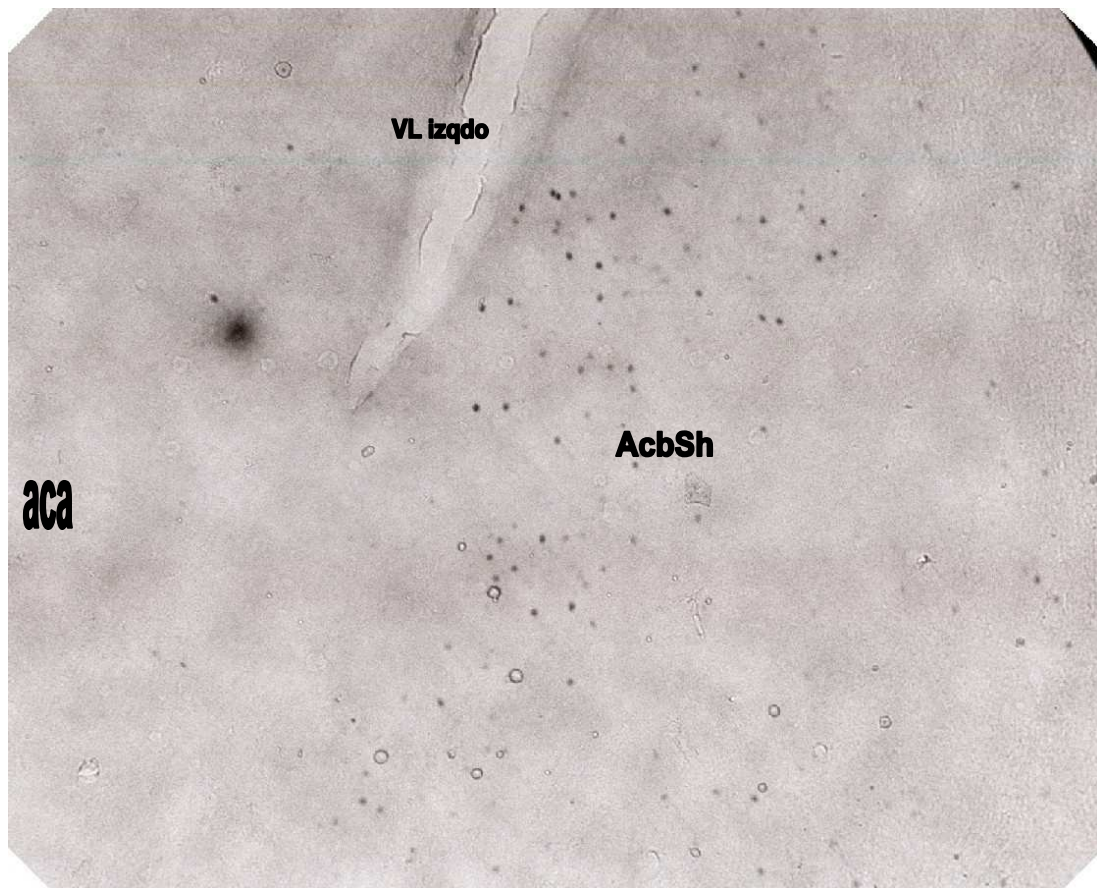


Microfotografía 2 (3) : Distribución de inmunorreactividad C-Fos a lo largo del Tálamo Medial (x100). Se corresponde con la sección nº 30 del Atlas de Paxinos & Watson (1996). [3V: Tercer ventrículo; DM: Núcleo Dorsomedial del Tálamo; CM: Núcleo Centromediano; PVP: Núcleo Paraventricular Posterior del Tálamo].

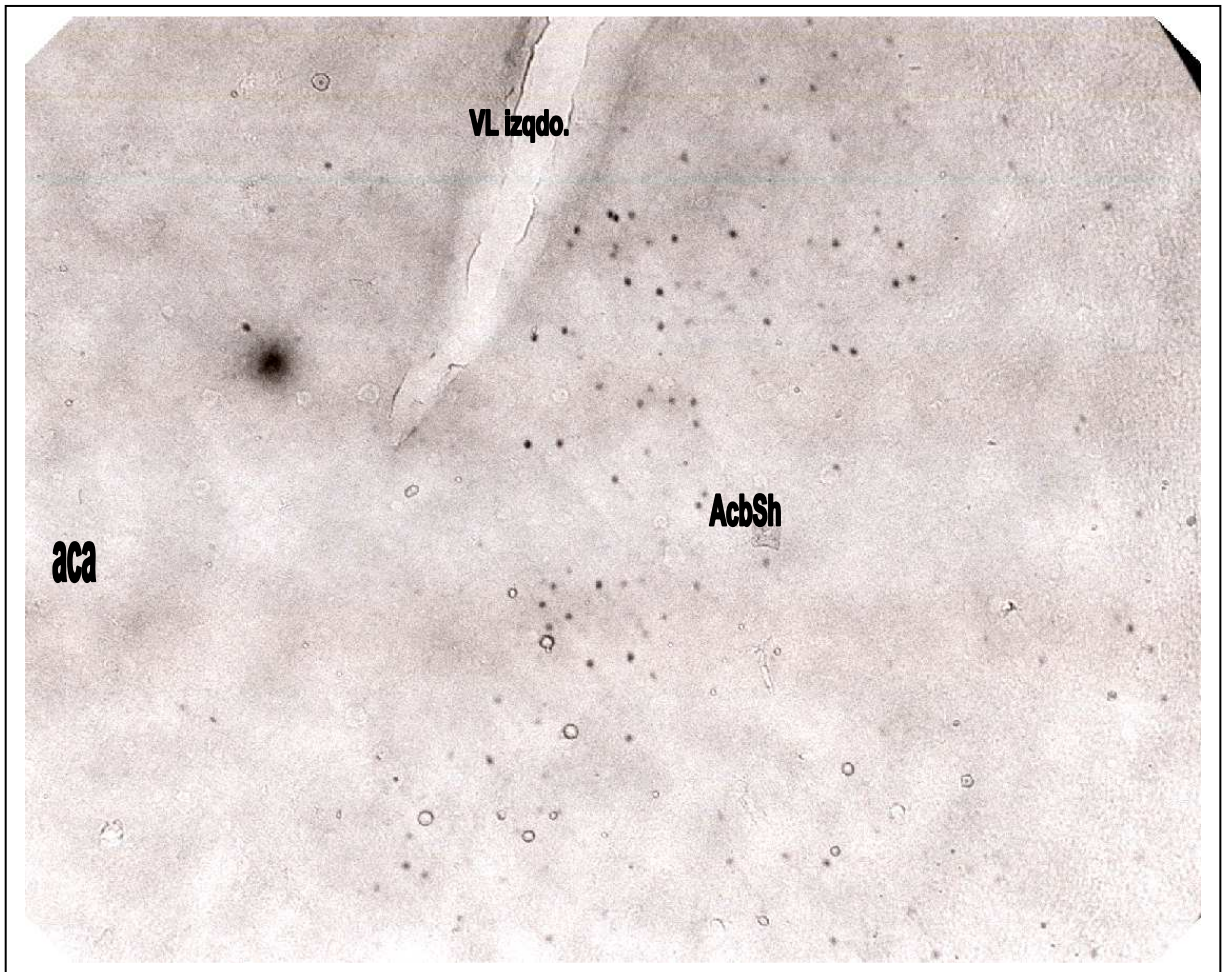


Microfotografía 3: Distribución de inmunorreactividad C-fos a lo largo del Hipotálamo (x 100). Sección que se corresponde aproximadamente con la Figura nº 30 del Atlas de Paxinos & Watson (abajo). La zona fotografiada está representada por un rectángulo rojo. [3V: Tercer ventrículo; DM: Núcleo Dorsomedial hipotalámico].



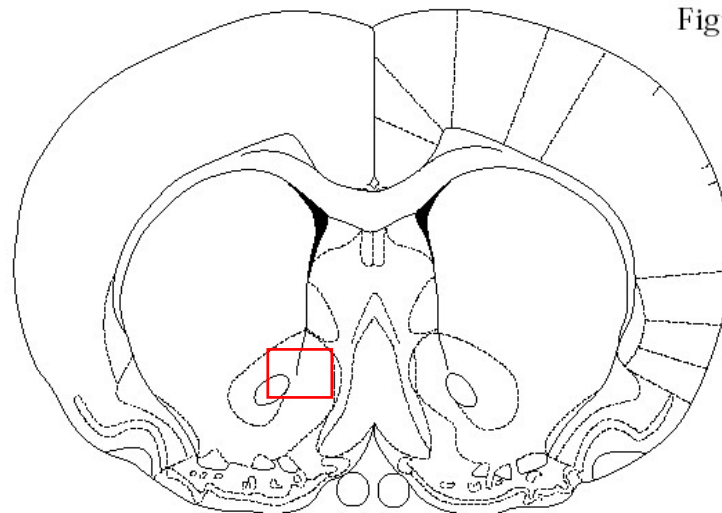


Microfotografía 4: Distribución de inmunorreactividad C-fos en el N. Accumbens 'shell' (x 100). Sección que se corresponde aproximadamente con las Figuras 15-16 del Atlas de Paxinos & Watson (1996). [aca: comisura anterior; VL izqdo: ventrículo lateral izquierdo; AcbSh: N. Accumbens Shell]



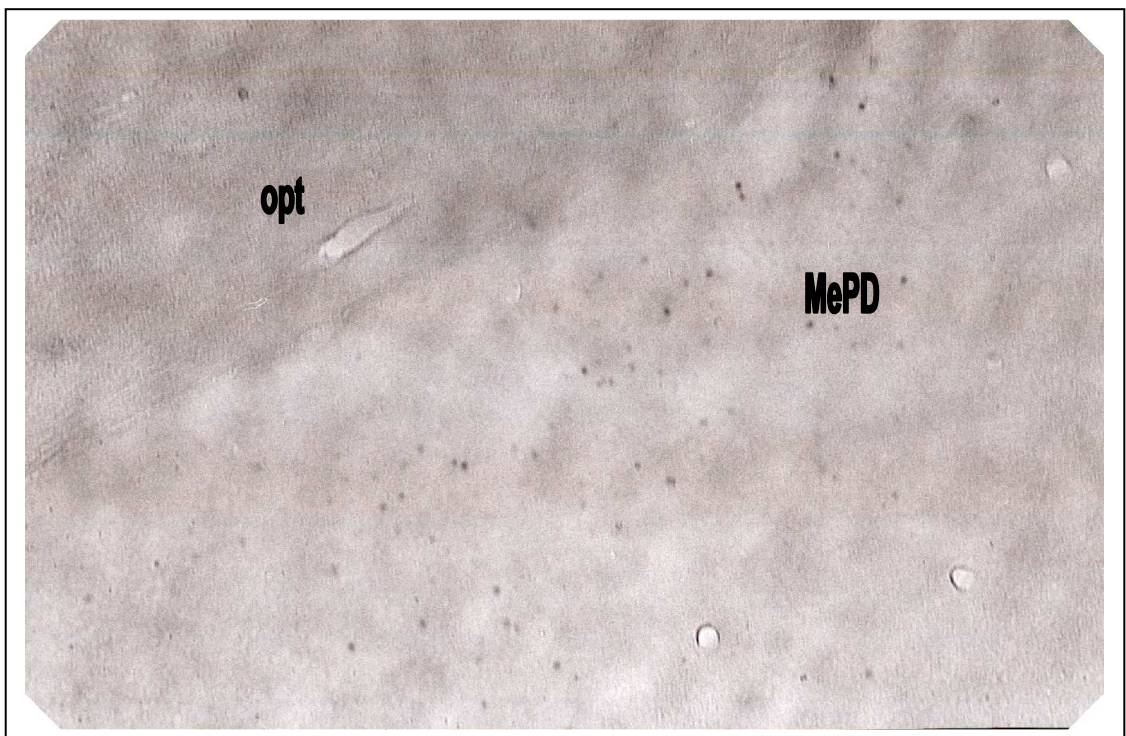
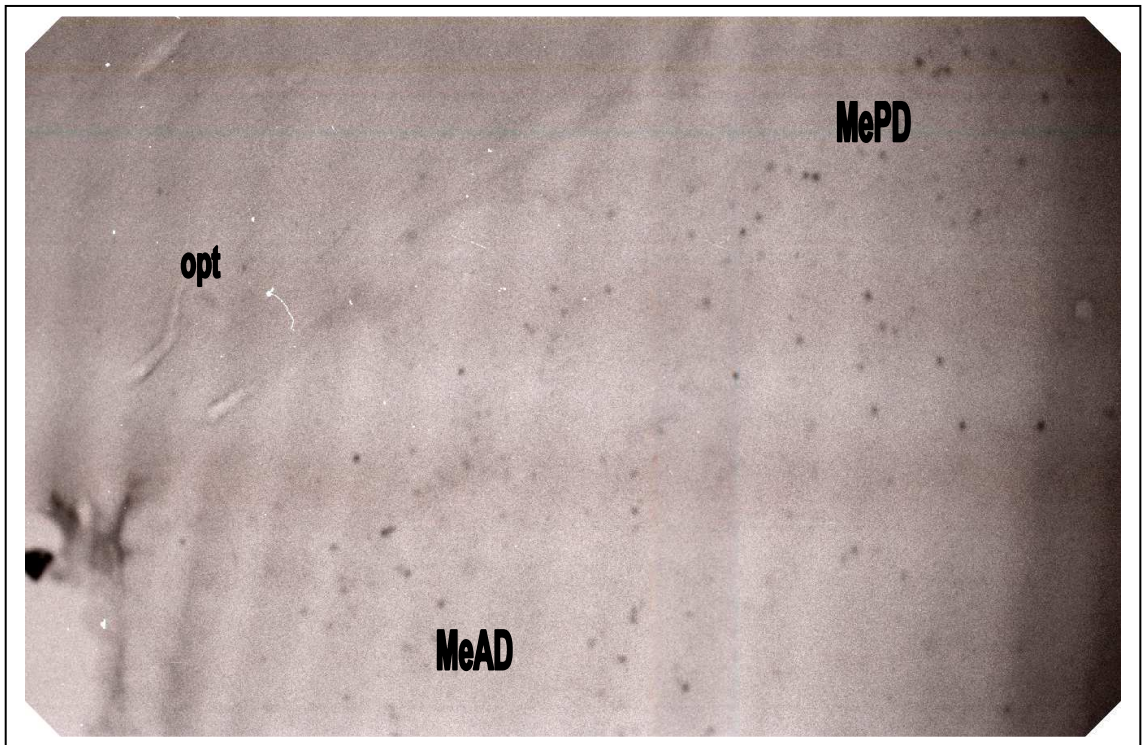
Microfotografía 4: Distribución de inmunorreactividad C-fos en el N. Accumbens 'shell' (x 100). Sección que se corresponde aproximadamente con las Figuras 15-16 del Atlas de Paxinos & Watson (1996). [aca: comisura anterior; VL izqdo: ventrículo lateral izquierdo; AcbSh: N. Accumbens Shell]

Figure 15



Anterolateral 9.70 mm

Bregma 0.70 mm



Microfotografías 5 (1) y 5 (2). Distribución de inmunorreactividad C-Fos en la Amígdala Medial (x 100). Secciones que se corresponden aproximadamente con las Figuras 29-30 del Atlas de Paxinos & Watson (1996). [opt: Tracto Optico; MeAD: Amígdala medial Anterodorsal; MePD: Amígdala Medial Posterodorsal.].

Figure 30

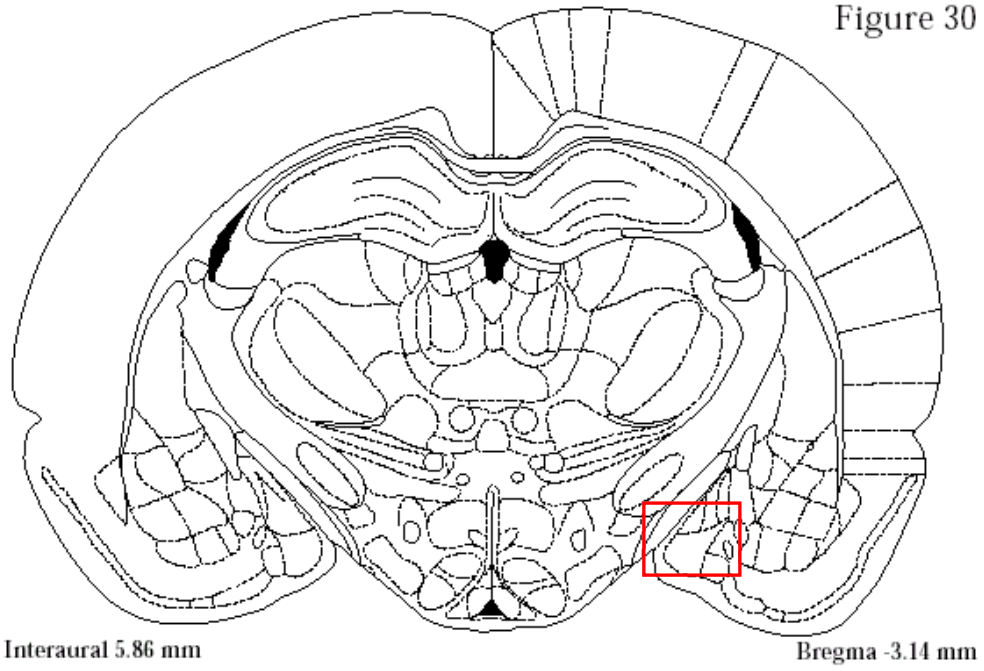
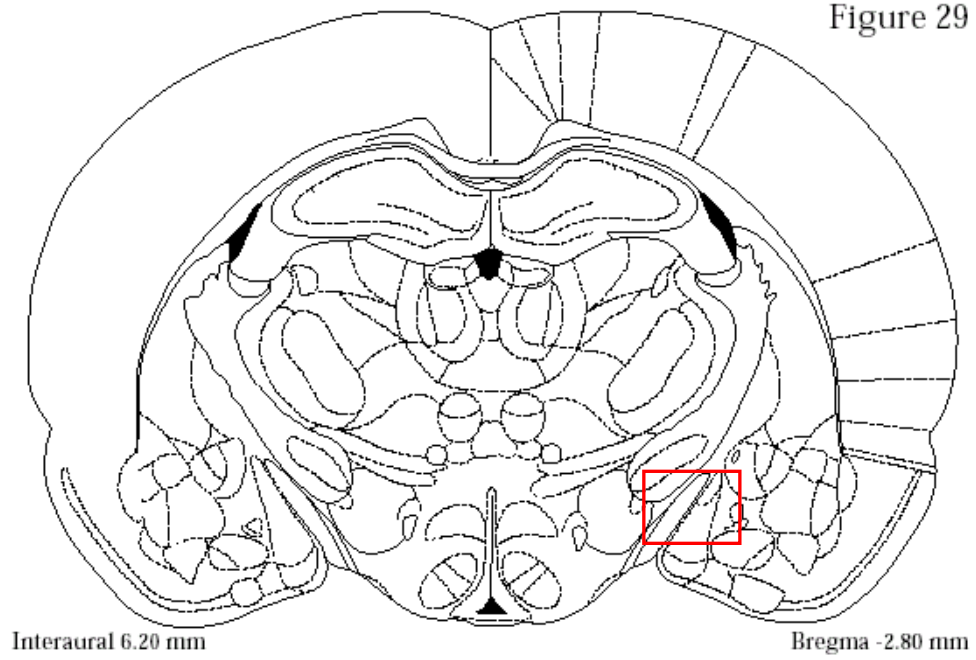
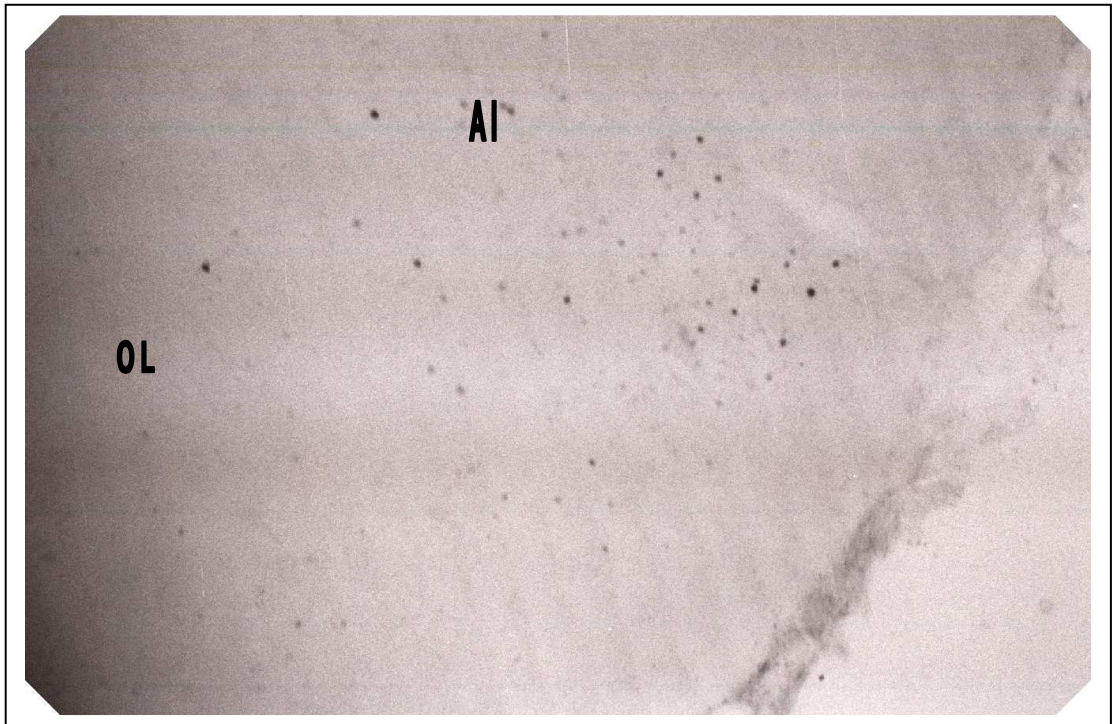


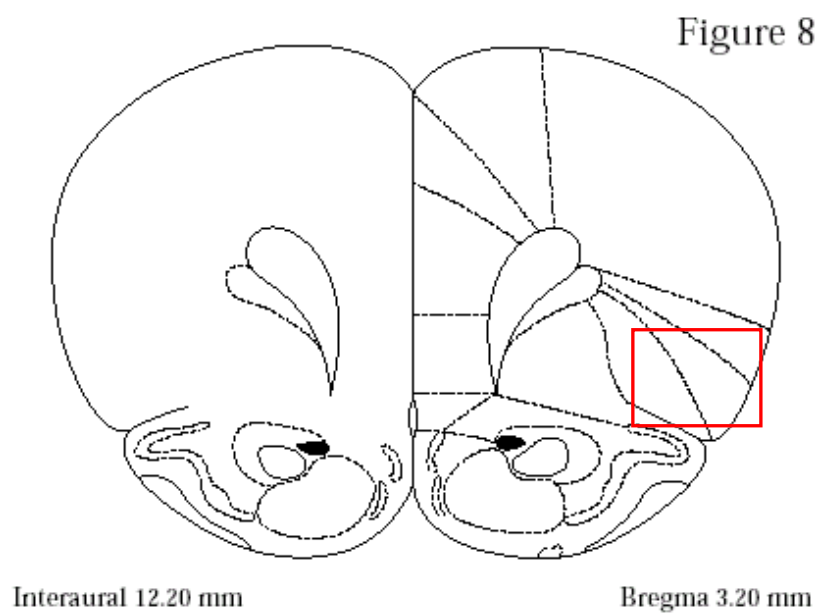
Figure 29

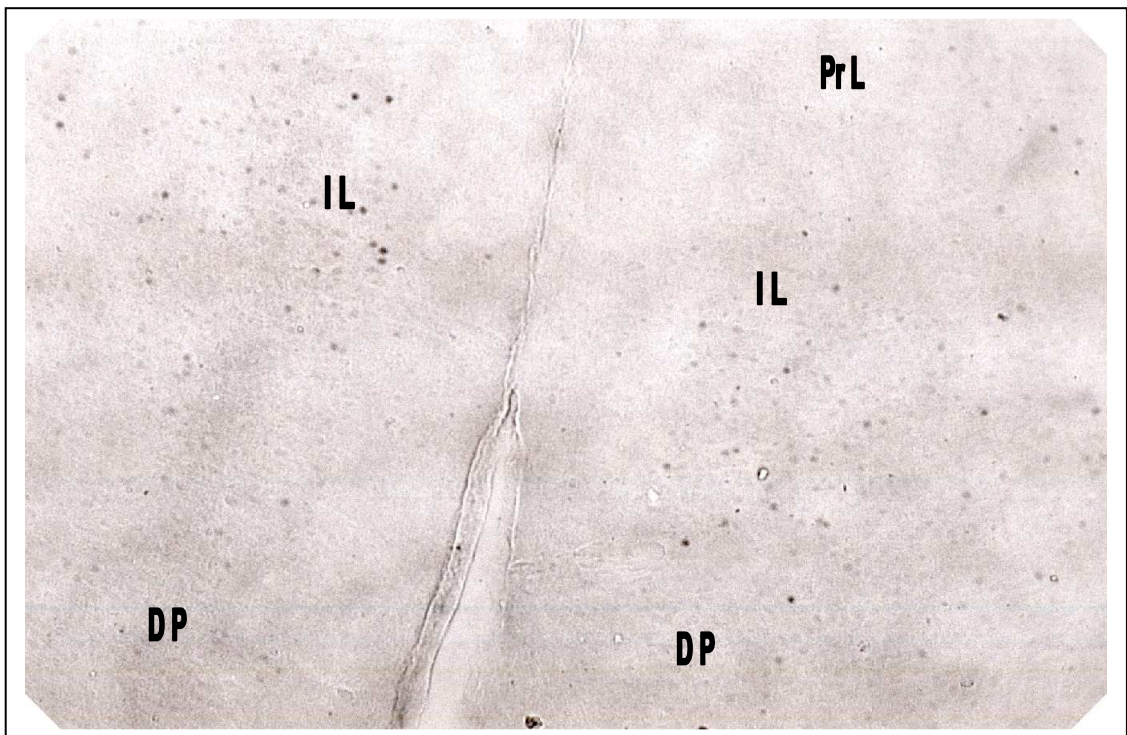
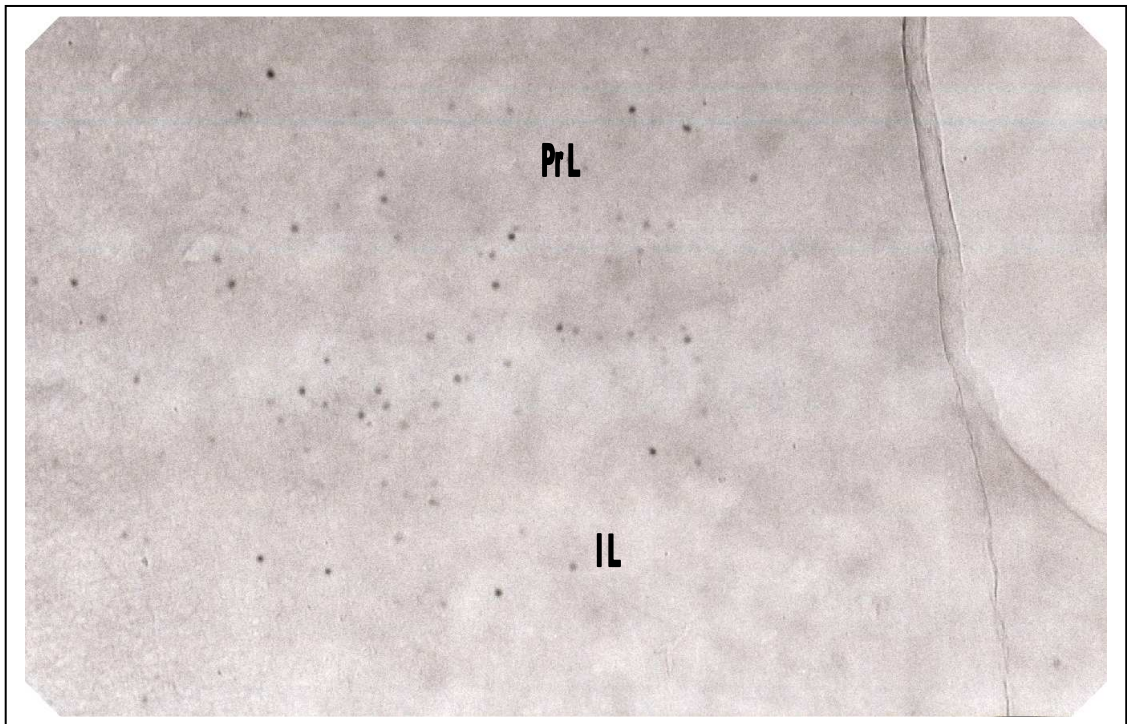


Secciones del Atlas de Paxinos & Watson correspondientes a las microfotografías 5(1) y 5(2).



Microfotografía 6: Distribución de inmunorreactividad C-fos en la Corteza Prefrontal Lateral (x100). Sección que se corresponde aproximadamente con la Figura nº 8 del Atlas de Paxinos & Watson (1996). Abajo, la zona fotografiada está representada por un rectángulo rojo. [AI: Area insular; OL: Corteza Orbital Lateral].





Microfotografías 7(1) y 7(2): Distribución de inmunorreactividad C-fos en la Corteza Prefrontal Medial (x 100). Secciones que se corresponden aproximadamente con las Figuras 9-10 del Atlas de Paxinos & Watson (1996). [DP: corteza peduncular dorsal; IL: corteza infralímbica; PrL: Corteza Prelímbica].

Figure 9

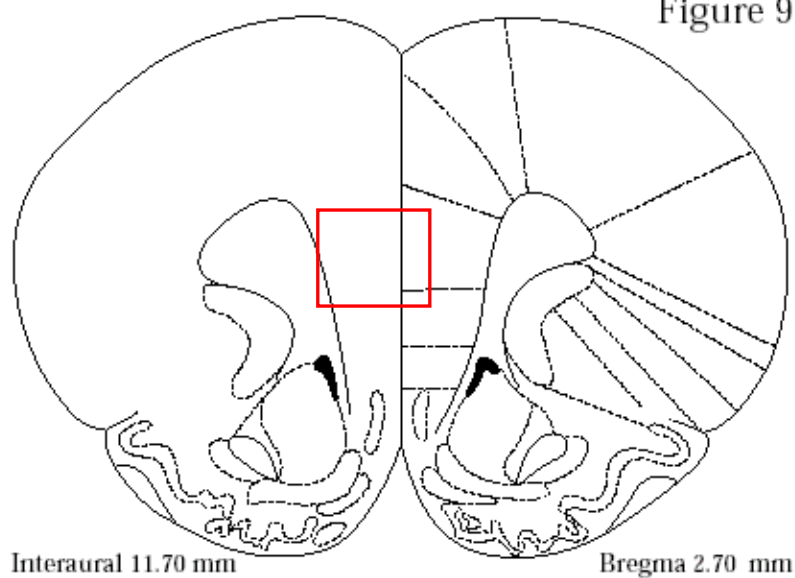
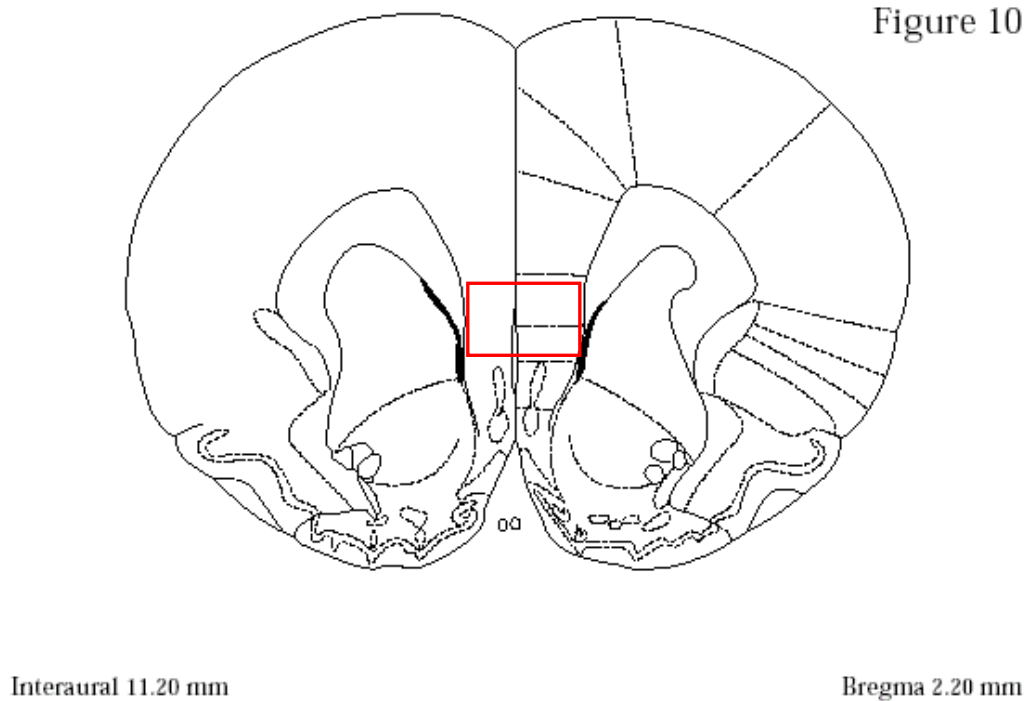


Figure 10



Secciones del Atlas de Paxinos & Watson correspondientes a las microfotografías 7(1) y 7(2).

TABLAS Y GRÁFICOS

	G. EXPERIMENTAL	
	SUJ	Sab.+E
1	15,5	1,3
2	8,0	5,2
3	5,7	8,1
4	9,7	3,7
5	3,9	6,7
6	12,3	0,2
7	5,0	8,7
8	9,9	0,4
9	10,5	1,9
10	12,5	1,0
11	9,8	1,0
12	8,0	1,0
Totales	110,8	39,2
Medias	9,23	3,26
DT	3,21	2,99

	G. CONTROL	
	SUJ	Sab.+E
1	2,4	14,0
2	7,0	13,5
3	4,0	4,4
4	5,2	7,0
5	6,5	4,5
6	0,6	12,4
7	12,4	0,1
8	12,3	2,0
9	6,8	1,4
10	4,8	0,5
Totales	62,0	59,8
Medias	6,2	5,98
DT	3,61	5,18

Tabla 1.- Ingesta de cada uno de los Estimulos Gustativos (en ml.) manifestada por los sujetos del Grupo Experimental y del Grupo Control en el Experimento 1, junto con los valores totales, medias y desviaciones típicas. (Condición experimental: "Sab.+E" sabor asociado a estimulación; "Sab.+NE" Sabor asociado a no-estimulación).

ANEXO II

SUJETO	FASE I		FASE II	
	Sabor + E	Sabor + No E	Sabor + E	Sabor + No E
1	8,2	0,4	4,2	3,0
2	9,2	3,7	13,2	0,9
3	0,6	14,0	0,1	12,0
4	5,3	4,0	6,0	5,0
5	7,3	0,1	3,8	3,9
6	8,0	0,1	0,1	7,0
7	0,1	11,2	0,1	10,5
8	0,1	4,8	0,1	7,1
9	12,0	2,0	0,2	15,0
10	0,5	6,8	5,0	1,0
11	14,0	0,2	16,5	0,1
12	10,0	0,1	9,7	0,4
13	3,5	6,1	1,8	7,4
14	0,1	13,2	0,1	14,2
15	0,1	13,6	0,1	16,6
16	2,2	7,6	0,2	11,3
17	13,7	0,2	12,7	0,8
18	0,2	7,7	0,1	11,1
Total	95,1	95,8	74,0	127,3
Media	5,28	5,32	4,11	7,07
DT	4,94	4,87	5,23	5,33

Tabla 2: Cantidades ingeridas por cada sujeto experimental (expresadas en ml.) de cada uno de los Estímulos Gustativos y en cada una de las Fases del Experimento 2. (Condición experimental: “Sab.+E” sabor asociado a estimulación; “Sab.+NE” Sabor asociado a no-estimulación).

SUJETOS	GRUPO LESION NPBlE							
	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	S + LP	S +SF	S + LP	S+SF	S + LP	S +SF	S + LP	S +SF
1	5,6	2,7	2,0	4,5	0,3	5,5	3,2	2,6
2	6,5	0,5	6,7	0,4	6,7	0,2	6,6	0,1
3	6,6	1,1	3,1	5,6	7,4	0,2	6,8	0,0
4	5,7	0,9	4,6	1,0	3,4	1,7	0,1	2,6
5	0,8	4,7	0,3	2,5	0,2	2,0	0,0	5,0
6	0,0	3,6	0,4	3,2	3,2	1,0	0,1	4,5
7	4,0	5,0	5,0	1,8	4,9	0,1	6,0	0,2
8	4,0	2,8	2,2	5,3	1,3	4,1	2,0	4,6
Media	4,15	2,66	3,03	3,03	3,42	1,85	3,1	2,45
DT	2,35	1,61	2,12	1,83	2,58	1,86	2,81	1,99

Tabla 3: Ingesta de cada uno de los Estímulos Gustativos (fresa o coco) manifestada por los sujetos del Grupo Lesionado en el Experimento 3. (S + LP: estímulo gustativo + administración i.g. de Leche Predigerida; S + SF: estímulo gustativo + administración i.g. de Suero Fisiológico).

SUJETOS	GRUPO FALSA LESION							
	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	S + LP	S +SF	S + LP	S+SF	S + LP	S +SF	S + LP	S +SF
1	1,0	3,0	2,2	2,5	1,0	2,2	1,7	1,4
2	5,1	0,4	3,6	0,3	3,7	1,0	4,5	0,3
3	0,7	4,2	1,0	2,4	4,5	1,8	3,5	1,3
4	1,0	3,8	2,5	1,1	1,0	0,4	1,8	0,3
5	6,0	0,1	4,4	0,1	3,2	0,3	3,4	0,2
6	4,0	1,0	3,0	0,3	4,5	0,2	6,8	0,0
7	4,6	0,9	3,2	0,1	4,6	0,1	5,3	0,0
8	8,3	0,2	8,4	0,2	6,1	0,9	8,2	0,0
Media	3,83	1,7	3,53	0,87	3,57	0,86	4,40	0,43
DT	2,56	1,49	2,06	0,95	1,68	0,72	2,14	0,54

Tabla 4: Ingesta de cada uno de los Estímulos Gustativos (fresa o coco) manifestada por los sujetos del Grupo de Falsa Lesion en el Experimento 3. (S + LP: estímulo gustativo + administración i.g. de Leche Predigerida; S + SF: estímulo gustativo + administración i.g. de Suero Fisiológico).

ANEXO II

GRUPO LESIONADO				
SUJETOS	PRUEBA 1		PRUEBA 2	
	LP	SF	LP	SF
1	2,5	4,9	4,3	1,3
2	1,0	8,8	8,7	1,3
3	1,1	5,0	4,4	0,4
4	5,5	3,5	3,0	0,8
5	3,9	1,7	5,2	0,5
6	4,5	2,3	3,6	0,8
7	9,3	0,2	5,0	0,6
8	4,5	3,0	7,3	0,4
Media	4,03	3,67	5,18	0,76
DT	2,51	2,44	1,78	0,34

Tabla 5: Ingesta (en ml.) de cada uno de los Estímulos Gustativos, manifestada por los Sujetos del Grupo Lesionado durante la primera y segunda prueba de elección en el Experimento 4 (Abreviaturas: LP= estímulo gustativo asociado a la infusión intragástrica de Leche Predigerida; SF= estímulo gustativo asociado a la administración i.g. de Suero Fisiológico).

GRUPO FALSA LESION				
SUJETOS	PRUEBA 1		PRUEBA 2	
	LP	SF	LP	SF
1	0,3	7,2	2,0	6,0
2	0,2	5,7	6,2	0,1
3	0,0	0,0	8,0	1,6
4	0,3	2,0	3,6	2,0
5	2,5	6,1	3,7	2,7
6	5,1	1,1	8,2	0,2
7	8,1	0,0	8,5	1,5
8	7,1	0,4	4,2	0,2
Media	2,95	2,81	5,55	1,78
DT	3,14	2,82	2,34	1,82

Tabla 6: Ingesta (en ml.) de cada uno de los Estímulos Gustativos, manifestada por los Sujetos del Grupo 'Falsa Lesión' durante la primera y segunda prueba de elección en el Experimento 4 (Abreviaturas: LP= estímulo gustativo asociado a la infusión intragástrica de Leche Predigerida; SF= estímulo gustativo asociado a la administración i.g. de Suero Fisiológico).

SUJETO Nº	ESTIMUL µA	DIA 1			DIA 2			PROP. DIA 1	PROP. DIA 2
		ESTIM	NEUTRO	NO- EST	ESTIM	NEUTRO	NO- EST		
1	83	157	159	284	127	64	409	0,356	0,237
2	75	421	47	132	567	23	10	0,761	0,982
3	76	17	51	412	111	36	453	0,039	0,196
4	75	166	159	275	146	172	282	0,376	0,341
5	76	8	6	586	16	2	582	0,013	0,026
6	74	173	107	440	100	40	460	0,282	0,178
7	78	121	59	420	83	19	498	0,223	0,142
8	69	7	27	566	15	33	552	0,012	0,026
9	52	32	9	559	4	7	589	0,054	0,006
10	81	586	3	11	552	1	47	0,981	0,921
11	78	195	54	351	86	97	417	0,357	0,171
12	67	11	24	565	44	3	553	0,019	0,073
13	60	41	39	520	43	8	549	0,073	0,072
14	75	33	31	476	25	11	564	0,064	0,042
15	60	6	30	564	2	10	588	0,010	0,003
16	60	62	59	479	22	28	550	0,114	0,038
17	76	19	7	574	20	9	571	0,032	0,033
18	70	524	33	43	540	15	45	0,924	0,923
19	70	145	38	417	293	6	301	0,258	0,493
20	67	299	127	174	279	130	191	0,632	0,593
21	55	190	145	265	211	73	316	0,417	0,400
22	84	281	96	223	550	15	35	0,557	0,940
23	67	221	92	287	401	125	76	0,435	0,840
24	76	286	70	244	268	43	289	0,539	0,481
25	64	223	87	290	113	31	456	0,434	0,198
26	76	148	97	355	26	14	560	0,294	0,044
27	92	292	123	185	169	153	278	0,612	0,378
I	--	277	127	196	174	75	351	0,585	0,331
II	--	325	77	198	199	104	297	0,621	0,401
III	--	135	67	398	182	26	392	0,253	0,317
IV	--	221	72	307	252	85	263	0,418	0,489
V	--	132	51	417	241	51	308	0,240	0,438

Tabla 7: Tiempo que pasan los animales experimentales sometidos a 'Estimulación' (numeración arábica) y los animales del grupo 'Control sin estimulación' (numeración romana) en cada uno de los Compartimentos del Laberinto en Corredor, en el Experimento 5 (expresado en segundos). En la segunda columna de la izquierda se recoge la intensidad de corriente con que fue estimulado cada animal (en microamperios). Las dos últimas columnas de la derecha reflejan la proporción de tiempo que cada sujeto pasa en el 'Lugar Estimulado', obtenido a partir de la formula: (tiempo en lugar E) / (t en lugar E. + t en lugar No-E).

ANEXO II

SUJETO Nº	ESTIMUL µA	DIA 1			DIA 2			PROP. DIA 1	PROP. DIA 2
		ESTIM	NEUTRO	NO- EST	ESTIM	NEUTRO	NO- EST		
PB1	82	277	60	263	369	63	168	0,512	0,687
PB2	80	456	15	129	285	86	231	0,779	0,552
PB3	82	160	51	389	352	48	200	0,291	0,637
PB4	82	311	32	257	199	44	357	0,547	0,358
PB5	82	180	27	393	401	31	168	0,314	0,704
PB6	84	293	172	135	448	68	84	0,684	0,842
PB7	82	377	93	130	301	120	179	0,743	0,627
PB8	86	30	22	548	20	101	479	0,052	0,040
PB12	54	3	2	595	10	4	406	0,005	0,024
PB13	77	520	13	67	513	37	50	0,885	0,911
PB14	75	36	56	508	34	62	504	0,066	0,063
PB15	67	274	55	271	70	198	332	0,502	0,174
PB16	76	190	60	350	345	124	131	0,351	0,724
PB17	84	405	35	160	406	37	157	0,716	0,721
PB18	82	427	11	162	456	19	125	0,725	0,784
PB19	70	373	13	214	473	20	107	0,635	0,815
HT1	80	374	63	163	499	33	68	0,696	0,880
HT3	87	476	22	102	413	56	131	0,823	0,759
HT4	80	436	68	96	532	23	45	0,819	0,922
HT5	80	373	71	156	320	64	216	0,705	0,597
HT6	90	321	56	223	447	23	130	0,590	0,774
HT7	82	458	7	135	499	38	63	0,772	0,888
HT8	85	313	34	253	465	23	112	0,553	0,805
HT9	87	353	38	209	426	93	81	0,628	0,840
HT10	85	389	32	179	375	64	161	0,684	0,699
CO1	--	193	175	232	184	160	196	0,454	0,484
CO2	--	165	140	295	267	146	187	0,358	0,588
CO4	--	310	23	267	290	20	290	0,537	0,500
CO5	--	165	30	405	42	10	548	0,289	0,071
CO6	--	310	62	228	182	47	371	0,576	0,215

Tabla 8: Tiempo que pasan los animales de cada uno de los grupos del Experimento 6 (EE-PBle, EE-HTL, CON-NE) en cada uno de los Compartimentos del Laberinto en Corredor, expresado en segundos. En la 2ª columna de la izquierda se recoge la intensidad de corriente con que fue estimulado cada animal. Las dos últimas columnas, a la derecha, reflejan la proporción de tiempo que cada sujeto pasa en el 'Lugar Estimulado', obtenido a partir de la formula : (t en lugar E)/ (t en lugar E + t en lugar No-E). En el caso de los animales control, se selecciona al azar el tiempo que pasan en uno de los compartimentos y se calcula la proporción con respecto a éste.

SUJETO Nº	ESTIMUL µA	DIA 1			DIA 2			PROP. DIA 1	PROP. DIA 2
		ESTIM	NEUTRO	NO- EST	ESTIM	NEUTRO	NO- EST		
PB1	85	444	26	130	522	13	65	0,773	0,889
PB2	90	500	19	81	513	6	81	0,860	0,863
PB3	90	120	34	446	195	57	348	0,212	0,359
PB4	90	18	22	560	6	47	547	0,032	0,010
PB5	80	389	29	182	108	35	457	0,681	0,191
PB6	80	245	17	338	404	33	163	0,420	0,712
PB7	85	109	12	479	488	22	90	0,185	0,844
PB8	90	503	44	53	552	2	46	0,904	0,923
PB9	80	305	21	274	524	1	75	0,526	0,874
PB11	83	317	6	277	527	8	65	0,533	0,890
PB14	95	546	16	38	441	2	157	0,935	0,737
PB15	85	343	71	186	314	13	273	0,648	0,535
PB16	85	410	54	136	525	7	68	0,751	0,885
PB17	80	334	24	242	40	1	559	0,579	0,066
PB18	87	230	59	311	335	4	251	0,425	0,571
PB19	87	341	18	241	389	11	200	0,586	0,660
PB20	86	277	33	290	498	16	86	0,488	0,852
PB21	92	164	56	380	70	64	466	0,301	0,130
PB22	84	302	20	278	442	31	127	0,520	0,776
PB23	80	290	37	273	516	7	77	0,515	0,870

Tabla 9: Tiempo que pasan los animales del Experimento 8 en cada uno de los Compartimentos del Laberinto en Corredor, expresado en segundos. En la 2ª columna de la izquierda se recoge la intensidad de corriente con que fue estimulado cada animal. Las dos últimas columnas, a la derecha, reflejan la proporción de tiempo que cada sujeto pasa en el 'Lugar Estimulado', obtenido a partir de la formula : $(t \text{ en lugar E}) / (t \text{ en lugar E} + t \text{ en lugar No-E})$.

ANEXO II

SUJETOS	GRUPO 1			
	PRUEBA I		PRUEBA II	
	S + EE	S + NE	S + EE	S+NE
PB1	6,3	3,5	5,3	4,6
PB2	2,3	5,5	6,0	0,8
PB7	7,6	1,2	1,0	6,4
PB8	2,6	6,8	8,5	1,2
PB9	1,2	4,2	2,8	0,0
PB11	3,0	4,0	5,0	2,1
PB16	3,5	4,9	6,8	1,5
PB20	1,0	6,5	7,0	1,0
PB22	1,0	11,4	10,3	0,7
PB23	7,5	1,6	6,2	1,8
Media	3,6	4,96	5,89	2,01
DT	2,46	2,76	2,51	1,87

Tabla 10: Cantidades del Estímulo Gustativo (en ml.) ingeridas por cada uno de los individuos del Grupo 1 (animales positivos, según el resultado del análisis de Clusters), en el Experimento 8, junto con las medias y desviaciones típicas del grupo (Condición experimental: "S+EE": sabor asociado a estimulación eléctrica del NPBe; "S+NE": Sabor asociado a no-estimulación).

SUJETOS	GRUPO 2			
	PRUEBA I		PRUEBA II	
	S + EE	S + NE	S + EE	S+NE
PB6	0,1	9,6	3,5	5,7
PB14	2,0	6,2	5,2	2,0
PB15	0,1	4,5	7,0	0,4
PB18	4,7	7,6	0,0	11,1
PB19	6,5	1,9	0,5	6,6
Media	2,68	5,96	3,24	5,16
DT	2,54	2,63	2,68	3,75

Tabla 11: Cantidades del Estímulo Gustativo (en ml.) ingeridas por cada uno de los individuos del Grupo 2 (animales indiferentes, según el resultado del análisis de Clusters), en el Experimento 8, junto con las medias y desviaciones típicas del grupo (Condición experimental: "S+EE": sabor asociado a estimulación eléctrica del NPBe; "S+NE": Sabor asociado a no-estimulación).

SUJETOS	GRUPO 3			
	PRUEBA I		PRUEBA II	
	S + EE	S + NE	S + EE	S+NE
PB3	4,5	6,0	3,3	8,7
PB4	1,0	7,0	2,0	8,5
PB5	5,5	3,3	0,0	5,9
PB17	5,3	4,0	4,0	3,9
PB21	4,0	3,3	4,3	4,7
Media	4,06	4,72	2,72	6,34
DT	1,62	1,51	1,57	1,95

Tabla 12: Cantidades del Estímulo Gustativo (en ml.) ingeridas por cada uno de los individuos del Grupo 3 (animales negativos, según el resultado del Análisis de Clusters), en el Experimento 8 junto con los valores medios y desviaciones típicas del grupo (Condición experimental: "S+EE": sabor asociado a estimulación eléctrica del NPBe; "S+NE": Sabor asociado a no-estimulación).

ANEXO II

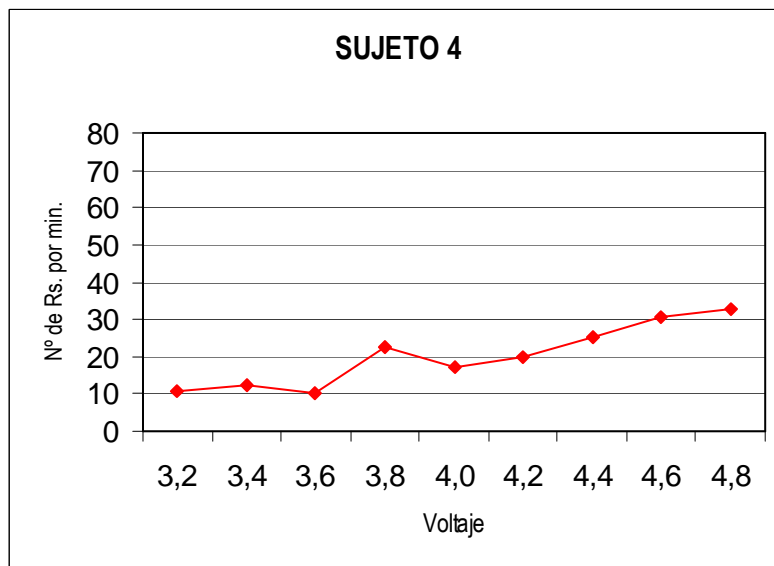
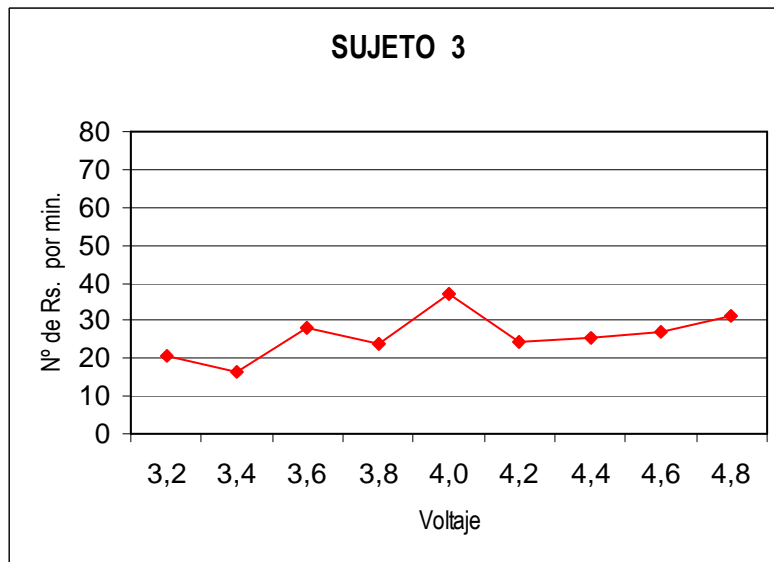
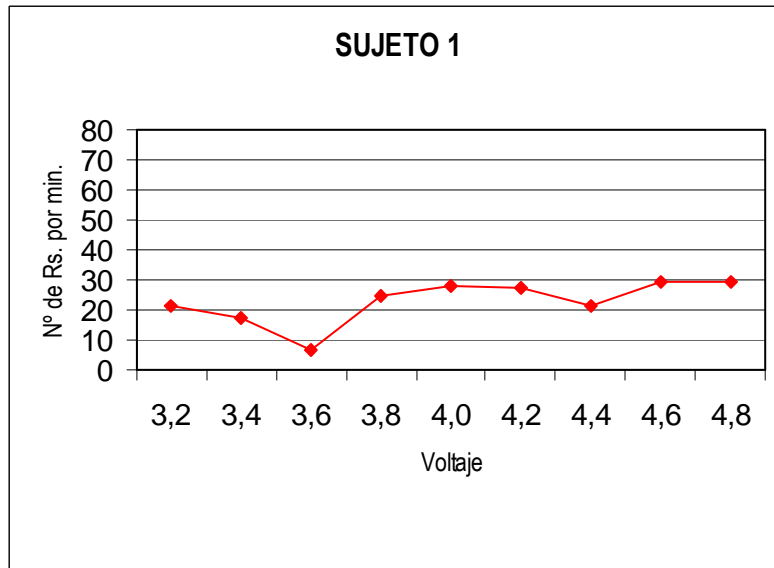


Grafico 1 (a, b y c): Curvas que relacionan Tasa-Voltaje de AEIC para cada uno de los sujetos del grupo EE-HTL en el Experimento 6.

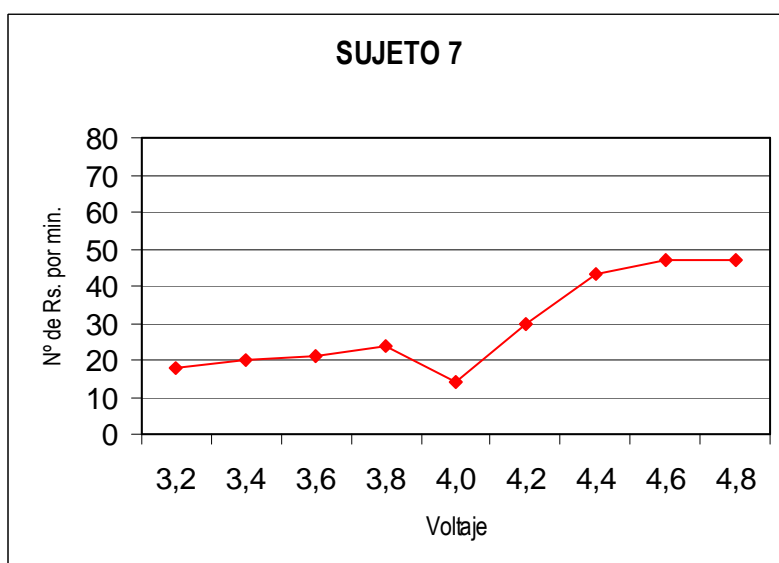
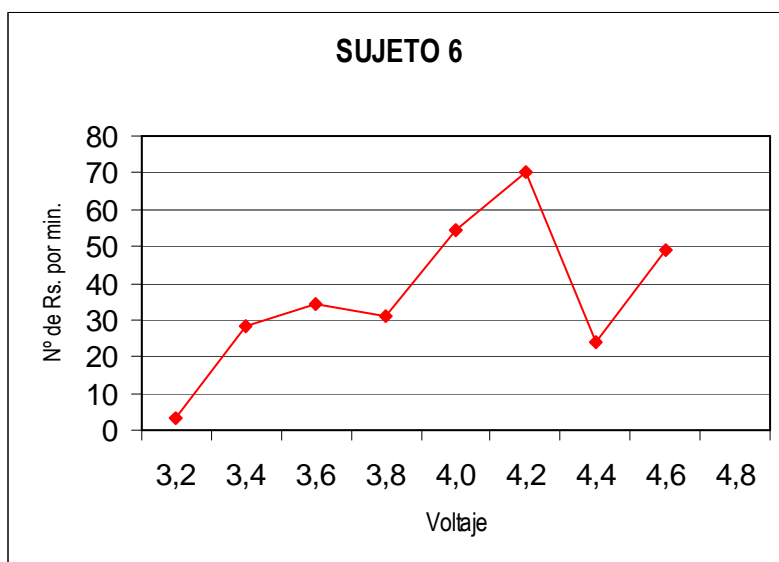
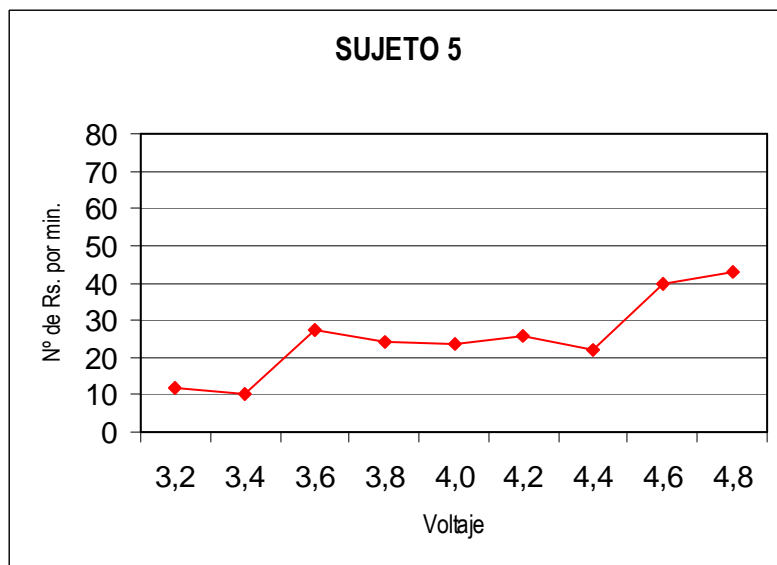


Grafico 1 (d, e y f): Curvas que relacionan Tasa-Voltaje de AEIC para cada uno de los sujetos del grupo EE-HTL en el Experimento 6.

ANEXO II

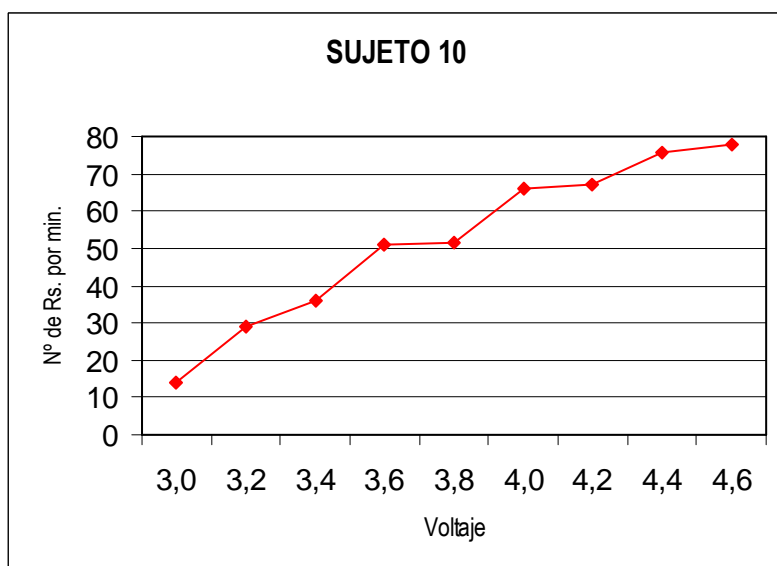
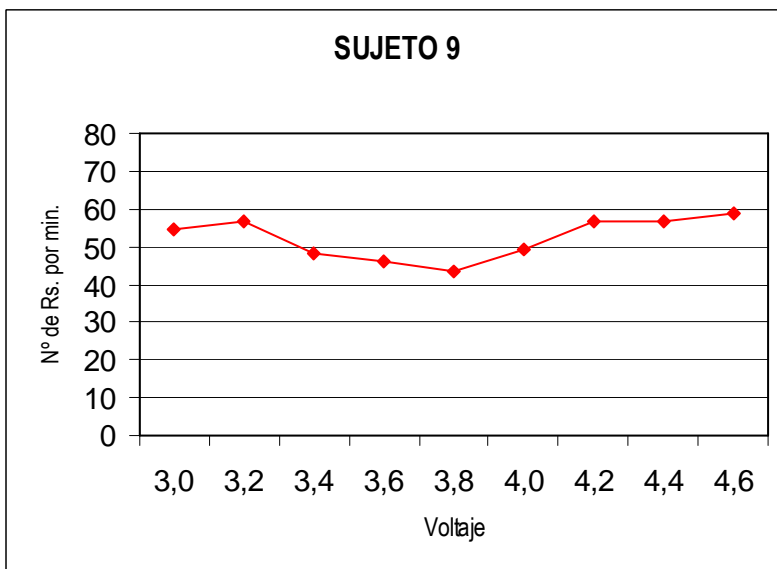
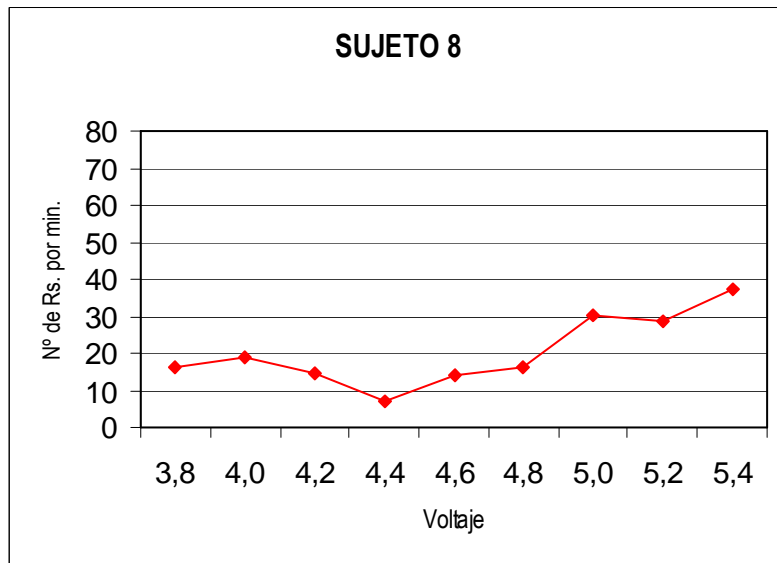


Grafico 1 (g, h, i): Curvas que relacionan Tasa-Voltaje de AEIC para cada uno de los sujetos del grupo EE-HTL en el Experimento 6.

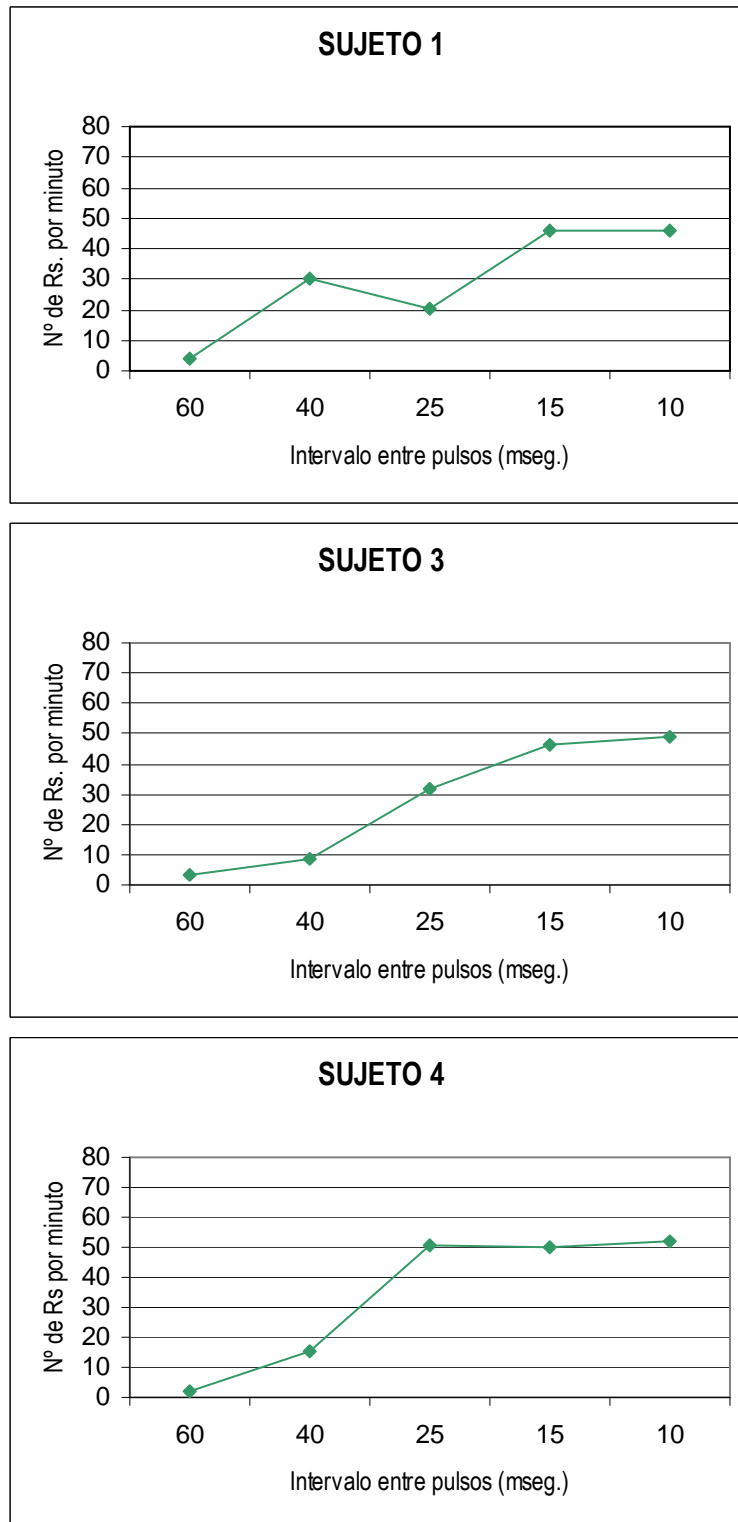


Gráfico 2 (a, b y c): Curvas de Tasa-Frecuencia de AEIC para los sujetos del grupo EE-HTL en el Experimento 7.

ANEXO II

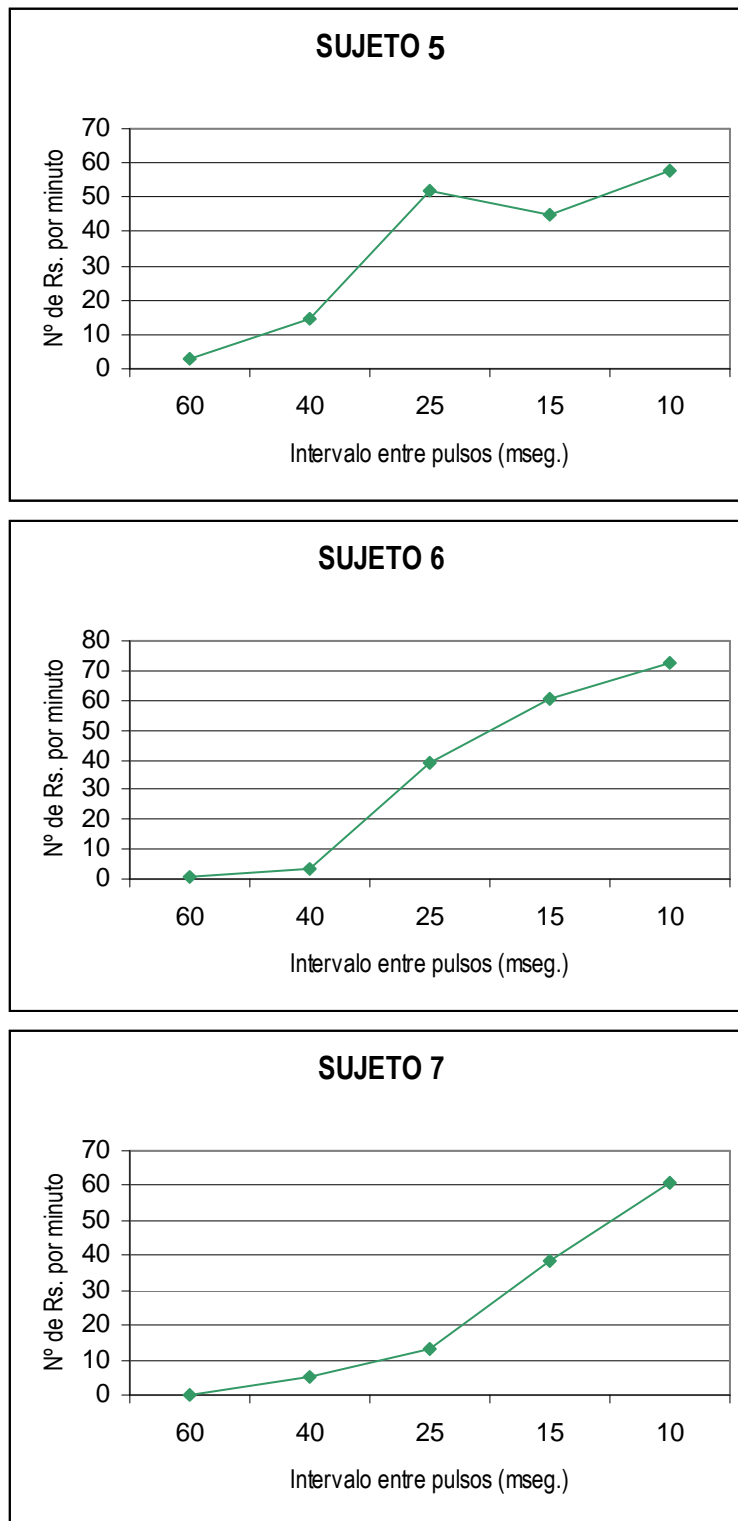


Gráfico 2 (d, e y f): Curvas de Tasa-Frecuencia de AEIC para los sujetos del grupo EE-HTL en el Experimento 7.

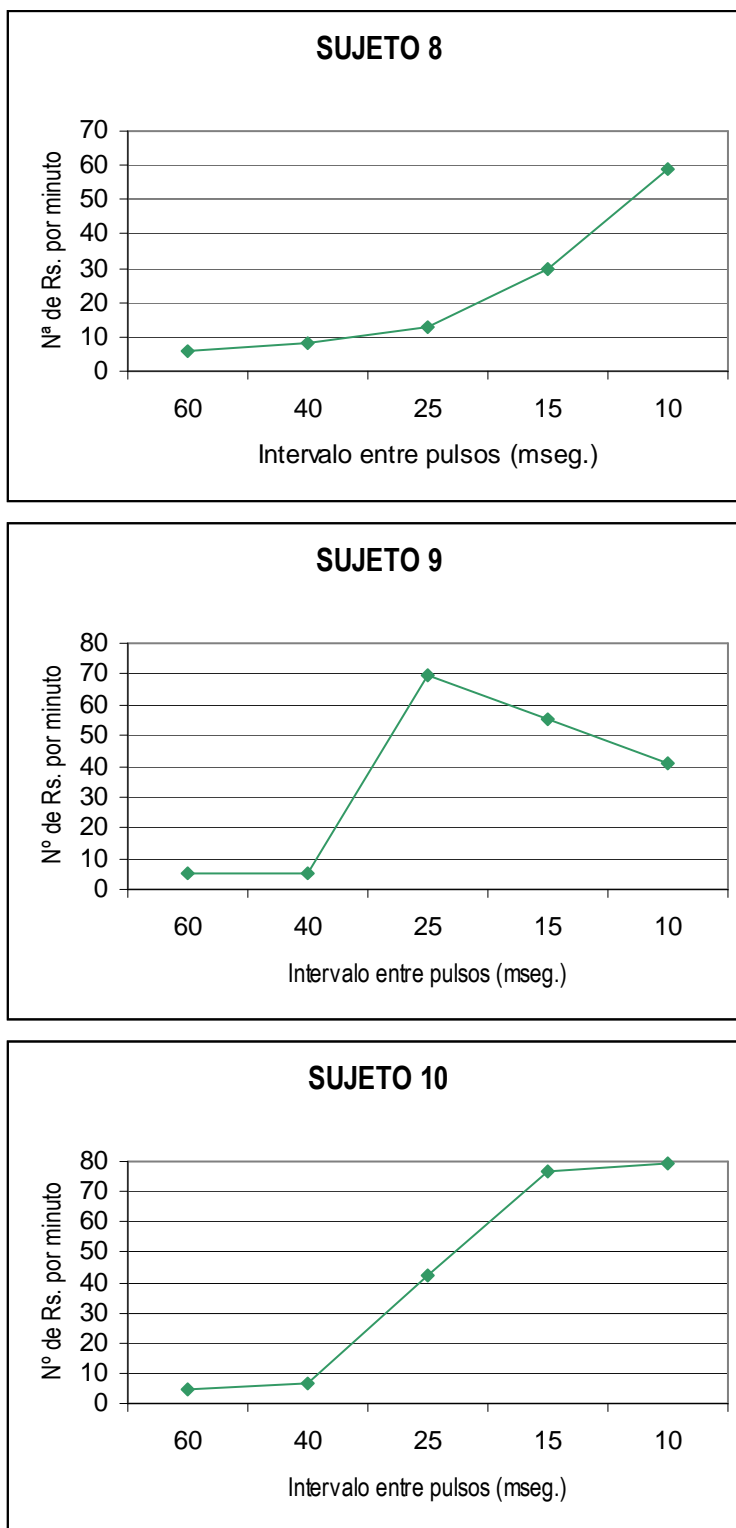


Gráfico 2 (g, h, i) : Curvas de Tasa-Frecuencia de AEIC para los sujetos del grupo EE-HTL en el Experimento 7.

ANEXO II

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado:
AEIC	Autoestimulación Intracraneal
NTPP	Núcleo Tegmental Pedúnculo-Pontino
NULD	Núcleo Tegmental Latero Dorsal
ATV	Area Tegmental Ventral
NAC, ACB	Núcleo Accumbens
CART	Peptido transcriptor de Cocaína y Anfetaminas
NTS	Núcleo del Tracto Solitario
MA	Mercaptoacetato
MP	Metil-Palmoxirato
SNC	Sistema Nervioso Central
CCK	Colecistoquinina
SI	Sustancia Innominada
POMC	Proopiomelanocortina
HTL	Hipotálamo Lateral
AP	Area Postrema
NLET (BNST)	Nucleo Lecho de la Estría Terminal
SGPA	Sustancia Gris Periacueductal
CGA	Condicionamiento Aversivo gustativo
AAG	Aprendizaje Aversivo Gustativo
HT	Hipotálamo
HTVM	Hipotálamo Ventromedial
HTL	Hipotálamo Lateral
NPV	Núcleo Paraventricular Hipotalámico
HTDM	Hipotálamo Dorsomedial
NPY	Neuropéptido Y
α -MSH	Hormona Estimulante de los Melanocitos
AGRP	Péptido regulador del Agouti
MCH	<i>Melanin-Concentrating Hormone</i>
RNA _m	RNA mensajero
CRH, CRF	Hormona Liberadora de Corticotropina
GHRH	Hormona Liberadora de la hormona Gonadotropina
NT	Neurotensina
E	Epinefrina (ó adrenalina)
NE	Norepinefrina (o noradrenalina)
5-HT	Serotonina
PYY	Neuropeptido YY
BZP	Benzodiacepinas
NE	Norepinefrina
5-HT	Serotonina
PKA	Proteinkinasa-A
AMP _c	Adenosin-Monofosfato cíclico
6-OH-DA	6-hidroxi-dopamina
FQ	Orfanina (ó nociceptina)
CINa	Cloruro Sódico
CILi	Cloruro de Litio

FQ	Orfanina o Nociceptina
NPB	Núcleo Parabraquial
NPBm, PBm	Núcleo Parabraquial Medial
NPBle (PBle)	Núcleo Parabraquial Lateral Externo
NPBl (PBlv)	Núcleo Parabraquial Lateral Ventral
NPBl _s (PBls)	Núcleo Parabraquial Lateral superior
NPBl _i (PBli)	Núcleo Parabraquial Lateral interno
NPBl _c (NPBl _c)	Núcleo Parabraquial Lateral central
KF	Núcleo de Kolliker.
i.p.	Intra-peritoneal
c.p.s.	Ciclos por segundo
AP	Localización de la coordenada anteroposterior
L	Lateral
V	Vertical
ms.	Milisegundos
mA	Miliamperios
μA	Microamperios
Hz	Hertzios

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

BIBLIOGRAFIA

-ABBADIE, C., PAN, Y. -X., DRAKE, C. T. & PASTERNAK, G. W. (2000): Comparative immunohistochemical distribution of carboxy terminus epitopes from the mu-opioid receptor splice variants. MOR-1D, MOR-1 and MOR-1C in the mouse and rat CNS. *Neuroscience* 100 (1), 141-153.

-ABERMAN, J. E. & SALAMONE, J. D. (1999): Nucleus Accumbens Dopamine depletions make rats more sensitive to high ratio requirements but do not impair primary food reinforcement. *Neuroscience*, 92 (2), 545-552.

-ABRAHAMSEN, G. C., BERMAN, Y. & 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.

-ADER, R. (1985): Conditioned Taste Aversions and Immunopharmacology. En: Annals of the New York Academy of Sciences , vol 443, pp. 293-307.

-AGMO, A., GALVAN, A. & TALAMANTES, B. (1995). Reward and Reinforcement Produced by Drinking Sucrose: Two Processes That May Depend on Different Neurotransmitters. *Pharmacol. Biochem. & Behavior*, 52 (2), 403-414.

-AGÜERO, A. & PUERTO, A. (1986): El Area Parabraquial como centro de convergencias sensoriales relacionadas en el Aprendizaje Interoceptivo. *Revista de Psicología General y Aplicada* 41 (3), 503-511.

-AGÜERO, A. (1990): Tesis Doctoral.

-AGÜERO, A., ARNEDO, M., GALLO, M. & PUERTO, A. (1993a): The Functional Relevance of the Lateral Parabraquial Nucleus in Lithium Chloride-Induced Aversion Learning. *Pharmacol. Biochem. & Behavior*, 45, 973-978.

-AGÜERO, A., ARNEDO, M., GALLO, M. & 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. & 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.

-AHIMA, R.S. & FLIER, J.S. (2000). Adipose Tissue as an Endocrin Organ. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol 11, n°8, 327-332.

-AHIMA, R.S., SAPER, C.B., FLIER, J.S. & ELMQUIST, J. (2000). Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 21, 263-307.

-AICHER, S. A., GOLDBERG, A., SHARMA, S & PICKEL, V. M. (2000): Mu-Opioid Receptors are Present in Vagal Afferents and Their Dendritic Targets in the Medial Tractus Solitarius. *The J. of Comparative Neurology*, 422, 181-190.

-AKIL, H., MENG, F., DEVINE, D.P. & 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.

BIBLIOGRAFIA

- ALDEN, M., BESSON, J. M. & 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 J. of Comparative Neurology* 341, 289-314.
- ALTIER, N. & STEWART, J. (1997). Neuropeptide FF in the VTA Blocks the Analgesic Effects of Both Intra-VTA Morphine and Exposure to Stress. *Brain Research*, 758, 250-254.
- ALTIER, N. & STEWART, J. (1999). The Role of Dopamine in The Nucleus Accumbens in Analgesia. *Life Sciences*, Vol.65, N°22, 2269-2287.
- ALTSCHULER, S. M., RINAMAN, L. & MISELIS, R. R. (1992): Viscerotopic Representation of the Alimentary Tract in the Dorsal and Ventral Vagal Complexes in the Rat. En: Ritter, S., Ritter, R. C. & Barnes, C. D. (Eds.), Neuroanatomy and Physiology of Abdominal Vagal Afferents , CRC Press, pp. 21-54.
- ANDERSON, R., DIOTTE, M & MILIARESSIS, E. (1995): The Bidirectional Interaction Between Ventral Tegmental Rewarding and Hindbrain Aversive Stimulation Effects in the Rat. *Brain Research*, 688, 15-20.
- ANGEL, I. & TARANGER, M. A. (1991): Impairment of Glucostatic, Adrenergic and Serotonergic Feeding Parallels the Lack of Glucoprivic Signals in the Golden Hamster. *Brain Res. Bull.*, 27, 353-358.
- ANGEL, I., KISS, A., STIVERS, J. A., SKIRBOLL, L., CRAWLEY, J. N. & PAUL, S. M.(1986): Regulation of [³H]Mazindol Binding to Subhypothalamic Areas: Involvement in Glucoprivic Feeding. *Brain Res. Bull.* 17, 873-877.
- ANGEL, I., STIVERS, J. A., PAUL, S. M. & CRAWLEY, J. N. (1987): Site of Action of Anorectic Drugs: Glucoprivic- versus Food Deprivation-Induced Feeding. *Pharmacol., Biochem. & Beh.*, 27, 291-297.
- ANGEL, I., TARANGER, M. A., CLAUSTRE, Y., SCATTON, B. & LANGER, S. Z. (1988): Anorectic Activities of Serotonin Uptake Inhibitors: Correlation with their potencies at inhibiting serotonin uptake in vivo and ³H-Mazindol binding in vitro. *Life Sciences*, vol 43, 651-658.
- ANGYAN, L. (1984): The Effects of Feeding and Fasting on Self Stimulation. *Acta Physiologica Hungarica*, 63 (3-4), 185-195.
- APFELBAUM, M. & MANDENOFF, A. (1981): Naltrexone Suppresses Hyperphagia Induced in the Cat by a Highly Palatable Diet. *Pharmacol. Bioch. & Beh.*, 15, 89-91.
- ARBISI, P. A., BILLINGTON, C. J. & LEVINE, A. S. (1998): The Effect of Naltrexone on Taste Detection and Recognition Threshold. *Appetite*, 32 (2), 241-249.
- ARNEDO, M., GALLO, M., AGÜERO, A. & PUERTO, A. (1990): Effects of Medullary Afferent Vagal Axotomy and Area Postrema Lesions on Short-Term and Long-Term NaCl-Induced Taste Aversion Learning. *Physiol. & Behavior*, 47, 1067-1074.
- ARNEDO, M., GALLO, M., AGÜERO, A. & PUERTO, A. (1991): Differential Effects of Subdiaphragmatic Vagotomy on NaCl-Induced Aversion Learning. *Behav. & Neural Biology* 55, 141-153.
- ARNEDO, M., GALLO, M., AGÜERO, A., MOLINA, F. & PUERTO, A. (1993): Medullary Afferent Vagal Axotomy Disrupts NaCl-Induced Short-Term Taste Aversion Learning. *Behav. & Neural Biology* 59, 69-75.

- ARNOULD, C. & 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. & 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. & SHIZGAL, P. (2000): Fos expression following Self-Stimulation of the Medial Prefrontal Cortex. *Behavioural Brain Research* 107, 123-132.
- AZZARA, A. V. & SCLAFANI, A. (1998). Flavor preferences conditioned by intragastric sugar infusions in rats: Maltose is more reinforcing than sucrose. *Physiol. Behav.*, 64, (4): 535-541.
- BACHEVALIER, J. & MISHKIN, M (1984): An early and a late developing system for learning and retention in infant monkeys. *Behav. Neuroscience* 98 (5), 770-778.
- BAIRD, J. P., TRAVERS, S.P. & TRAVERS, J. B. (2001): Integration of gastric distension and gustatory responses in the parabrachial nucleus. *American Journal of Physiology. Regul. Int. Comp. Physiol.* 281, R1568-1580.
- BAKER, R. W., OSMAN, J. & BODNAR, R. J. (2001): Differential actions of dopamine receptor antagonism in rats upon food intake elicited by either mercaptoacetate or exposure to a palatable high-fat diet. *Pharmacol. Biochemistry and Behavior* 69, 201-208.
- BAKSHI, V. & KELLEY, A. E. (1994): Sensitization and conditioning of feeding following multiple morphine microinjections into the Nucleus Accumbens. *Brain Research*, 648, 342-346.
- BALS-KUBIK, R., ABLEITNER, A., HERZ, A. & SHIPPENBERG, T. S. (1993): Neuroanatomical Sites Mediating the Motivational Effects of Opioids as Mapped by the Conditioned Place Preference Paradigm in Rats. *The J. of Pharmacol. & Exp Therap.*, 264 (1), 489-495.
- BARDO, M. T., & VALONE, J. M. (1994): Morphine-Conditioned Analgesia Using a Taste Cue: Dissociation of Taste Aversion and Analgesia. *Psychopharmacol.* 114, 269-274.
- BARNFIELD, A., PARKER, L. A., DAVIES, A. & MILES, C. (1994): Fenfluramine-Induced Modification of Palatability: Analysis by the Taste Reactivity Test. *Pharmacol. Bioch. & Beh.*, 48 (4), 875-879.
- BASBAUM, A. I. & BESSON, J. M. (1991): Towards a new pharmacology of pain. John Wiley.
- BASSO, A. M. & KELLEY, A. E. (1999). Feeding induced by GABA_A receptor stimulation within the nucleus accumbens shell: regional mapping and characterization of macronutrient and taste preference. *Behav. Neurosci.*, 113, (2): 324-336.
- BAUCO, P. & WISE, R. A. (1994): Potentiation of Lateral Hypothalamic and Midline Mesencephalic Brain Stimulation Reinforcement by Nicotine: Examination of Repeated Treatment. *The J. of Pharmacol. & Exp. Therap.* 271 (1), 294-301.
- BAUCO, P. & WISE, R. A. (1997): Synergistic Effects of Cocaine with Lateral Hypothalamic Brain Stimulation Reward: Lack of Tolerance or Sensitization. *The J. of Pharmacol. & Exp. Therap.* 283 (3), 1160-1167.
- BEAR, M. F., CONNORS, B. W. & PARADISO, A. A. (1998): Neurociencia. Explorando el Cerebro. Masson. Barcelona.

BIBLIOGRAFIA

-BECHARA, A. & VANDERKOOY, 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 J. of Neurosc.* 9 (10), 3400-3409.

-BECHARA, A. & VANDERKOOY, D. (1992a): A Single Brain Stem Substrate Mediates the Motivational Effects of Both Opiates and Food in Nondeprived Rats but not in Deprived Rats. *Behavioral Neuroscience*, 106 (2), 351-363.

-BECHARA, A. & VANDERKOOY, D. (1992b): Lesions of the Tegmental Pedunculopontine Nucleus: Effects on the Locomotor Activity Induced by Morphine and Amphetamine. *Pharmacol., Biochem. & Behav.* 42, 9-18.

-BECHARA, A. TRANEL, D., DAMASIO, H., ADOLPHS, R., ROCKLAND, C & DAMASIO, A (1995): Double Dissociation of Conditioning and Declarative Knowledge Relative to the Amygdala and Hippocampus in Humans. *Science* 269, 1115-1118.

-BECHARA, A., HARRINGTON, F., NADER, K. & VANDERKOOY, D. (1992): Neurobiology of Motivation: Dissociation of Two Motivational Mechanisms Mediating Opiate Reward in Drug-Naive versus Drug-Dependent Animals. *Behav. Neurosc.* 106 (5), 798-807.

-BECHARA, A., MARTIN, G.M., PRIDGAR, A. & VANDERKOOY, D. (1993): The Parabrachial Nucleus: A Brain-Stem Substrate Critical for Mediating the Aversive Motivational Effects of Morphine. *Behav. Neurosc.* 107(1), 147-160.

-BECHARA, A., NADER, K. & VAN DER KOOY, D. (1998): A two-separate Motivational Systems Hypothesis of Opioid Addiction. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 59 (1), 1-17.

-BELL, S.M., STEWART, R.B., THOMPSON, S.C. & MEISCH, R.A. (1997). Food-Deprivation Increases Cocaine- Induced Conditioned Place Preference and Locomotor activity in Rats. *Psychopharmacology*, 131, 1-8.

-BELLUZZI, J. D. & STEIN, L. (1982): Endorphin Mediation of Feeding. En: Hoebel, B. G. & Novin, D. (Eds.): The Neural Basis of Feeding and Reward, Haer Institute for Electrophysiol. Research., pp. 479-484.

-BERKE, J. D., HYMAN, S. E. (2000): Addiction, Dopamine and the Molecular Mechanisms of Memory. *Neuron*, 25, 515-532.

-BERMAN, Y., DEVI, L. & CARR, K. D. (1994): Effects of Chronic Food Restriction on Prodynorphin Derived Peptides in Rat Brain Regions. *Brain Res.* 664, 49-53.

-BERNARD, J. F., ALDEN, M. & 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 J. of Comparative Neurology*, 329, 201-229.

-BERNARD, J. F., CARROUÉ, J. & BESSON, J. M. (1991): Efferent Projections from the External Parabrachial Area to the Forebrain: A Phaseolus Vulgaris Leucoagglutinin Study in the Rat. *Neurosc. Letters* 122, 257-260.

-BERNARD, J. F., HUANG, G. F. & BESSON, J. M. (1994): The Parabrachial Area: Electrophysiological Evidence for an Involvement in Visceral Nociceptive Processes. *J. of Neurophysiol.* 71 (5), 1646-1660.

-BERNARD, J.F., DALLEL, R., RABOISSON, P., VILLANUEVA, L., 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 J. of Comp. Neurol.*, 353, 480-505.

- BERRIDGE, K. C. & PECIÑA, S. (1995): Benzodiazepines, Appetite, and Taste Palatability. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 19 (1), 121-131.
- BERRIDGE, K. C. & 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.
- BERRIDGE, K.C. (1988): Brainstem systems mediate the enhancement of palatability by chlordiazepoxide. *Brain Research*, 447, 262-268.
- BERRIDGE, K. C. (1996): Food reward: Brain substrates of wanting and liking. *Neuroscience and Biobeh. Reviews*, 20 (1), 1-25.
- BESPALOV, A., LEBEDEV, A., PANCHENKO, G. & ZVARTAU, E. (1999): Effects of abused drugs on thresholds and breaking points of intracranial self-stimulation in rats. *European Neuropsychopharmacology* 9, 377-383.
- BESSON, C. & LOUILOT, A. (1997): Striatal dopaminergic changes depend on the attractive or aversive value of stimulus. *Neuroreport* 8 (16), 3523-3526.
- BESSON, J.M. (1999). The Neurobiology of Pain. *The Lancet*, Vol.353, 1610-1615.
- BESSON, J.M., BESSE, D., & 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), Pages S67-S68.
- BESTER, H., BESSON, J. M. & BERNARD, J. F. (1997): Organization of Efferent Projections from the Parabrachial Area to the Hypothalamus: A Phaseolus Vulgaris-Leucoagglutinin Study in the Rat. *The J. of Comparative Neurology*, 383, 245-281.
- BESTER, H., MATSUMOTO, N., BESSON, J.M. & BERNARD, J. F. (1997): Further Evidence for the Involvement of the Spinoparabrachial Pathway in Nociceptive Processes: A c-Fos Study in the Rat. *The J. of Comp. Neurol.*, 383, 439-458.
- BESTER, H., MENENDEZ, L., BESSON, J. M. & BERNARD, J. F. (1995): Spino-(Trigemino-) Parabrachiohypothalamic Pathway: Electrophysiological Evidence for an Involvement in Pain Processes. *J. of Neurophysiol.* 73 (2), 568-585.
- BEVERLY, J. L., YANG, Z.-J., MEGUID, M. M. (1994). Factors influencing compensatory feeding during parenteral nutrition in rats. *American Journal of Physiology*, 266, (35): R1928-R1932.
- BIELAVSKA, E. & BURES, J. (1994): Universality of Parabrachial Mediation of Conditioned Taste Aversion. *Behavioural Brain Res.* 60, 35-42.
- BIELAVSKA, E. , MIKSIK, I. & KRIVANEK, J. (2000): Glutamate in the Parabrachial Nucleus of Rats during Conditioned Taste Aversion. *Brain Research*, 887, 413-417.
- BIGELOW, G. E., BROONER, R. K. & SILVERMAN, K. (1998): Competing motivations: drug reinforcement vs. non-drug reinforcement. *J. of Psychopharmacology* 12 (1): 8-14.
- BINDRA, D. (1974): A Motivational View of Learning, Performance, and Behavior Modification. *Psychological Review* 81 (3), 199-213.
- BLOOM, F.E. (1997). The Science of Substance Abuse. *Science*, Vol.278, 15.
- BODNAR, R. (1996): Opioid Receptor Subtype Antagonists and Ingestion. En: Cooper, S. J. & Clifton, P. G. : Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behavior. Academic Press, pp.127-146.

BIBLIOGRAFIA

- BODNAR, R. J., GLASS, M. J., RAGNAUTH, A. & 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.
- BOLLES, R. C. (1985): Introduction: Associative Processes in the Formation of Conditioned Food Aversions: An Emerging Functionalism?. En: Annals of the N. York Academy of Sciences vol 443, pp. 1-7.
- BOOTH, D. A. (1985): Food-Conditioned Eating Preferences and Aversions with Interoceptive Elements: Conditioned Appetites and Satiety. En: Annals of the New York Academy of Sciences vol 443, pp. 22-41.
- BRADLEY, K. C. & 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 Hamster. *The J. of Neuroscience*, 21 (6), 2123-2130.
- BRANDÃO, M. L., ANSELONI, V. Z., PANDOSSIO, J. E., DE ARAUJO, J.E. & CASTILHO, V. M. (1999): Neurochemical mechanisms of the Defensive Behavior in the Dorsal Midbrain. *Neurosc. & Biobeh. Reviews* 23, 863-875.
- BRAY, G. A. (2000): Afferent signals regulating food intake. *Proc. Nutr. Soc.* 59 (3), 373-384.
- BUIJS, R. M., CHUN, S. J., NIJIMA, A., ROMLIN, H. J. & NAGAI, K. (2001): Parasympathetic and Sympathetic Control of the Pancreas: A Role for the Suprachiasmatic Nucleus and Other Hypothalamic Centres that are Involved in the Regulation of Food Intake. *The J. of Comparative Neurology* 431, 405-423.
- BURDICK, K., YU, W. Z., RAGNAUTH, A., MOROZ, M., PAN, Y. X., ROSSI, G. C., PASTERNAK, G. W., BODNAR, R. J. (1998): Antisense mapping of opioid receptor clones: effect upon 2-deoxy-D-glucose induced hyperphagia. *Brain Research*, 794, 359-363.
- BURES, J., BERMUDEZ-RATTONI, F. & YAMAMOTO, T. (1998): Conditioned Taste Aversion: Memory of a special kind. O.U.P. Oxford.
- BURITOVA, J., BESSON, J. M. & BERNARD, J. M. (1998): Involvement of the Spinoparabrachial Pathway in Inflammatory Nociceptive Processes: A c-Fos Protein Study in the Awake Rat. *The J. of Comp. Neurol.*, 397, 10-28.
- BURTON, M. J., MORA, F. & ROLLS, E. T. (1976): Neurophysiological Convergence of Natural and Self-Stimulation Reward on Visual Units in the Lateral Hypothalamus of Squirrel and Rhesus Monkeys. En: Wauquier, A. & Rolls, E. T. (Eds): Brain-Stimulation Reward, North-Holland Publ. Comp.
- C.-Y.-CHIANG, SESSLE, BJ & HU, JW (1995): Parabrachial Area and N. Rafe Magnus-Induced Modulation of Electrically Evoked Trigeminal Subnucleus Caudalis Neuronal Responses to Cutaneous or Deep-A-fiber and C-fiber Inputs in Rats. *Pain* 62,61-68.
- CABANAC, M. (1971): Physiological Role of Pleasure. *Science*, 173, 1103-1107.
- CABEZA DE VACA, S., HOLIMAN, S. & CARR, K.D. (1998). A Search for the Metabolic Signal That Sensitizes Lateral Hypothalamic Self-Stimulation in Food -restricted Rats. *Physiology & Behaviour*, 64 (3), 251-260.
- CALCAGNETTI, D.J. & SCHECHTER, M.D. (1994). Nicotine Place Preference Using The Biased Method of Conditioning. *Progress Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psychiat.* Vol.18, 925-933.

- CALDER, A. J., LAWRENCE, A. D. & YOUNG, A. W. (2001): Neuropsychology of fear and Loathing. *Nature Reviews*, 2, 352-363.
- CALINGASAN, N. Y. & RITTER, S. (1993): Lateral Parabrachial Subnucleus Lesions Abolish Feeding Induced by Mercaptoacetate but not by 2-deoxy-D-glucose. *Am. J. Physiol.*, 265 (34), R1168-R1178.
- CAMPFIELD, L. A. & SMITH, F. J. (1990): Systemic Factors in the Control of Food Intake. En: Stricker, E. M. (Ed.), Handbook of Behavioural Neurobiology: Neurobiology of Food and Fluid Intake, Vol. 10, Plenum Press, pp. 183-206.
- CAMPFIELD, L. A., SMITH, F. J., ROSENBAUM, M. & HIRSCH, J. (1996): Human Eating: Evidence for a Physiological Basis Using a Modified Paradigm. *Neuroscience and Biobehavioral Rev.* 20 (1), 133-137.
- CAPDEVILA-ORTIS, L., SEGURA-TORRES, P. & MORGADO-BERNAL, I. (1988): Implicación del Sustrato Nervioso del Refuerzo en los Procesos de Aprendizaje Memoria. *Arch. de Neurobiología*, 51(5), 269-277.
- CARELLI, R.M., IJAMES, G. & CRUMLING, A.J. (2000). Evidence That Separate Neural Circuits in the Nucleus Accumbens Encode Cocaine Versus “Natural” (Water and Food) Reward. *The Journal of Neuroscience*, 20 (11), 4255-4266.
- CARLSON, N. R. (1993): Fisiología de la Conducta. Ariel (1ª edic.).
- CARR, K. D. & 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. (1996): Opioid Receptor Subtypes and Stimulation-Induced Feeding. En: Cooper, S. J. & Clifton, P. G. : Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behavior. Academic Press, pp. 167-191.
- CARR, K. D. (2002): Augmentation of drug reward by chronic food restriction: Behavioral evidence and underlying mechanism. *Physiology & Behavior*, 76, 353-364.
- CARR, K. D., ALEMAN, D. O., BAK, T. H. & SIMON, E. J. (1991): Effects of Parabrachial Opioid Antagonism on Stimulation-Induced Feeding. *Brain Res.* 545, 283-286.
- CARR, K.D. & KIM, G.Y. (2000). Chronic Food Restriction in Rats Augments the Central Rewarding Effect of Cocaine and δ_1 Opioid Agonist, DPDPE, but not the δ_2 Agonist, Deltorphin-II. *Psychopharmacology*, 152, 200-207.
- CARR, K.D. & 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., KIM, G.Y. & CABEZA DE VACA, S. (2001) Rewarding and Locomotor-Activating effects of Direct Dopamine Receptor Agonists Are Augmented by Chronic Food Restriction in Rats. *Psychopharmacology*, 154, 420-428.
- CARR, K.D., KUTCHUKHIDZE, N. & PARK, T.H. (1999). Differential Effects of μ and κ Opioid Antagonists on Fos-like Immunoreactivity in Extended amygdala. *Brain Research*, 822, 34-42.
- CARR, K.D., PARK, T.H. & 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.

BIBLIOGRAFIA

- CARROLL, M. E., FRANCE, C. P. & MEISCH, R. A. (1979): Food deprivation increases oral and intravenous drug intake in rats. *Science* 205, 319-321.
- CARROLL, M. E. & MEISCH, R. A. (1980a): Oral Phencyclidine (PCP) self-administration in Rhesus Monkeys: effects of feeding conditions. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 214, 339-346.
- CARROLL, M. E. & MEISCH, R. A. (1980b): The effects of feeding conditions on drug-reinforced behavior: maintenance at reduced body weight versus availability of food. *Psychopharmacology* 68, 121-124.
- CARROLL, M. E. & MEISCH, R. A. (1981): Determinants of Increased Drug Self-Administration Due to Food Deprivation. *Psychopharmacology*, 74, 197-200.
- CASSELL, M. D., FREEDMAN, L. J. & SHI, C. (1999): The Intrinsic Organization of the Central Extended Amygdala. En: Annals of the New York Academy of Sciences, 877, 217-241.
- CECIL, J. E., FRANCIS, J. & READ, N. W. (1998): Relative Contributions of Intestinal, Gastric, Oro-sensory Influences and Information to Changes in Appetite Induced by the Same Liquid Meal. *Appetite* 37, 377-390.
- CHAMBERLIN, N. L. & 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. & SAPER, C. B. (1999): Localization of mu-opioid receptors on amygdaloid projection neurons in the Parabrachial Nucleus of the rat. *Brain Reseach*, 827, 198-204.
- CLAVIER, R. M. (1976): Brain Stem Self-Stimulation: Catecholamine or Non-Catecholamine Mediation?. En: Wauquier, A. & Rolls, E. T. (Eds): Brain-Stimulation Reward, North-Holland Publ. Comp.
- CLEARY, J., WELDON, D. T., O'HARE, E., BILLINGTON, C & LEVINE, A. S. (1996): Naloxone effects on sucrose-motivated behavior. *Psychopharmacology*, 126, 110-114.
- COOPER, S. J. & CLIFTON, P. G. (1996): Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behavior. Academic Press.
- COOPER, S. J. & HIGGS, S. (1994): Neuropharmacology of Appetite and Taste Preferences. En: Legg, C. R. & Booth, D. A. (Eds.) Appetite: Neural and Behavioural Bases, OUP, pp. 212-241.
- COOPER, S. J. & HIGGS, S. (1996): Benzodiazepine Receptors and the Determination of Palatability. En: Cooper, S. J. & Clifton, P. G. : Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behavior. Academic Press, pp. 347-368.
- COOPER, S. J., JACKSON, A. & KIRKHAM, T. C. (1985): Endorphins and Food Intake: Kappa Opioid Receptor Agonists and Hyperphagia. *Pharmacol. Bioch. & Beh.*, 23, 889-901.
- CORP, E. S. (1996): The Receptor Basis of Neuropeptide Y-induced Food Intake. En: Cooper, S. J. & Clifton, P. G. : Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behavior. Academic Press, pp. 323-346.
- CRAIG, A. D. & DOSTROVSKY, J. O. (1999): Medulla to Thalamus. En: Wall, P. D. & Melzack, R (Eds): Textbook of Pain, Fourth Edit. Churchill Livingstone.
- CROW, T. J. (1976): Specific Monoamine Systems as Reward Pathways: evidence for the Hypothesis that Activation of the Ventral Mesencephalic Dopaminergic Neurons and Noradrenergic Neurons of the Locus Coeruleus Complex will support Self-Stimulation Responding. En: Wauquier, A. & Rolls, E. T. (Eds): Brain-Stimulation Reward, North-Holland Publ. Comp.

- CRUZ, A. & GREEN, B. G. (2000): Thermal stimulation of taste. *Nature* 403, 889-892.
- CRYSTAL, S., FRYE, C. A. & KANAREK, R. B. (1995): Taste Preferences and Sensory Perceptions in Female Varsity Swimmers. *Appetite* 24, 25-36.
- CUBERO, I. & PUERTO, A. (2000 a): Electrical Stimulation of the Insular Cortex induces flavor-preferences in rats. *Brain Research*, 872, 134-140.
- CUBERO, I. & PUERTO, A. (2000b): Lateral Parabrachial Lesions impair intraperitoneal but not intraventricular methylscopolamine-induced Taste Aversion Learning. *Brain Research*, 871, 113-119.
- CUBERO, I. (1995): Tesis Doctoral.
- CUBERO, I., LOPEZ, M., NAVARRO, M. & PUERTO, A. (2001): Lateral Parabrachial lesions impair taste aversion learning induced by blood-borne visceral stimuli. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior* 69, 157-163.
- CURRAN, T. & MORGAN, J. I. (1986): Barium modulates c-fos expression and post-translational modification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 8521-8524.
- CURRIE, P. J. (1996): Medial Hypothalamic α_2 -Adrenergic and Serotonergic Effects on Ingestive Behavior. En: Cooper, S. J. & Clifton, P. G. : Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behavior. Academic Press, pp. 285-300.
- D'ANCI, K. E., KANAREK, R. B. & MARKS-KAUFMAN, R. (1997): Beyond Sweet Taste: Saccharin, Sucrose, and Polycose Differ in their Effects upon Morphine-Induced Analgesia. *Pharmacol. Biochem. and Behavior*, 56 (3), 341-345.
- DALAL, S. & MELZACK, R. (1998). Potentiation of Opioid Analgesia by Psychostimulant Drugs: A Review. *Journal of Pain Symptom Management*, 16(4), 245-253.
- DAVIS, B. J. (1991): The Ascending Gustatory Pathway: A Golgi Analysis of the Medial and Lateral Parabrachial Complex in the Adult Hamster. *Brain Res. Bull.* 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. & BALLEINE, B. W. (2002): Reward, Motivation, and Reinforcement Learning. *Neuron*, 36, 10 (2), 241-254.
- DE GROOT, J. (1959): The Rat Forebrain in stereotaxic coordinates. *Verhandelingen der Koninklijke Nederlandsche Akademie van Wetenschappen, Afdeling Natuurkunde. Tweede Reeks*, 52, 1-40.
- DE LA CALLE, S., SAPER, C. R. (2000): Calcitonin Gene-Related Peptide-Like Immunoreactivity marks putative visceral sensory pathways in human brain. *Neuroscience*, 100 (1), 115-130.
- DE VRIES, T. & SHIPPENBERG, T.S. (2002). Neural Systems Underlying Opiate Addiction. *The Journal of Neuroscience*, 22(9), 3321-3325.
- DE VRY, J. & SCHREIBER, R. (2000). Effects of selected serotonin 5-HT₁ and 5-HT₂ receptor agonist on feeding behavior: possible mechanisms of action. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 24, (3): 341-353.
- DERRIEN, M., NOBLE, F., MALDONADO, R. & ROQUES, B.P. (1993). Cholecystokinin- A but Not Cholecystokinin- B Receptor Stimulation Induces Endogenous Opioid-Dependent Antinociceptive Effects in the Hot Plate Test in Mice. *Neuroscience Letters*, 160, 193-196.

BIBLIOGRAFIA

- DEUTSCH, J. A. & AHN, S. J. (1986): The Splachnic Nerve and Food Intake Regulation. *Behavioral and Neural Biology* 45, 43-47.
- DEUTSCH, J. A. & GONZALEZ, M. F. (1980): Gastric Nutrient Content Signals Satiety. *Behav. and Neural Biology*, 30, 113-116.
- DEUTSCH, J. A. & HARDY, W. T. (1977). Chelecystokinin produces bait shyness in rats. *Nature*, 266, 196.
- DEUTSCH, J. A. & TABUENA, J. A. (1986): Learning of Gastrointestinal Satiety Signals. *Behavioral and Neural Biology*, 45, 292-299.
- DEUTSCH, J. A. (1982): Controversies in Food Intake. En: Hoebel, B. G. & Novin, D. (Eds.): The Neural Basis of Feeding and Reward, Haer Institute for Electrophisiol. Research., pp. 137-148.
- DEUTSCH, J. A. (1990): Food Intake. Gastric Factors. En: Stricker, E. M. (Ed.) Handbook of Behavioural Neurobiology: Neurobiology of Food and Fluid Intake , Vol. 10, Plenum Press, pp. 151-182.
- DEUTSCH, J. A., DAVIS, J. K. & CAP, M. (1976): Conditioned Taste Aversion: Oral and Postingestional Factors. *Behav. Biology*, 18, 545-550.
- DEUTSCH, J. A., MOLINA, F. & PUERTO, A. (1976): Conditioned Taste Aversion Caused by Palatable Non Toxic Nutrients. *Beh. Biol.* 16, 161-174.
- DI CHIARA, G. & NORTH, A. (1992). Neurobiology of Opiate Abuse. *Trends in Pharmacological Sciences*, Vol.13,185-192.
- DI CHIARA, G. (1998): A Motivational Learning Hypothesis of the Role of Mesolimbic Dopamine in Compulsive Drug Use. *J. of Psychopharmacol.* 12 (1), 54-67.
- DI CHIARA, G. (1999): Drug Addiction as Dopamine-Dependent Associative Learning Disorder. *Europ. J. Pharmacol.*, 375, 13-30.
- DICKINSON, A. & BALLEINE, B (1994): The role of Cholecystokinin in the motivational control of instrumental action in rats. *Behav. Neurosc.* 108 (3), 590-605.
- DI LORENZO, P. M. & MONROE, S. (1992): Corticofugal Input to Taste Responsive Units in the Parabrachial Pons. *Brain Res. Bull.* 29, 925-930.
- DI LORENZO, P. M. & 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.
- DI LORENZO, P. M. (1988): Long-delay learning in rats with Parabrachial Pontine Lesions. *Chemical Senses* 13 (2), 219-229.
- DING, Y. Q., KANEKO, T., NOMURA, S. & MIZUNO, N. (1996): Immunohistochemical Localization of μ -Opioid Receptors in the Central Nervous System of the Rat. *The J. of Comp. Neurol.*, 367, 375-402.
- DIOTTE, M., BIELAJEW, C., MIGUELEZ, M. & MILIARESSIS, E. (2001) Factors that Influence the Persistence of Stimulation-Induced Aversion. *Physiology & Behavior*, 72, 661-667.
- DIOTTE, M., MIGUELEZ, M., MILIARESSIS, E. & BIELAJEW, C. (2000): Interactions between Rewarding Lateral Hypothalamic and Aversive Nucleus Reticularis Gigantocellularis Stimulation. *Behavioural Brain Research* 116, 149-156.

- DOGTERON, G. J. & VAN HOFF, H. W. (1988): Attenuation of Neophobia and Conditioned Taste Aversion in the Rabbit. *Beh. Brain Res.*, 28, 253-257.
- DOMJAN, M. & BURKHARD, B. (1990): Principios de Aprendizaje y de Conducta, Ed. Debate.
- 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. & GOSNELL, B. A. (1993): Morphine enhances hedonic taste palatability in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 46 (3), 745-749.
- DRAGUNOW, M. & FAULL, R. (1989): The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J. of Neuroscience Methods*, 29, 261-265.
- DREWNOWSKI, A. (1997). Taste Preferences and Food Intake. *Annual Rev. Nutrition.*, 17, 237-253.
- DREWNOWSKI, A., KRAHN, D. D., DEMITRACK, M. A., NAIRN, K. & GOSNELL, B. A. (1992): Taste Responses and Preferences for Sweet High-Fat Foods: Evidence for Opioid Involvement. *Physiol. & Beh.* 51, 371-379.
- DREWNOWSKY, A. (1998): Energy Density, Palatability and Satiety: Implications for Weight Control. *Nutrition Reviews*, 56 (12), 347-353.
- DUM, J., GRAMSCH, CH. & HERZ, A. (1983). Activation of Hypothalamic β -Endorphin Pools by Reward Induced by Highly Palatable Food. *Pharmacol. Biochemistry and Behavior*, 18, 403-414.
- DUNBAR, J. S., HITCHCOCK, K., LATIMER, M., RUGG, E. L., WARD, N. & WINN, P. (1992): Excitotoxic Lesions of the Pedunculopontine Tegmental Nucleus of the Rat. II. Examination of Eating and Drinking, Rotation, Reaching and Grasping Following Unilateral Ibotenate or Quinolate Lesions. *Br. Res.*, 589, 194-206.
- DUNN, L. T. & EVERITT, B. J. (1988): Double Dissociations of the Effects of Amygdala and Insular Cortex Lesions on Conditioned Taste Aversion, Passive Avoidance and Neophobia in the Rat Using the Excitotoxin Ibotenic Acid. *Beh. Neurosc.*, 102 (1), 3-23.
- DUVAUCHELLE, C. L. & ETTENBERG, A. (1991): Haloperidol attenuates conditioned place preferences produced by electrical stimulation of the medial prefrontal cortex. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 38, 645-650.
- EASTERLING, K. W. & HOLTZMAN, S. G. (1997): Intracranial Self-Stimulation in Rats: Sensitization to an Opioid Antagonist Following Acute or Chronic Treatment with mu opioid agonists. *The J. of Pharmacol. and Exp. Therapeutics*, 281, 188-199.
- EDWARDS, G. L. & RITTER, R. C. (1989): Lateral Parabrachial Lesions Attenuate Ingestive Effects of Area Postrema Lesions. *Am. J. of Physiol.*, 256, R306-R312.
- EDWARDS, G.L. & JOHNSON, A.J. (1991). Enhanced Drinking After Excitotoxic Lesions of the Parabrachial Nucleus in the Rat. *The American J. of Physiology*, 261 (4) R1039-R1044.
- EICHENBAUM, H. (1999). The Hippocampus and Mechanisms of Declarative Memory. *Behavioural Brain Research*, 103, 123-133.
- EICHEMBAUM, H. (2001). The Hippocampus and Declarative Memory: Cognitive Mechanisms and Neural Codes. *Behavioural Brain Research*, 127, 199-207.

BIBLIOGRAFIA

- EICHENBAUM, H. (2002): The Cognitive Neuroscience of Memory: An Introduction, OUP.
- ELIAS, C. F., KELLY, . F., LEE, C. E., AHIMA, R. S., DRUCKER, D. J., SAPER, C. B. & ELMQUIST, J. K. (2000): Chemical Characterization of Leptin-Activated Neurons in the Rat Brain. *The J. of Comparative Neurology*, 423, 261-281.
- ELIZALDE, G. & SCLAFANI, A. (1990): Flavor Preferences Conditioned by Intragastric Infusions: A Detailed Analysis Using an Electronic Esophagus Preparation. *Physiol. & Beh.*, 47, 63-77.
- ELMQUIST, J. K., AHIMA, R. S., MARATOS-FLIER, FLIER, J. S. & SAPER, C. B. (1997): Leptin Activates Neurons in Ventrobasal Hypothalamus and Brainstem. *Endocrinology*, 138, 2, 839-842.
- ELMQUIST, J. K., MARATOS-FLIER, E., SAPER, C. B. & FLIER, J. S. (1998). Unraveling the central nervous system pathways underlying responses to leptin. *Nature Neurosci.*, 1, (6): 445-450.
- ENGSTRÖM, L., ENGBLOM, D., ÖRTEGREN, U., MACKERLOVA, L., PAUES, J. & BLOMQUIST, A. (2001): Preproenkephalin mRNA expression in rat Parabrachial Neurons: relation to cells activated by systemic immune challenge. *Neuroscience Letters*, 316, 165-168.
- ERB, S., SALMASO, N., RODAROS, D. & STEWART, J. (2001). A Role for the CRF-Containing Pathway from the Central Nucleus of the Amygdala to Bed Nucleus of the Stria Terminalis in the Stress-Induced Reinstatement of Cocaine Seeking in Rats. *Psychopharmacology*, 158, 360-365.
- ETTENBERG, A. (1989): Dopamine, Neuroleptics and Reinforced Behavior. *Neurosc. & Biobeh. Reviews*, 13, 105-111.
- ETTENBERG, A., PETTIT, H.O., BLOOM, F.E. & KOOB, G.F. (1982): Heroin and Cocaine intravenous self-administration in rats: Mediation by separate neural systems. *Psychopharmacology* 78, 204-209.
- EVANS, K. R. & 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. & WOLF, M.E. (2002). Psychomotor Stimulant Addiction: A Neural Systems Perspective. *The Journal of Neuroscience*, 22(9), 3312-3320.
- FAY, R. & KUBIN, L. (2000): Pontomedullary Distribution of 5-HT_{2a} Receptor-Like Protein in the Rat. *The J. of Comparative Neurology*, 418, 323-345.
- FENU, S., BASSAREO, V. & DI CHIARA, G. (2001). A Role of Dopamine D1 Receptors of the Nucleus Accumbens Shell in Conditioned Taste 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. & VELLELY, L. (1987): Electrical Self-Stimulation in the Parabrachial Area is Depressed after Ibotenic Acid Lesion of the Lateral Hypothalamus. *Behav. Brain Res.*, 25, 109-116.
- FIELDS, H.L. & BASBAUM A.I. (1999). Central Nervous System Mechanisms of Pain Modulation. En: Wall, P.D.& Melzack, R. (Eds.): Textbook of Pain, Fourth Edit. Churchill Livingstone.
- FIGLEWICZ, D. P. & WOODS, S. C. (2000): Adiposity signals and brain reward mechanism. *Trends in Pharmacol. Sciences* 21, 235-236.

- FIGLEWICZ, D. P., SCHWARTZ, M. W., SEELEY, R. J., CHAVEZ, M., BASKIN, D. G., WOODS, S. C. & PORTE, D. (1996). Endocrine regulation of food intake and body weight. *J. Lab. Clin. Med.*, 127, (4): 328-332.
- FLORES, C., ARVANITOGIANNIS, A. & 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. W. & GRILL, H. J. (1983): Insulin Elicits Ingestion in Decerebrate Rats. *Science*, 221, 188-190.
- FOURIEZOS, G. & RANDALL, D. (1997): The cost of delaying rewarding brain stimulation. *Behavioural Brain Research*, 87, 111-113.
- FOWLER, J. S., VOLKOW, N. D., MALISON, R. & GATLEY, S. J. (1999): Neuroimaging studies of Substance Abuse Disorders. En: Charney, D. S., Nestler, E. J. & Bunney, B. S. Neurobiology of Mental Illness. Oxford University Press. N.Y.
- FRANK, R. A. (2000): Tepid tastes. *Nature* 403, 837-839.
- FRANKLIN, K.B.J. (1998). Analgesia and Abuse Potential: An Accidental Association or a Common Substrate?. *Pharmacol. Bioch. & Beh.*, 59 (4), 993-1002.
- FRASER, K. A., RAIZADA, E. & DAVISON, J. S. (1995). Oral-pharyngeal-esophageal and gastric cues contribute to meal-induced c-fos expression. *Am. J. Physiol.*, 268, (37): R223-R230.
- FRAZER, A. & HENSLER, J. G. (1994): Serotonin. En: Siegel, G. J., Agranoff, B. W., Albers, R. W. & Molinoff, P. B. (Eds.), Basic Neurochemistry (5ª Edic.) Raven Press, pp. 283-308.
- FRIEDMAN, J. M. & HALAAS, J. L. (1998): Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395, 763-770.
- FRIEDMAN, J. M. (1998): Leptin, Leptin Receptors, and the Control of Body Weight. *Nutrition Reviews*, 56 (2), S38-S46.
- FRIEDMAN, M. I., HARRIS, R.B., JI, H., RAMIREZ, I. & TORDOFF, M. G. (1999): Fatty acid oxidation affects food intake by altering hepatic energy status. *The American J. of Physiol.*, 276 (4), R1046-R1053.
- FRIEDMAN, M. I., TORDOFF, M. G. & RAMIREZ, I. (1986): Integrated Metabolic Control of Food Intake. *Brain Res. Bull.*, 17, 855-859.
- FUJIWARA, T., NAGAI, K., TAKAGI, S. & NAKAGAWA, H. (1988): Hyperglycemia Induced by Electrical Stimulation of Lateral Part of Dorsal Parabrachial Nucleus. *Am. J. Physiol.*, 254 (4), E468-E475.
- FULWILER, C. E. & SAPER, C. B. (1984): Subnuclear Organization of the Efferent Connections of the Parabrachial Nucleus in the Rat. *Brain Res. Rev.*, 7, 229-259.
- GAGIN, R., COHEN, E. & SHAVIT, Y. (1996). Prenatal Exposure to Morphine alters Analgesic Responses and Preference for Sweet Solutions in Adult Rats. *Pharmacol. Bioch. & Beh.*, Vol.55, N°4, 629-634.
- GAIARDI, M., BARTOLETTI, M, BACCHI, GUBELLINI, C. & BABBINI, M. (1997). Motivational Properties of Buprenorphine as Assessed by Place and Taste Conditioning in Rats. *Psychopharmacology*, 130, 104-108.

BIBLIOGRAFIA

- GALLISTEL, C. R. & BEAGLEY, G. (1971): Specificity of Brain-Stimulation Reward in the Rat. *J. Comp. & Physiol. Psychol.* 76, 199-205.
- GALLISTEL, C. R. (1976): Spatial and Temporal Summation in the Neural Circuit Subservicing Brain-Stimulation Reward. En: Wauquier, A. & Rolls, E. T. (Eds): Brain-Stimulation Reward, North-Holland Publ. Comp.
- GALLISTEL, C. R. (1978): The Irrelevance of Past Pleasure. *Behav. and Brain Sciences*, 1, 59-60.
- GALLISTEL, C.R. & KARRAS, D. (1984): Pimozide and Amphetamine have Opposing Effects on the Reward Summation Function. *Pharmacol., Bioch. & Beh.* 20, 73-77.
- GALLISTEL, C.R., LEON, M., LIM, B.T., SIM, J.C. & WARACZYNSKI, M. (1996): Destruction of the Medial Forebrain Bundle Caudal to the Site of Stimulation Reduces Rewarding Efficacy but Destruction Rostrally Does Not. *Beh. Neurosc.* 110 (4), 766-790.
- GALLO, M. & BURES, J. (1991): Acquisition of Conditioned Taste Aversion in Rats is Mediated by Ipsilateral Interaction of Cortical and Mesencephalic Mechanisms. *Neurosc. Lett.* 133, 187-190.
- GALLO, M. & PUERTO (1986): Efectos Diferenciales de las Lesiones del Area Postrema (AP) durante el Aprendizaje Interoceptivo (AI) Inducido por Rotación. *Rev. de Psicol. General y Aplicada*, 43 (3), pp. 495-502.
- GALLO, M., ARNEDO, M., AGÜERO, A. & PUERTO, A. (1988): Electrical Intracerebral Stimulation of the Area Postrema on TAL. *Beh. Brain Res.* 30, 289-296.
- GALLO, M., ARNEDO, M., AGÜERO, A. & PUERTO, A. (1990): The Functional Relevance of the Area Postrema in Drug-Induced Aversion Learning. *Pharmacol. Bioch. & Beh.*, 35, 543-551.
- GALLO, M., ARNEDO, M., AGÜERO, A. & PUERTO, A. (1991): Participation of the A P in Learned Aversions Induced by Body Rotation. *Behav. Brain Res.*, 42, 13-23.
- GAMZU, E., VINCENT, G. & 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.
- GANG, S., NAKAZONO, Y. & AOKI, N. (1993): Differential Projections to the Raphe Nuclei from the Medial Parabrachial-Kolliker-Fuse (NPBM-KF) Nuclear Complex and the Retrofacial Nucleus in Cats: Retrograde WGA-HRP tracing. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 47 (3), 241-244.
- GARCIA, J., ERVIN, F. L. & KOELLING, R. A. (1965): Learning with Prolonged Delay of Reinforcement. *Psychon. Sci.*, 5, 121-122.
- GARCIA, J., LASITER, P. A., BERMUDEZ-RATTONI, F. & DEEMS, D. A. (1985): A General Theory of Aversión Learning. En: Annals of the New York Academy of Sciences , vol 443, pp. 8-21.
- GARCÍA-PÉREZ, R. (2001): Efecto de la Estimulación Eléctrica de la Corteza Cerebral Visceral: Estudio Farmacológico y Comportamental. Proyecto de Iniciación a la Investigación. Universidad de Granada.
- GARRIS, P. A., KILPATRICK, M., BUNIN, M. A., MICHAEL, D., WALKER, D. & 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. *Physiol. Psychol.*, 6, 340-353.

- GAURIAU, C. & BERNARD, J. F. (2002): Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp. Physiol.* 87 (2), 251-258.
- GAYLE, D., ILYIN, E., FLYNN, M.C., PLATA-SALAMAN, C.R. (1998). Lipopolysaccharide (LPS) -and Muramyl dipeptide (MDP)- Induced anorexia During refeeding Following acute Fasting: Characterization of Brain Cytokine and Neuropeptide Systems mRNAs. *Brain Research*, 795, 77-86.
- GE, J., BARNES, N.M., COSTALL, B. & NAYLOR, R. (1997). Effect of Aversive Stimulation on 5-Hydroxy-tryptamine and Dopamine Metabolism in the Rat Brain. *Pharmacol. Biochemistry and Behavior*, 7(2),775-783.
- GEAR, R.W., ALEY, K.O. & LEVINE, J.D. (1999). Pain-Induced Analgesia Mediated by Mesolimbic Reward Circuits. *The Journal of Neuroscience*, 19(16), 7175-7181.
- GEEN, R. G., BEATTY, W. W. & ARKIN, R. M. (1984): Human Motivation, Allyn and Bacon.
- GERRITS, M.A.F.M., PETROMILLI, P., WESTENBERG, H.G.M., DI CHIARA, G. & VAN REE J.M. (2002). Decrease in Basal Dopamine Levels in the Nucleus Accumbens Shell During Daily Drug-seeking Behaviour in Rats. *Brain Research*, 924 (2) 141-150.
- GIBBS, J., SMITH, G. P. & GREENBERG, D. (1993): Cholecystokinin: A Neuroendocrine Key to Feeding Behavior. En: Schulkin, J. (Ed.), Hormonally Induced Changes in Mind and Brain , Academic Press. Cap. 2, pp. 51-70.
- GIEROBA, Z. J. & 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. & 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. & 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. & LEVINE, A.S. (1998b). Association Between the Amygdala and Nucleus of the Solitary Tract in μ -Opioid Induced feeding in the Rat. *Brain Research*, 802, 184-188.
- GLASS, M. J., O'HARE, E., CLEARY, J. P., BILLINGTON, C. J. & LEVINE, A. S. (1999): The Effect of Naloxone on food-motivated behavior in the obese Zucker rat. *Psychopharmacology*, 141, 378-384.
- GOLDBERG, J. (1989): Las endorfinas Ed. Gedisa.
- GONZALEZ, M. F. & DEUTSCH, J. A. (1981): Vagotomy Abolishes Cues of Satiety Produced by Gastric Distension. *Science*, 212, 1283-1284.
- GONZALEZ, M. F., SHARP, F.R. & DEUTSCH, J. A. (1986): Gastric distension increases [14 C]2-deoxyglucose uptake in the rat nucleus tractus solitarius. *Brain Res.*, 369, 395-399.
- GOSNELL, B. A. & LEVINE, A. S. (1996): Stimulation of Ingestive Behaviour by Preferential and Selective Opioid Agonists. En: Cooper, S. J. & Clifton, P. G. : Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behavior . Academic Press, pp. 147-166.

BIBLIOGRAFIA

- GOSNELL, B. A. & MAJCHRZAK, M. J. (1989): Centrally Administered Opioid Peptides Stimulate Saccharin Intake in Nondeprived Rats. *Pharmacol. Bioch. & Beh.*, 33, 805-810.
- GOSNELL, B. A., MORLEY, J. E. & LEVINE, A. S. (1986): Opioid-Induced Feeding: Localization of Sensitive Brain Sites. *Brain Res.* 369, 177-184.
- GOSNELL, B.A., KRAHN, D.D. & MAJCHZAK, M.J. (1990). The Effects of Morphine on Diet Selection Are Dependent Upon Baseline Diet Preferences. *Pharmacol. Biochemistry and Behavior*, 37, 207-212.
- GRIGSON, P. S., SPECTOR, A. C. & NORNGREN, R (1994): Lesions of the Pontine Parabrachial Nuclei Eliminate Successive Negative Contrast Effects in Rats. *Behavioral Neuroscience*, 108 (4), 714-723.
- GRIGSON, P.S. (1997). Conditioned Taste Aversions and Drugs of Abuse: A Reinterpretation. *Behavioral Neuroscience*, 111(1), 129-136.
- GRILL H. J., FRIEDMAN, M. I., NORNGREN, R., SCALERA, G. & SEELEY, R. (1995): Parabrachial Nucleus Lesions impair feeding response elicited by 2,5-anhydro-D-mannitol. *Am. J. Physiol.*, 268 (37), R676-R682.
- GRILL, H. J. & KAPLAN, J. M. (1990): Caudal Brainstem Participates in the Distributed Neural Control of Feeding. En: Stricker, E. M. (Ed.), Handbook of Behavioural Neurobiology: Neurobiology of Food and Fluid Intake , Vol. 10, Plenum Press, pp. 125-149.
- GRILL, H. J. & KAPLAN, J. M. (1992). Sham feeding in intact and chronic decerebrate rats. *Am. J. Physiol.*, 262, (31): R1070-R1074.
- GRILL, H. J. & NORNGREN, R. (1978a): Chronically Decerebrate Rats Demonstrate Satiation but not Bait Shyness. *Science* 201, 267-269.
- GRILL, H. J. & NORNGREN, R. (1978b): The Taste Reactivity Test. II. Mimetic Responses to Gustatory Stimuli in Chronic Thalamic and Chronic Decerebrate Rats. *Brain Res.* 143, 281-297.
- GRILL, H. J. (1985): Introduction: Physiological Mechanisms in Conditioned Aversions. En: Annals of the New York Academy of Sciences , vol 443, pp. 67-88.
- GRILL, H.J., DONAHEY, J.C.K., KING, L. & KAPLAN, J.M. (1997). Contribution of Caudal Brainstem to D-Fenfluramine Anorexia. *Psychopharmacology*, 130 (4), 375-381.
- GROSSMAN, S. P. (1967): A Textbook of Physiological Psychology , Cap 6: Hunger and the regulation of the organism's energy balance. Wiley, pp. 249-256.
- GROSSMAN, S. P.(1979): The Biology of Motivation. *Ann. Rev. Psychol.* 30, 209-242.
- GRUNDY, D. (1992): Vagal afferent mechanisms of Mechano- and Chemoreception. En: Ritter, S., Ritter, R. C. & Barnes, C. D. (Eds.), Neuroanatomy and Physiology of Abdominal Vagal Afferents , CRC Press, pp. 249-277.
- GRUNDY, D., BAGAEV, V. & HILLSLEY, K. (1995): Inhibition of Gastric Mechanoreceptor Discharge by Cholecystokinin in the Rat. *Am. J. of Physiol. -Gastroint. & Liver Physiol.*, 31 (2), G355-G360.
- GRUNDY, D., BLACKSHAW, L. A. & HILLSLEY, K. (1994): Role of 5-Hydroxytryptamine in Gastrointestinal Chemosensitivity. *Digestive Diseases & Sciences*, 39 (12), S44-S47.

- GU, Y., GONZALEZ, M. F., CHEN, D. I. & DEUTSCH, J. A. (1993): Expression of C-Fos in Brain Subcortical Structures in Response to Nauseant Lithium Chloride and Osmotic Pressure in Rats. *Neurosc. Letters*, 157, 49-52.
- GUILLAZO-BLANCH, G., VALE-MARTINEZ, A., MARTI-NICOLOVIUS, M. & MORGADO-BERNAL, I. (1995). Facilitatory and Detrimental Effects of Parafascicular Electrical Stimulation Upon Two-Way Active Avoidance Conditioning in Rats. *Neurobiol. of Learning and Memory*, 63, 209-212.
- GUTHMANN, A. & 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. & AKIL, H. (1998): Pattern of c-Fos mRNA induction in rat brain by Acute Morphine. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 76, 294-303.
- HAGAN, M. M., HOLGUIN, F. D., CABELLO, C. E., HANSCOM, D. R. & MOSS, D. E. (1997): Combined Naloxone and Fluoxetine on Deprivation-Induced Binge Eating of Palatable Foods in Rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 58 (4), 1103-1107.
- HANAMORI, T., KUNITAKE, T., KATO, K. & KANNAN, H. (1998): Responses of neurons in the insular cortex to gustatory, visceral, and nociceptive stimuli in rats. *J. Neurophysiol.*, 79 (5), 2535-2545.
- HADLEY, M. N. (1996): Nutritional Support of head-injured patients. *Nutrition* 12 (2), 125-126.
- HALSELL, C. B. & FRANK, M. E. (1992): Organization of Taste-Evoked Activity in the Hamster Parabrachial Nucleus. *Brain Reseach*, 572, 286-290.
- HALSELL, C. B. & TRAVERS, S. P. (1997). Anterior and posterior oral cavity responsive neurons are differentially distributed among parabrachial subnuclei in rat. *J. Neurophysiol.*, 78, (2): 920-938.
- HALSELL, C. B. (1992): Organization of Parabrachial Nucleus Efferents to the Thalamus and Amygdala in the Golden Hamster. *The J. of Comp. Neurol.* 317, 57-78.
- HARRIS, G.C. & ASTON-JONES, G. (1994). Involvement of D2 Dopamine Receptors in the Nucleus Accumbens in the Opiate Withdrawal Syndrome. *Nature*, Vol.371,155-157.
- HAUGER, R. et al. (1986): Glucose Regulates [³H](+)-Amphetamine Binding and ATPase activity in the Hypothalamus: A Proposed Mechanism for the Glucostatic Control of Feeding and Satiety. *Brain Res. Bull.*, 16, 281-288.
- HAYAKAWA, T., ZHENG, J. Q. & 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.
- HAYWARD, L. F. & FELDER, R. B. (1995): Peripheral Chemoreceptor Inputs to the Parabrachial Nucleus of the Rat. *The American J. of Physiology*, 268 (3), R707-R714.
- HEATH, R. G. (1963): Intracranial Self-Stimulation in Man. *Science* 140, 394-396.
- HEATH, R. G. (1972): Pleasure and Brain Activity in Man. *J. Nerv. Ment. Dis.*, 154, 3-18.
- HEATHER, N. (1998). A Conceptual Framework for Explaining Drug Addiction. *Journal of Psychopharmacology* 12(1), 3-7.

BIBLIOGRAFIA

- HEINRICHS, S. C., BRITTON, K. T. & KOOB, G. F. (1991): Both Conditioned Taste Preference and Aversion Induced by Corticotropin-Releasing Factor. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 40, 717-721.
- HERBERT, H. & BELLINTANI-GUARDIA, B. (1995): Morphology and Dendritic Domains of Neurons in the Lateral Parabrachial Nucleus of the Rat. *The J. of Comparative Neurology*, 354, 377-394.
- HERBERT, H. & FLÜGGE, H. (1995). Distribution OF Alpha2-Adrenergic Binding Sites in The Parabrachial Complex of the Rat. *Anat Embryol*, 192, 507-516.
- HERBERT, H., MOGA, M. & 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 J. of Comparative Neurology*, 293, 540-580.
- HERMANN, G. E. & ROGERS, R. C. (1985): Convergence of Vagal and Gustatory Afferent Input within the Parabrachial Nucleus of the Rat. *Journal of the Auton. Nerv. System*, 13, 1-17.
- HERMANSON, O. & 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. & 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 J. of Neuroscience*, 10, 358-367.
- HERRERA, D. G. & ROBERTSON, H. A. (1996): Activation of c-fos in the Brain. *Progress in Neurobiology* 50, 83-107.
- HERZ, A. & SPANAGEL, R. (1995): Endogenous Opioids and Addiction. En: Tseng, L. F., The Pharmacology of Opioid Peptides Harwood Acad. Press, pp. 445-462.
- HEYNE, A. (1996): The Development of Opiate Addiction in the Rat. *Pharmacol. Biochem. & Beh.*, 53 (1), 11-25.
- HIGGS, S. & COOPER, S. J. (1997): Midazolam-induced rapid changes in licking behaviour: evidence for involvement of endogenous opioid peptides. *Psychopharmacology*, 131, 278-286.
- HIGGS, S. & COOPER, S. J. (1998): Evidence for early opioid modulation of licking responses to sucrose and intralipid: a Microstructural Analysis in the rat. *Psychopharmacology*, 139, 342-355.
- HIGGS, S., GILBERT, D. B., BARNES, N. M. & COOPER, S. J. (1993): Possible Brainstem mediation of Benzodiazepine-induced Hiperfagia. *Appetite*, 21, 183 (abstract).
- HILL, D. L. (1987): Development of Taste Responses in the Rat Parabrachial Nucleus. *J. of Neurophysiology*, 57 (2), 481-495.
- HIRSCHBERG, A.L. (1998). Hormonal Regulation of Appetite and Food Intake. *Ann. Med.* 30, 7-20.
- HITCHCOTT, P.K. & PHILLIPS, G.D. (1997). Amygdala and Hippocampus Control Dissociable Aspects of Drug-Associated Conditioned Rewards. *Psychopharmacology*, 131, 187-195.
- HOBBS, D. J., KOCH, J. E. & BODNAR, R. J. (1994): Naltrexone, Dopamine Receptor Agonists and Antagonist, and Food Intake in Rats: 1. Food Deprivation. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 49 (1), 197-204.

- HOCHSTENBACH, S. L., SOLANO-FLORES, L. & CIRIELLO, J. (1993): Fos Induction in Brainstem Neurons by Intravenous Hypertonic Saline in the Conscious Rat. *Neuroscience Letters*, 158, 225-228.
- HODGE, C.J., APKARIAN, A.V. & STEVENS, R.T. (1986). Inhibition of Dorsal-Horn Cell Responses by Stimulation of the Kölliker-Fuse Nucleus. *Journal of Neurosurgery*, 65, 825-833.
- HOEBEL, B. G. (1969): Feeding and Self-Stimulation. En: Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 157, 757-778.
- HOEBEL, B. G. (1976): Brain-Stimulation Reward and Aversion in Relation to Behavior. En: Wauquier, A. & Rolls, E. T. (Eds): Brain-Stimulation Reward, North-Holland Publ. Comp. Cap 17.
- HOEBEL, B. G.(1997): Neuroscience and Appetitive Behavior Research: 25 years. *Appetite*, 29, 119-133.
- HOEBEL, B. G., HERNANDEZ, L., McLEAN, S., STANLEY, B. G., AULISSI, E. F., GLIMCHER, P. & MARGOLIN, D. (1982): Catecholamines, Enkephalin and Neurotensin in Feeding and Reward. En: Hoebel, B. G. & Novin, D. (Eds.): The Neural Basis of Feeding and Reward, Haer Institute for Electrophysiol. Research., pp. 465-478.
- HOEBEL, B. G. & NOVIN, D. (1982): The Neural Basis of Feeding and Reward, Haer Institute for Electrophysiol. Research.
- HOPE, P. J., CHAPMAN, I., MORLEY, J. E., HOROWITZ, M. & WITTERT, G. A. (1997): Food Intake and Food Choice: The Role of the endogenous opioid peptides in the marsupial 'Sminthopsis crassicaudata', *Brain Research*, 764, 39-45.
- HORN, C. C. & FRIEDMAN, M. I. (1998a): 2,5-Anhydro-D-Mannitol induces Fos-like immunoreactivity in hindbrain and forebrain: relationship to eating behavior. *Brain Reseach*, 779, (1-2), 17-25.
- HORN, C. C. & FRIEDMAN, M. I. (1998b): Methyl palmoxirate increases eating and brain Fos-like immunoreactivity in rats. *Brain Research*, 781, (1-2), 8-14.
- HOUPPT, T. A. (2000): Molecular Neurobiology of Ingestive Behavior. *Nutrition* 16, 827-836.
- HUGHES, J., SMITH, T. W., KOSTERLITZ, H. W., FOTHERGILL, L. A., MORGAN, B. A. & MORRIS, H. R.(1975): Identification of Two Related Pentapeptides from the Brain with Potent Opiate Agonist Activity. *Nature*, 258, 577-579.
- HUNT, G. E. & McGREGOR, I. S. (1998): Rewarding Brain Stimulation induces only sparse Fos-Like Immunoreactivity in Dopamine Neurons. *Neuroscience* 83(2), 501-515.
- HUNT, S.P. (2000). Pain Control: Breaking the Circuit. *Trends in Pharmacological Sciences*, 21 (8), 284-286.
- HYMAN, S. E. (1999): Substance Abuse Disorders. En: Charney, D. S., Nestler, E. J. & Bunney, B. S.: Neurobiology of Mental Illness. Oxford University Press, pp. 565-568.
- HYMAN, S. E. & MALENKA, R. C. (2001): Addiction and the Brain: The Neurobiology of Compulsion and its persistence. *Nature Reviews* 2, 695-703.
- IKEMOTO, S & 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.

BIBLIOGRAFIA

- INAGAKI, S., SHIOTANI, Y., YAMANO, M., SHIOSAKA, S., TAKAGI, H., TATEISHI, K., HASHIMURA, E., HAMAOKA, T. & TOHYAMA, M. (1984): Distribution, Origin, and Fine Structures of Cholecystokinin-8-Like Immunoreactive Terminals in the Nucleus Ventromedialis Hypothalami of the Rat. *The J. of Neuroscience*, 4 (5), 1289-1299.
- INO, H., NAGAI, K., FUJIWARA, T., YAMANO, M., INAGAKI, S., TOHYAMA, M. & NAKAGAWA, H. (1987): Electrical Stimulation of the Lateral Part of the Dorsal Parabrachial Nucleus Causes Hyperglycemia. *J. Clin. Biochem. Nutrit.* 3, 206-216.
- INUI, A. (1999). Feeding and body-weight regulation by hypothalamic neuropeptides-mediation of the actions of leptin. *Trends Neurosci.*, 22, (1): 25-30.
- INUI, A. (2001): Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach. *Nature reviews Neuroscience* 2 (8): 551-560.
- JAEGER, T. V. & VAN DER KOOY, D. (1993): Morphine Acts in the Parabrachial Nucleus, a Pontine Viscerosensory Relay, to Produce Discriminative Stimulus Effects. *Psychopharmacol.*, 110, 76-84.
- JAEGER, T. V. & VAN DER KOOY, D. (1996): Separate Neural Substrates Mediate the Motivating and Discriminative Properties of Morphine. *Behav. Neurosci.*, 110 (1), 181-201.
- JAREMA, K., MACOMBER, C., LESAGE, M., POLING, A. (1999): Acute and Chronic Effects of Morphine under a Progressive Ratio 25 Schedule of Food Delivery. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 62(2), 209-214.
- JASMIN, L., BURKEY, A. R., CARD, J. P. & BASBAUM, A. I. (1997): Transneuronal labeling of a nociceptive pathway, the spino-(trigemino) –parabrachio- amigdaloïd, in the rat. *J. Neurosci.* 17 (10), 3751-3765.
- JEQUIER, E. & TAPPY, L. (1999). Regulation of body weight in humans. *Physiol. Rev.*, 79, (2): 451-480.
- JIA, H. G., RAO, Z. R. & 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. *Br. Res.*, 663, 181-190.
- JOHNSON, S. W. & NORTH, R. A. (1992): Opioids Excite Dopamine Neurons by Hyperpolarization of Local Interneurons, *The J. of Neuroscience*, 12 (2), 483-488.
- KAINU, T., HONKANIEMI, J., GUSTAFSSON, J. A., RECHARDT, L. & PELTO-HUIKKO, M. (1993): Co-Localization of Peptide-Like Immunoreactivities with Glucocorticoid Receptor- and Fos-Like Immunoreactivities in the Rat Parabrachial Nucleus. *Brain Res.*, 615, 245-251.
- KALIVAS, P. W. & DUFFY, P. (1995): Selective activation of dopamine transmission in the shell of the Nucleus Accumbens by stress. *Brain Research* 675 (1-2), 325-328.
- KALIVAS, P. W. & NAKAMURA, M. (1999): Neural Systems for Behavioral Activation and Reward. *Current Opinion in Neurobiology* 9, 223-227.
- KALIVAS, P.W., PIERCE, R.C., CORNISH, J. & SORG, B.A. (1998). *Journal of Psychopharmacology* 12(1),49-53.
- KANAREK, R. B., HOMOLESKI, B. A. & 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. B., MATHES, W. F., HEISLER, L. K. LIMA, R. P. & MONFARED, L. S. (1997): Prior Exposure to Palatable Solutions Enhances the Effect of Naltrexone on Food Intake in Rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 57 (1/2), 337-381.

-KANAREK, R., PRZYPEK, J., D'ANCIK.E. & MARKS-KAUFMAN,R. (1997). Detary Modulation of Mu and Kappa Opioid Receptor-mediated Analgesia. *Pharmacol. Biochemistry and Behavior*, 58(1), 43-49.

-KANDEL, E. R., SCHWARTZ, J. H. & JESSELL, T. M. (1997): Neurociencia y Conducta. Prentice Hall.

-KANDEL, E. R., SCHWARTZ, J. H. & JESSELL, T. M. (2000): Principles of Neural Science. McGraw Hill (4th. Ed.).

-KAPLAN, J.M., SONG, S. & GRILL, H.J. (1998). Serotonin Receptors in the Caudal Brainstem Are Neccesary and Sufficient for the Anoretic Effect of Peripherlly Administered mCPP. *Psychopharmacology*, 137, 43-49.

-KARIMNAMAZI, H., TRAVERS, S. P. & TRAVERS, J. B. (2002): Oral and Gastric input to the Parabrachial Nucleus of the rat. *Brain Reseach*, 957, 193-206.

-KATAYAMA, Y., DeWITT, D. S., BECKER, D. P. & HAYES, R. L. (1984): Behavioral Evidence for a Cholinoceptive Pontine Inhibitory Area: Descending Control of Spinal Motor Output and Sensory Input. *Brain Research*, 296, 241-262.

-KATAYAMA, Y., TSUBOKAWA, T., HIRAYAMA, T. & YAMAMOTO, T. (1985): Pain Relief following Stimulation of the Pontomesencephalic Parabrachial Region in Humans: Brain Sites for Nonopiate-Mediated Pain Control. *Appl. Neurophysiol.*, 48, 195-200.

-KAWAI, Y., TAKAGI, H., YANAI, K. & TOHYAMA, M. (1988). Adrenergic Projection from the Caudal Part of the Nucleus of the Tractus Solitarius to the Parabrachial Nucleus in tha Rat: Immunocytochemical Study Combined with a Retrograde Tracing Method. *Brain Research*, 459, 369-372.

-KELLEY, A. E. & BERRIDGE, K.C. (2002):The Neuroscience of Natural Rewards: Relevance to Addictive Drugs. *The J. of Neuroscience*, 22 (9), 3306-3311.

-KELLEY, A. E., BAKSHI, V. P., HABER, S. N., STEININGER, T. L., WILL, M. J. & ZHANG, M. (2002): *Physiology and Behavior* 76, 365-377.

-KELLEY, A. E., BLESS, E. P. & SWANSON, C. J. (1996): Investigation of the Effects of Opiate Antagonists Infused into the Nucleus Accumbens on Feeding and Sucrose Drinking in Rats. *The J. of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 278, 1499-1507.

-KESNER, P.R. & WILLIAMS, J.M. (1995). Memory for Magnitude of Reinforcement: Dissociation between the Amygdala and Hippocampus. *Neurobiol. of Learning and Memory*, 64, 237-244.

-KHACHATURIAN, H., LEWIS, ME., WATSON, SJ. (1983): Enkephalin systems in diencephalon and brainstem of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 220, 310-320.

-KIEFER, S. W. & ORR, M. R. (1992): Taste Avoidance, but not Aversion, Learning in Rats Lacking Gustatory Cortex. *Behavioral Neuroscience*, 106 (1), 140-146.

BIBLIOGRAFIA

- KIEFFER, S. W. (1985): Neural Mediation of Conditioned Food Aversions. En: Annals of the New York Academy of Sciences , vol 443, pp. 100-109.
- KIEFFER, B.L., (1999). Opioids: First Lessons from Knockout Mice. *Trends in Pharmacological Sciences*, 20 (1), 19-26.
- KING, B. M., ROSSITER, K. N., STINES, S. G., ZAHARAN, G. M., COOK, J. T., HUMPHRIES, M. D., YORK, D. A. (1998): Amygdaloid-lesion hyperphagia: impaired response to caloric challenges and altered macronutrient selection. *Am. J. Physiol. Regulatory, Integrative Comp. Physiol.*, 275, 44, R485-R493.
- KITAHAMA, K., NAGATSU, I., GEFFARD, M. & MAEDA, T. (2000): Distribution of dopamine-immunoreactive fibers in the rat brainstem. *J. of Chemical Neuroanatomy*, 18, 1-9.
- KNAPP, R. J., VAUGHN, L. K. & YAMAMURA, H. I. (1995): Selective ligands for μ and δ opioid receptors. En: Tseng, L. F., The Pharmacology of Opioid Peptides Harwood Acad. Press.
- KOBASHI, M. & 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. & ADACHI A. (1993): Response of Neurons in the Solitary Tract Nucleus, Area Postrema and Lateral Parabrachial Nucleus to Gastric Load of Hypertonic Saline. *Neurosc. Letters*, 158, 47-50.
- KOCH, J.E. & 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.
- KOCH, M., SCHMID, A. & SCHNITZLER, H.U. (2000). Role of Nucleus Accumbens dopamine D1 and D2 Receptors in Instrumental and Pavlovian Paradigmas of Conditioned Reward. *Psychopharmacology*, 152, 67-73.
- KOEGLER, F. H., YORK, D. A. & BRAY, G. A. (1999): The Effects on Feeding of Galanin and M40 when Injected Into the Nucleus of the Solitary Tract, the Lateral Parabrachial Nucleus, and the Third Ventricle. *Physiology and Behavior* 67 (2), 259-267.
- KONKLE, A. T. M., WILSON, P. & BIELAJEW (1999): Histochemical mapping of the substrate for brain-stimulation reward with glycogen phosphorylase. *J. of Neuroscience Methods* 93, 111-119.
- KOOB, G. F. & BLOOM, F. E. (1988): Cellular and Molecular Mechanisms of Drug Dependence. *Science*, 242, 715-721.
- KOOB, G.F. & LE MOAL, M. (1997). Drug Abuse: Hedonic Homeostatic Dysregulation. *Science*, Vol.278, 52-57.
- KOOB, G.F. & MOAL, M.L. (2001). Drug Addiction, Dysregulation of Reward, and Allostasis. *Neuropsychopharmacology*, Vol.24, N°2,97-129.
- KOOB, G.F. (1992). Drugs of Abuse: Anatomy, Pharmacology and Function of Reward Pathways. *Trends in Pharmacological Sciences*, Vol.13, 177-184.
- KOOB, G. F. (1999): Animal models of addictive disorders. *European Neuropsychopharmacology* 9 (5), 171-173.
- KOOB, G.F. (2000). Drug Addiction. *Neurobiology of Disease*, 7, 543-545.

- KOOB, G.F., CAINE, S.B., PARSONS, L., MARKOU, A. & WEISS, F. (1997). Opponent Process Model and Psychostimulant Addiction. *Pharmacol. Bioch. & Beh.*, Vol.57, N°3, 513-521.
- KOOB, G.F., MARKOU, A., WEISS, F. & SCHULTEIS, G. (1993). Opponent Process and Drug Dependence: Neurobiological Mechanisms. *Seminars in the Neurosciences*, Vol.5, 351-358.
- KOOB, G.F., ROCIO, M., CARRERA, A., GOLD, L.H., HEYSER, C.J., MALDONADO-IRIZARRY, C., MARKOU, A., PARSONS, L.H., ROBERTS, A.J., SCHULTEIS, G., STINUS, L., WALKER, J.R., WEISSENBERN, R. & WEISS, F. (1998). Substance Dependence as a Compulsive Behavior. *Journal of Psychopharmacology*, 12(1), 39-48.
- KREEK, M.J. & KOOB, G.F. (1998). Drug Dependence: Stress and Dysregulation of Brain Reward Pathways. *Drug and Alcohol Dependence*, 51, 23-47.
- KROUT, K. E. & LOEWI, A. (2000): Parabrachial Nucleus Projections to Midline and Intralaminar Thalamic Nuclei of the Rat. *The J. of Comparative Neurology*, 428, 475-494.
- KRUKOFF, T. L., HARRIS, K. H. & JHAMANDAS, J. H. (1993): Efferent Projections from the Parabrachial Nucleus Demonstrated with the Anterograde Tracer PHA-L. *Brain Res. Bull.*, 30 (1-2), 163-172.
- KRUKOFF, T. L., HARRIS, K. H., LINETSKY, E. & JHAMANDAS, J. H. (1994): Expression of C-Fos Protein in Rat Brain Elicited by Electrical and Chemical Stimulation of the Hypothalamic Paraventricular Nucleus. *Neuroendocrinol.*, 59, 590-602.
- KUBO, T., HAGIWARA, Y., SEKIYA, D., & 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.
- KUNIHARA, M., KANBAYASHI, M. & OHSHIMA, T., (1983): Opposite effects of Morphine on Feeding and Drinking in Rats relative to administration time. *Japan. J. Pharmacol.*, 33, 829-835.
- LAENG, B., BERRIDGE, K. C. & BUTTER, C. M. (1993): Pleasantness of a Sweet Taste During Hunger and Satiety: Effects of Gender and 'Sweet Tooth'. *Appetite*, 21, 247-254.
- LANÇA, A. J. & VAN DER KOOY, D. (1985): A Serotonin-Containing Pathway from the Area Postrema to the Parabrachial Nucleus in the Rat. *Neurosci.*, 14 (4), 1117-1126.
- LANGHANS, W. (1996). Role of liver in the metabolic control of eating: What we know and what we do not know. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 20, (1): 145-153.
- LAPEYRE, S., MAUBORGNE, A., BECKER, C., BENOLIEL, J.J., CESSÉLIN, F., HAMON, M. & BOURGOIN, S. (2001). Subcutaneous Formalin Enhances Outflow of Met-enkephalin- and cholecystokinin-Like Materials in the Rat Nucleus Accumbens. *Arch. Pharmacol*, 363, 399-406.
- LASITER, P. S. (1985): Thalamocortical Relations in Taste Aversion Learning: II. Involvement of the Medial Ventrobasal Thalamic Complex in Taste Aversion Learning. *Beh. Neurosci.*, 99 (3), 477-495.
- LAVIOLETTE, S. R., NADER, K. & 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.
- LAWRENCE, C.B., TURNBULL, A.V. AND ROTHWELL, N.J. (1999). Hypothalamic Control of Feeding. *Current Opinion in Neurobiology*, 9, 778-783.

BIBLIOGRAFIA

- LE MAGNEN, J. (1990): A Role for Opiates in Food Reward and Food Addiction. En Capaldi, E. D. & 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. & DEVOS, M. (1980): Pain Modulating and Reward Systems: A Single Brain Mechanism?. *Pharmacol., Bioch. & Beh.* 12, 729-733.
- LEE, M.D., ALOYO, V.J., FLUHARTY, S.J. & SIMANSKY, K.J. (1998). Infusion of the Serotonin_{1B} (5-HT_{1B}) Agonist CP-93,129 Into the Parabrachial Nucleus Potently and Selectively Reduces Food Intake in Rats. *Psychopharmacology*, 136, 304-307.
- LEIBOWITZ, S. F. (1982): Hypothalamic Catecholamine Systems in Relation to Control of Eating Behavior and Mechanisms of Reward. En: Hoebel, B. G. & Novin, D. (Eds.): The Neural Basis of Feeding and Reward, Haer Institute for Electrophysiol. Research., pp. 241-258.
- LEIBOWITZ, S. F. (1992): Neurochemical-Neuroendocrine Systems in the Brain Controlling Macronutrient Intake and Metabolism. *TINS*, 15 (12), 491-497.
- LEPORE, M. & 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.
- LERMER, C. M. & MATTES, R. D. (1999): *Progress in Lipid Research*, 38, 117-128.
- LESHNER, A.I. (1997). Addiction Is a Brain Disease, and it Matters. *Science*, Vol.278, 45-47.
- LEVENTHAL, L. & 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.
- LEVENTHAL, L., SILVA, R. M., ROSSI, G. C., PASTERNAK, G.W. & BODNAR, R. J. (1998): Morphine-6 β -Glucuronide-Induced Hyperphagia: Characterization of Opioid Action by selective antagonists and Antisense Mapping. *The J. of Pharmacol. and Exp. Therap.* 287, 538-544.
- LEVINE, A.S. & BILLINGTON, C.J. (1997). Why Do We Eat? A Neural Systems Approach. *Annual Rev. Nutr.*, 17, 597-619.
- LI, B. H. & ROWLAND, N. E. (1993): Dexfenfluramine Induces Fos-Like Immunoreactivity in Discrete Brain Regions in Rats. *Brain Res. Bull.*, 31, 43-48.
- LI, B. H. & ROWLAND, N. E. (1995): Effects of Vagotomy on Cholecystokinin- and Dexfenfluramine-induced Fos-like Immunoreactivity in the Rat Brain. *Brain Res. Bull.*, 37 (6), 589-593.
- LI, B. H., SPECTOR, A. C. & ROWLAND, N. E. (1994): Reversal of Dexfenfluramine-Induced Anorexia and C-Fos/C-Jun Expression by Lesion in the Lateral Parabrachial Nucleus. *Brain Res.* 640, 255-267.
- LI, C.S., DAVIS, B.J. & SMITH D.V. (2003). Opioid Modulation of Taste in the Nucleus of the Solitary Tract. *Brain Research*, 965, 21-34.

- LIGHT, A. R., SEDIVEC, M. J., CASALE, E. J. & JONES, S. L. (1993): Physiological and Morphological Characteristics of Spinal Neurons Projecting to the Parabrachial Region of the Cat. *Somatosens. & Motor Res.*, 10 (3), 309-325.
- LINDBLOM, J., SCHIÖTH, H. B., WATANOBE, H., SUDA, T., WIKBERG, J. E. S. & BERGSTRÖM, L. (2000): Downregulation of melanocortin receptors in brain areas involved in food intake and reward mechanisms in obese (OLETF) rats. *Brain Research* 852, 180-185.
- LOUILOT, A. & BESSON, C. (2000): Specificity of Amygdalostriatal interactions in the involvement of mesencephalic dopaminergic neurons in affective perception. *Neuroscience*, 96 (1), 73-82.
- LUCAS, F., ACKROFF, K. & SCLAFANI, A. (1998): High-fat diet preference and overeating mediated by postingestive factors in rats. *The American J. of Physiol.*, 275 (5) R1511-R1522.
- LYNCH, W. C. (1986): Opiate Blockade Inhibits Saccharin Intake and Blocks Normal Preference Acquisition. *Pharmacol. Bioch. & Beh.*, 24, 833-836.
- LYNCH, W. C., WATT, J. KRALL, S. & PADEN, C. M. (1985): Autoradiographic Localization of Kappa Opiate Receptor in CNS Taste and Feeding Areas. *Pharmacology, Biochem. & Behavior* 22, 699-705.
- LYNN, C., MARIN-BIVENS & OLSTER, D. H. (1999): Opioid Receptor Blockade promotes weight loss and improves the display of sexual behaviors in obese Zucker female rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 63 (3), 515-520.
- MAJEED, N. H., LASON, W., PRZEWLOCKA, B. & PRZEWLOCKI, R. (1986): Involvement of Endogenous Opioid Peptides in Fenfluramine Anorexia. *Pharmacol. Bioch. & Beh.*, 25, 967-972.
- MALDONADO, R. & RODRIGUEZ DE FONSECA, F. (2002). Cannabinoid Addiction: Behavioral Models and Neural Correlates. *The Journal of Neuroscience*, 22(9), 3326-3331.
- MALDONADO, R., SAIARDI, A., VALVERDE, O., SAMAD, T.A., ROQUES, B.P. & BORRELI, E. (1997). Absence of Opiate Rewarding Effects in Mice Lacking Dopamine D2 Receptors. *Nature*, Vol 388, 586-589.
- MALDONADO-IRIZARRY, C. S., SWANSON, C. J. & KELLEY, A. E. (1995): Glutamate Receptors in the Nucleus Accumbens Shell Control Feeding Behavior via the Lateral Hypothalamus. *The J. of Neuroscience*, 15 (10), 6779-6788.
- MALEY, B. E. & 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., THOMPSON, R. C., AKIL, H. & WATSON, S. J. (1994): μ -Opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: comparison to μ -receptor binding. *Brain Res.* 643, 245-265.
- MANSOUR, A., FOX, C. A., AKIL, H. & WATSON, S. J. (1995): Opioid-Receptor mRNA Expression in the Rat CNS: Anatomical and Functional Implications. *Trends in Neurosc.*, 18 (1), 22-29.
- MANSOUR, A., KHACHATURIAN, H., LEWIS, M. E., AKIL, H. & WATSON, S. J. (1988): Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends in Neurosc.*, 11 (7), 308-314.
- MARK, G. P., BLANDER, D. S., HERNANDEZ, L. & HOEBEL, B. G. (1989): Effects of Salt-Intake, Rehydration and Conditioned Taste Aversion (CTA) Development on Dopamine Output in the Rat Nucleus Accumbens. *Appetite*, 12, 224-230.

BIBLIOGRAFIA

- MARK, G. P., SMITH, S. E., RADA, P. V. & HOEBEL, B. G. (1994): An Appetitively Conditioned Taste Elicits a Preferential Increase in Mesolimbic Dopamine Release. *Pharmacol. Biochem. & Behavior*, 48 (3), 651-660.
- MARK, G.P., WEINBERG, J.B., RADA, P.V. & HOEBEL B.G. (1995). Extracellular Acetylcholine is Increased in the Nucleus Accumbens Following the Presentation of an Aversively Conditioned Taste Stimulus. *Brain Research*, 688, 184-188.
- MARKOU, A. & KOOB, G. F. (1993): Intracranial self-stimulation thresholds as a measure of reward. En Sahgal, A.: Behavioral Neuroscience. Practical Approach, vol II, 93-115. IRL Press.
- MARKS-KAUFFMAN, R. & KANAREK, R. B. (1990): Dietary modulation of the anorectic potency of amphetamine. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 35 (2), 301-306.
- MARTEL, P. & FANTINO, M. (1996): Mesolimbic Dopaminergic System Activity as a Function of Food Reward: A Microdialysis Study. *Pharmacol. Bioch. & Behavior*, 53 (1), 221-226.
- MARTIN, G. M., BECHARA, A. & VAN DER KOOY, D. (1991): The Perception of Emotion: Parallel Neural Processing of the Affective and Discriminative Properties of Opiates. *Psychobiology*, 19 (2), 147-152.
- MATTHES, H. W. D., MALDONADO, R., SIMONIN, F., VALVERDE, O., SLOWE, S., KITCHEN, I., BEFORT, K., DIERICH, A., LE MEUR, M., DOLLE, P., TZAVARA, E., HANOUNE, J., ROQUES, B. P. & KIEFFER, B. L. (1996): Loss of morphine-induced Analgesia, Reward Effect and Withdrawal Symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 383, 819-823.
- MAUER, M.M., HARRIS, R.B.S. & BARTNESS, T.J. (2001). The regulation of total body fat: lessons learned from lipectomy studies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 25, 15-28.
- McCANN, U. D., SEIDEN, L. S., RUBIN, L. J. & RICAURTE, G. A. (1997): Brain serotonin neurotoxicity and primary pulmonary hypertension from fenfluramine and dexfenfluramine. A systematic review of the evidence. *JAMA* 278 (8), 666-672.
- McFARLAND, K. & ETTENBERG, A. (1998). Naloxone Blocks Reinforcement but Not Motivation in an Operant Runway Model of Heroin-Seeking Behavior. *Experimental and Clinical Psychophar.*, Vol.6, 353-359.
- McFARLAND, K. & ETTENBERG, A. (1999): Haloperidol does not attenuate Conditioned Place Preferences or Locomotor Activation Produced by Food- or Heroin-Predictive Discriminatives Cues. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 62 (4)631-641.
- MEDIAVILLA, C. (1995). Tesis Doctoral.
- MEDIAVILLA, C., MOLINA, F., 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. & 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., CUBERO, I. MOLINA, F. & 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. & 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.
- MEGUID, M. M., FETISSOV, S. O., VARMA, M., SATO, T. S., ZHANG, L., LAVIANO, A. & ROSSI-FANELLI, F. (2000): Hypothalamic Dopamine and Serotonin in the Regulation of Food Intake. *Nutrition* 16, 843-857.
- MELCHIOR, J. C., RIGAUD, D., CHAYVIALLE, J. A., COLAS-LINHART, N., LAFOREST, M. D., PETIET, A., COMOY, E., 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.
- MELCHIOR, J.C., RIGAUD, D., COLAS-LINHART, A., ROZEN, R., FANTINO, M. & APFELBAUM, M. (1990): Negative alliesthesia and decreased endogenous opiate system activity in anorexia nervosa. *Pharmacol. Biochem. & Beh.* 35 (4), 885-888.
- MELZACK, R. (1992) Miembros fantasma. En: Psicología Fisiológica. Libros de Investigación y Ciencia, recopilación de 1994, pp 28-35.
- MELZACK, R. (1990): La tragedia del dolor innecesario. En: Psicología Fisiológica. Libros de Investigación y Ciencia, recopilación de 1994, pp 45-53.
- MERCER, J. G., LAWRENCE, C. B. & ATKINSON, T. (1996): Hypothalamic NPY and CRF Gene Expression in the Food-Deprived Syrian Hamster. *Physiology and Behavior* 60 (1), 121-127.
- MERCER, J. G., MOAR, K. M., ROSS, A. W. & MORGAN, P. J. (2000): Regulation of leptin receptor, POMC and AGRP gene expression by photoperiod and food deprivation in the hypothalamic Arcuate Nucleus of the male Siberian Hamster. *Appetite*, 34, 109-111.
- MERCER, M.E. & HOLDER M.D. (1997). Food Cravings, Endogenous Opioid Peptides, and Food Intake: A Review. *Appetite*, 29, 325-352.
- MEYER, R. E. (1995): Biology of Psychoactive Substance Dependence Disorders: Opiates, Cocaine, and Ethanol. En: Schatzberg, A. L. & Nemeroff, C. B. The American Psychiatric Press Textbook of Psychopharmacology. American Psychiatric Press, Washington.
- MILIARESSIS, E., ROMPRE, P. P., LAVIOLETTE, L. P., PHILIPPE, L. & COULOMBE, D. (1986): The Curve-Shift Paradigm in Self-Stimulation. *Physiol. & Beh.*, 37, 85-91.
- MILNER, P. (1989): The Discovery of Self-Stimulation and Other Stories. *Neurosc. & Biobeh. Reviews*, 13, 61-67.
- MIRENOWICZ, J. & SCHULTZ, W. (1996). Preferential Activation of Midbrain Dopamine Neurons by Appetitive rather than Aversive Stimuli. *Nature*, Vol.379, 449-451.
- MISHKIN, M. & APPENZELLER, T. (1987): Anatomía de la Memoria. *Investigación y Ciencia*, 131, 15-25.
- MITCHELL F. ROITMAN, GERTJAN VAN DIJK, TODD E. THIELE AND ILENE L. BERNSTEIN (2001): Dopamine mediation of the feeding response to violations of spatial and temporal expectancies, *Behavioural Brain Research*, 122(2)193-199.
- MOGA, M. M., HERBERT, H., HURLEY, K. M., YASUI, Y., GRAY, T. S. & SAPER, C. B. (1990): Organization of Cortical, Basal Forebrain, and Hypothalamic Afferents to the Parabrachial Nucleus in the Rat. *The J. of Comparative Neurol.* 295, 624-661.

BIBLIOGRAFIA

- MOGENSON, G. J. (1982): Studies of the Nucleus Accumbens and its Mesolimbic Dopaminergic Afferents in Relation to Ingestive Behaviors and Reward. En: Hoebel, B. G. & Novin, D. (Eds.): The Neural Basis of Feeding and Reward, Haer Institute for Electrophysiol. Research., pp. 275-288.
- MOLINA, F. & PUERTO, A. (1980): Bases biológicas de la Nutrición. En: Guillamón, A. (Ed.), Fundamentos Biológicos de la Conducta II (pp. 79-815). UNED.
- MOLINA, F. & PUERTO, A. (1981): El Condicionamiento Aversivo Gustativo como Modelo Especializado de Aprendizaje. En: Tudela, P., Psicología Experimental, UNED, pp.263-280.
- MOLINA, F. & PUERTO, A. (1986): Los interoceptores viscerales en la regulación nutritiva a corto plazo: Fase cefálica, distensión y vaciado gástrico. *Rev. de Psicología General y Aplicada*, 41 (4), 677-685.
- MOLINA, F. & PUERTO, A. (1988). Bases biológicas de la nutrición. En: A. Guillamón y S. Segovia (Eds.), Fundamentos Biológicos de la Conducta, (pp. 215-231). UNED.
- MOLINA, F. & 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.
- MOLINA, F., THIEL, T., DEUTSCH, J. A. & PUERTO, A. (1977): Comparison Between some Digestive Processes After Eating and Gastric Loading in Rats. *Pharmacol. Bioch. & Beh.*, 7, 347-350.
- MONROE, S. & DILORENZO, P. M. (1995): Taste Responses in Neurons in the Nucleus of the Solitary Tract that Do and Do Not Project to the Parabrachial Pons. *J. of Neurophysiol.*, 74 (1), 249-257.
- MORA, F., ALBA, F., SANGUINETTI, A. M., RODRIGUEZ, J. M. & VIVES, F. (1980): Differential Effects Produced by an Anticholinergic on the Neuroleptic Inhibition of Motor Behavior and Self-Stimulation of the Prefrontal Cortex in the Rat. *Brain Res. Bull.*, 5, 223-225.
- MORA, F., AVRITH, D. B., PHILLIPS, A. G. & ROLLS, E. T. (1979): Effects of satiety on Self-Stimulation of the Orbitofrontal Cortex in the Rhesus Monkey. *Neuroscience Letters*, 13, 141-145.
- MORAN, T. H. (1996): Receptor Subtype and Affinity State Underlying the Satiety Actions of Cholecistokinin (CCK). En: Cooper, S. J. & Clifton, P. G. : Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behavior. Academic Press, pp. 1-18.
- MORGAN, J. I. & CURRAN, T. (1989): Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *TINS*, 12 (11), 459-462.
- MORGAN, J. I. & CURRAN, T. (1991): Stimulus- transcription coupling in the Nervous System: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu. Rev. Neuroscience*, 14, 421-451.
- MORGAN, J. I., COHEN, D. R., HEMPSTEAD, J. L. & CURRAN, T. (1987): Mapping Patterns of c-fos Expression in the Central Nervous System After Seizure. *Science*, 210, 192-197.
- MOUFID-BELLANCOURT, S. & VELLE, L. (1994): Effects of Morphine Injection Into the Parabrachial Area on Saccharin Preference: Modulation by Lateral Hypothalamic Neurons. *Pharmacol. Bioch. & Beh.*, 48 (1), 127-133.
- MOUFID-BELLANCOURT, S., RAZAFIMANALINA, R. & VELLE, 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.

- MURTRA, P., SHEASBY, A.M., HUNT, S.P. & DE FELIPE, C. (2000). Rewarding Effects of Opiates are Absent in Mice Lacking the Receptor for Substance P. *Nature*, Vol.405, 180-183.
- MUSEO, E. & WISE, R.A. (1994). Place Preference Conditioning with Ventral Tegmental Injections of Cytisine. *Life Sciences*, Vol.55, N°15, 1179-1186.
- NADER, K. & VAN DER KOOY, D. (1994): The Motivation Produced by Morphine and Food is Isomorphic: Approaches to Specific Motivational Stimuli Are Learned. *Psychobiology*, 22 (1), 68-76.
- NADER, K., BECHARA, A. & VAN DER KOOY, D. (1997): Neurobiological Constraints on Behavioral Models of Motivation. *Annu. Rev. Psychol.* 48, 85-114.
- NAGAI, K., INO, H., YAMAMOTO., H., NAKAGAWA, H., YAMANO, M., TOHYAMA, M., SHIOSAKA, S., SHIOTANI, Y. & INAGAKI, S. (1987): Lesions in the Lateral Part of the Dorsal Parabrachial Nucleus Caused Hyperphagia and Obesity. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 3, 103-112.
- NAKAHARA, D., ISHIDA, Y., NAKAMURA, M., FURUNO, N. & NISHIMORI, T. (2001): Intracranial Self-Stimulation induces Fos expression in Gabaergic Neurons in the rat Mesopontine Tegmentum. *Neuroscience*, 106 (3), 633-641.
- NAKAJIMA, S. & PATTERSON, R. L. (1997): The involvement of dopamine D2 receptors, but not D3 or D4 receptors, in the rewarding effect of brain stimulation in the rat. *Brain Research*, 760, 74-79.
- NENCINI, P. (1996): Sensitization to the Ingestive Effects of Opioids. En: Cooper, S. J. & Clifton, P. G. : Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behavior. Academic Press, pp. 193-218.
- NESSE, R.M. & BERRIDGE, K.C. (1997), Psychoactive Drug Use in Evolutionary Perspective. *Science*, Vol.278, 63-65.
- NESTLER, E. J. & HYMAN, S. E. (1999): Mechanisms of Neural Plasticity. En: Charney, D. S., Nestler, E. J. & Bunney, B. S. Neurobiology of Mental Illness. Oxford University Press. N.Y.
- NESTLER, E. J. (1999): Cellular and Molecular Mechanisms of Addiction. En: Charney, D. S., Nestler, E. J. & Bunney, B. S. Neurobiology of Mental Illness. Oxford University Press. N.Y.
- NESTLER, E. J. (2001): Molecular Basis of Long-Term Plasticity Underlying Addiction. *Nature Reviews*, 2,, 119-128.
- NESTLER, E.J. & AGHAJANIAN G.K. (1997). Molecular and Cellular Basis of Addiction. *Science*, Vol.278, 58-62.
- NICOLA, S. M., SURMEIER, D. J. & MALENKA, R. C. (2000): Dopaminergic Modulation of Neuronal Excitability in the Striatum and Nucleus Accumbens. *Ann. Rev. Neuroscience*, 23, 185-215.
- NISHIJO, H. & NORGREN, R. (1997): Parabrachial Neural Coding of Taste Stimuli in Awake Rats. *J. of Neurophysiology*, 78 (5), 2254-2268.
- NOCK, B. (1995): k and ε opioid binding. En: Tseng, L. F., The Pharmacology of Opioid Peptides Harwood Acad. Press.
- NORGREN, R. & LEONARD, C. M. (1971): Taste Pathways in Rat Brainstem. *Science*, 173, 1136-1139.
- NORGREN, R. & PFAFFMANN, C. (1975): The Pontine Taste Area in the Rat. *Brain Research*, 91, 99-117.
- NORGREN, R. (1974): Gustatory Afferents to Ventral Forebrain. *Brain Research*, 81, 285-295.

BIBLIOGRAFIA

- NORGREN, R. (1990): Gustatory System. En: Paxinos, G.: The Human Nervous System, Academic Press. pp. 845-861.
- O'BRIEN, C. P. (1999): Principles of the Pharmacotherapy of Substance Abuse Disorders. En: Charney, D. S., Nestler, E. J. & Bunney, B. S. Neurobiology of Mental Illness. Oxford University Press. N.Y.
- O'BRIEN, C. P., CHILDRESS, A. R., EHRMAN, R., ROBBINS, S. J. (1998): Conditioning factors in drug abuse: can they explain compulsion?. *J. of Psychopharmacology* 12 (1), 15-22.
- O'BRIEN, C.P. (1997). A Range of Research-Based Pharmacotherapies for Addiction. *Science*, Vol.278, 66-70.
- O'DOHERTY, J. O., KRINGELBACH, M. L., ROLLS, E. T., HORNAK, J. & ANDREWS, C.(2001): Abstract reward and punishment representations in the human orbitofrontal cortex. *Nature Neuroscience* 4 (1), 95-102.
- O'DOHERTY, J.P., DEICHMANN, R., CRITCHLEY, H.D. &DOLAN, R J. (2002). Neural Responses During Anticipation of a Primary Taste Reward. *Neuron* .33, 815-826.
- O'HARE, E., CLEARY, J., BARTZ, P. J., WELDON, D. T., BILLINGTON, C. J. & LEVINE, A. S. (1997): Naloxone administration following operant training of sucrose/water discrimination in the rat. *Psychopharmacology* 129, 289-294.
- OLDS, J. & 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. & FOBES, J. J. (1981): The Central Basis of Motivation: Intracranial Self-Stimulation Studies. *Ann. Rev. Psychol.*, 32, 523-574.
- OLMSTEAD, M. C. & 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. & FRANKLIN, K. B. J. (1994): Lesions of the Pedunculopontine Tegmental Nucleus Block Drug-Induced Reinforcement but not Amphetamine-Induced Locomotion. *Brain Res.*, 638, 29-35.
- OLMSTEAD, M. C., MUNN, E. M., FRANKLIN, K. B. J. & WISE, R. A. (1998): Effects of Pedunculopontine Tegmental Nucleus Lesions on Responding for Intravenous Heroin under Different Schedules of Reinforcement. *The Journal of Neuroscience*, 18 (3), 5035-5044.
- OLMSTEAD, M.C. & FRANKLIN, B.J. (1997). The Development of a Conditioned Place Preference to Morphine: Effects of Lesions of Various CNS Sites. *Behavioral Neuroscience*, Vol.111, N°6, 1313-1323.
- OOKUMA, K., BARTON, C., YORK, D.A. & BRAY G.A. (1997). Effect of Enterostatin and Kappa-Opioids on Macronutrient Selection and Consumption. *Peptides*, .18 (6), 785-791.
- OOMURA, Y. (1976): Significance of glucose, insulin, and free- fatty acid on the hypothalamic feeding and satiety neurons. En: Novin, D., Wyrwicka, W. & Bray, G. (Eds.) Hunger: Basic Mechanisms and Clinical Implications, Raven, New York.

- OOMURA, Y., NISHINO, H., AOU, S. & LENARD, L. (1986): Opiate mechanisms in reward-related neuronal responses during operant feeding behavior of the monkey, *Brain Research*, 365, 335-339.
- OROSCO, M. & NICOLAÏDIS, S. (1996): Insulin and Serotonin Actions and Interactions and the Control of Feeding and Metabolism. En: Cooper, S. J. & Clifton, P. G. : Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behavior. Academic Press, pp. 99-126.
- PACKARD, M. G. & McGAUGH, J. L. (1996): Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiol. Learn. Mem.* 65 (1), 65-72.
- PAN, W., KASTIN, A. J., BANKS, W. & ZADINA, J. E. (1999): Effects of peptides: a cross-listing of peptides and their central actions published in the journal 'Peptides' from 1994 through 1998. *Peptides* 20, 1127-1138.
- PANAGIS, G., NOMIKOS, G.G., MILIARESSIS, E., CHERGUL, K. KASTELLAKIS, A. SVENSSON, T. H. & SPYRAKI, C. (1997): Ventral Pallidum Self-Stimulation induces stimulus dependent increase in C-Fos expression in Reward-related brain regions. *Neuroscience* 77 (1), 175-186.
- PANKSEPP, J. (1980). Brief Social Isolation, Pain Responsivity, And Morphine Analgesia in Young Rats. *Psychopharmacology*, 72, 111-112.
- PAPADOUKA, V. & CARR, K. D. (1994): The Role of Multiple Opioid Receptors in the Maintenance of Stimulation-Induced Feeding. *Brain Res.*, 639, 42-48.
- PAPAS, S. & FERGUSON, A. V. (1990): Electrophysiological Characterization of Reciprocal Connections Between the Parabrachial Nucleus and the Area Postrema in the Rat. *Brain Res. Bull.*, 24, 577-582.
Parabrachial Nuclei Disrupt Aversion Learning Induced by Electrical Stimulation of the Area Postrema. *Brain Research Bulletin*, 30, 585-592.
- PARADA, M. A., PUIG DE PARADA, M. & HOEBEL, B. G. (1995): Rats Self-Inject a Dopamine Antagonist in the Lateral Hypothalamus where it acts to increase extracellular dopamine in the N. Accumbens. *Pharmacol., Bioch. & Beh.* 52(1), 179-187.
- PARK, T.H. & CARR, K.D. (1998). Neuroanatomical Patterns of Fos-like Immunoreactivity Induced by a palatable Meal -Paired Environment in Saline- and Naltrexone- Treated Rats. *Brain Research*, 805, 169-180.
- PARKER, J. L. & VAN DER KOOY, D. (1995): Tegmental Pedunculopontine Nucleus Lesions do not block Cocaine Reward. *Pharmacol. Bioch. & Behavior*, 52 (1), 77-83.
- PARKER, L. A. & CARVELL, T. (1986): Orofacial and Somatic Responses Elicited by Lithium-, Nicotine-, and Amphetamine-Paired Sucrose Solution. *Pharmacol. Biochem. & Beh.*, 24, 883-887.
- PARKER, L. A. (1991): Taste Reactivity Responses Elicited by Reinforcing Drugs: A Dose-Response Analysis. *Beh. Neurosc.*, 103 (6), 955-964.
- PARKER, L., FAILOR, A. & WEIDMAN, K. (1973): Conditioned Preferences in the Rat with an Unnatural Need state: Morphine Withdrawal. *J. of Comp. & Physiol. Psychol.*, 82 (2), 294-300.
- PARKER, L.A., CYR, J.A., SANTI, A.N. & 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. *Pharmacol. Bioch. & Beh.*, 72, 87-92.

BIBLIOGRAFIA

- PARKINSON, J.A., CROFTS, H.S., MC GUIGAN, M., TOMIC, D.L., EVERITT, B.J. & ROBERTS, A.C. (2001). The Role of the Primate Amygdala in Conditioned Reinforcement. *Journal of Neuroscience*, 21(19), 7770-7780.
- PARKINSON, J.A., ROBBINS, T.W. & EVERITT, B.J. (1999). Selective Excitotoxic Lesions of the Nucleus Accumbens Core and Shell Differentially Affect Aversive Pavlovian Conditioning to Discrete and Contextual Cues. *Psychobiology*, 27(4), 256-266.
- PAUL, S. M., HULIHAN-GIBLIN, B. & SKOLNICK, P. (1982): (+)-Amphetamine Binding to Rat Hypothalamus: Relation to Anorectic Potency of Phenylethylamines. *Science*, 218, 487-490.
- PAVLOV, I. P. (1910): The Work of the Digestive Glands (transl. W. H. Thompson). London: Charles Griffin & Co.
- PAVLOVIC, Z.W. & BODNAR, R. (1998). Opioid Supraspinal Analgesic Synergy Between the Amygdala and Periaqueductal Gray in Rats. *Brain Research*, 779, 158-169.
- PAXINOS, G. & WATSON, C. (1996): The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, (Compact Third Edition) San Diego, CA. Academic Press.
- PAXINOS, G. (1995): The Rat Nervous System, second edition, Academic Press.
- PECIÑA, S. & 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.
- PEGO-REIGOSA, R., COVEÑAS, R. TRAMU, G & PESINI, P. (2000): Distribution of met-enkephalin immunoreactivity in the diencephalon and the brainstem of the dog. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 19 (4), 243-258.
- PEREZ, C., FANIZZA, L. J. & SCLAFANI, A. (1999): Flavor Preferences Conditioned by Intra-gastric Nutrient Infusions in Rats fed Chow of a Cafeteria Diet. *Appetite*, 32, 155-170.
- PEREZ, C., LUCAS, F. & SCLAFANI, A. (1998): Increased Flavor Acceptance and Preference Conditioned by the Postingestive Actions of Glucose. *Physiology and Behavior* 64 (4), 483-492.
- PERT, C. & SNYDER, S. H. (1973): Opiate receptor: Demonstration in Nervous Tissue. *Science*, 179, 1011-1014.
- PETRI, H.L. & MISHKIN, M. (1994). Behaviorism, Cognitivism and the Neuropsychology of Memory. *American Scientist*, Vol.82, 30-37.
- PETROV, T., JHAMANDAS, J. H. & KRUKOFF, T. L. (1992a): Characterization of Peptidergic Efferents from the Lateral Parabrachial Nucleus to Identified Neurons in the Rat Dorsal Rafe Nucleus. *J. Chem. Neuroanat.*, 5 (5), 367-373.
- PETROV, T., KRUKOFF, T. L. & JHAMANDAS, J. H. (1992b): The Hypothalamic Paraventricular and Lateral Parabrachial Nuclei Receive Collaterals from Raphe Nucleus Neurons: A Combined Double Retrograde and Immunocytochemical Study. *J. Comp. Neurol.*, 318 (1), 18-26.
- PETROVICH, G. D. & SWANSON, L. W. (1997): Projections from the Lateral Part of the Central Amygdalar Nucleus to the postulated fear conditioning circuit. *Brain Research*, 763, 247-254.
- PEYRON, R., LAURENT, B. & GARCIA-LARREA, L. (2000). Functional Imaging of Brain Responses to Pain. A Review and Meta-Analysis. *Neurophysiol Clin*, 30, 263-288.

- PHILLIPS, G. D., ROBBINS, T. W. & EVERITT, B. J. (1994): Mesoaccumbens dopamine-opiate interactions in the control over behaviour by a conditioned reinforcer. *Psychopharmacology* 114, 345-359.
- PICCIOTTO, M.R. & CORRIGALL, W.A. (2002). Neuronal Systems Underlying Behaviors Related to Nicotine Addiction: Neural Circuits and Molecular Genetics. *The Journal of Neuroscience*, 22(9), 3338-3341.
- PICKEL, V. M. & COLAGO, E. E. O. (1999): Presence of Mu-Opioid Receptors in Targets of Efferent Projections from the Central Nucleus of the Amygdala to the Nucleus of the Solitary Tract. *Synapse* 33, 141-152.
- PICKER, M. J., ALLEN, R. M., MORGAN, D., LEVINE, A. S., O'HARE, E., CLEARY, J. P. (1999): Effects of Neuropeptide Y on the Discriminative Stimulus and Antinociceptive Properties of Morphine. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 64 (1), 161-164.
- PIZZI, W.J. & COOK, D.F. (1996). Conditioned Taste Aversion is a Confound in Behavioral Studies that Report a Reduction in the Reinforcing Effects of Drugs. *Pharmacol. Biochemistry and Behavior*, 7(2), 243-247.
- PORRO, C.A., CAVAZZUTI, M., BARALDI, P., GIULIANI, D. & PANERAI A.E. (1999). CNS Pattern of Metabolic Activity During Tonic Pain Evidence for Modulation by β -endorphin. *European Journal of Neuroscience*, Vol.11, 874-888.
- POTHOS, E., CREESE, I. & HOEBEL, B.G. (1995). Restricted Eating with Weight Loss Selectively Decreases Extracellular Dopamine in the Nucleus Accumbens and Alters Dopamine Response to Amphetamine, Morphine, and Food Intake. *The Journal of Neuroscience*, 15(10), 6640-6650.
- PRITCHARD, T. C., HAMILTON, R. B. & NORNGREN, R. (2000): Projections of the Parabrachial Nucleus on the Old World Monkey. *Experimental Neurology*, 165, 101-117.
- PROUDFIT, H. K. & YEOMANS, D. C. (1995): The Modulation of Nociception by Enkephalin-Containing Neurons in the Brainstem. En: Tseng, L. F., The Pharmacology of Opioid Peptides Harwood Acad. Press, pp. 197-217.
- PU, S.F., ZHUANG, H.X. & HAN, J.S, (1994). Cholecystokinin Octapeptide (CCK-8) Antagonizes Morphine Analgesia in Nucleus Accumbens of the Rat Via the CCK-B Receptor. *Brain Research*, 657, 159-164.
- PUERTO, A. & MOLINA, F. (1977): Sensitividad en el Sistema Gastrointestinal. *Rev. de Psicol. General y Apl.*, 32, 146, 377-389.
- PUERTO, A. & MOLINA, F. (1980a): Aprendizaje interoceptivo. En: Guillamón, A. (Ed.), Fundamentos Biológicos de la Conducta II (pp. 981-993). UNED.
- PUERTO, A., DEUTSCH, J. A., MOLINA, F. & 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. & ROLL, P. L. (1976b): Rapid Rewarding Effects of Intra-gastric Injections. *Behavioral Biology*, 18, 123-124.
- RADA, P. V., MARK, G. P., YEOMANS, J.J. & HOEBEL, B.G. (2000): Acetylcholine Release in Ventral Tegmental Area by Hypothalamic Self-Stimulation, Eating, and Drinking. *Pharmacol., Bio. & Behavior* 65 (3), 375-379.
- RADA, P.V. & HOEBEL, B.G. (2001): Aversive Hypothalamic Stimulation Releases Acetylcholine in the Nucleus Accumbens, and Stimulation-Escape decreases it. *Brain Research* 888, 60-65.

BIBLIOGRAFIA

- RADA, P.V., MARK, G. P. & HOEBEL, B.G. (1998): Dopamine release in the Nucleus Accumbens by Hypothalamic Stimulation-Escape Behavior. *Brain Research* 782, 228-234.
- RAGNAUTH, A., RUEGG, H. & 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.
- RAINVILLE, P. (2002): Brain Mechanisms of Pain Affect and Pain Modulation. *Current Opinion in Neurobiology*, 12 (2), 195-204.
- RAMOS-ATANCE, R. (1993): Neurobiología de la Drogadicción. Eudema, biología.
- RANALDI, R. & BENINGER, R. J. (1994): The effects of systemic and intracerebral injections of D1 and D2 agonists on Brain Stimulation Reward. *Brain Research* 651, 283-292.
- RANALDI, R. & WISE, R.A. (2001). Blockade of Dopamine Receptors in the Ventral Tegmental Area Decreases Cocaine Reward: Possible Role for Dendritically Released Dopamine. *The Journal of Neuroscience*, 21(15), 5841-5846.
- RAYBOULD, H. E. (1999). Nutrient tasting and signaling mechanisms in the gut I. Sensing of lipid by the intestinal mucosa. *Am. J. Physiol.*, 277, (40): G751-G755.
- REBER P.J., KNOWLTON, B.J. & SQUIRE, L.R. (1996). Dissociable Properties of Memory Systems: Differences in the Flexibility of Declarative and Nondeclarative Knowledge. *Behavioral Neuroscience*, 110 (5), 861-871.
- REID, M. & HETHERINGTON, M. (1997). Relative effects of carbohydrates and protein on satiety: A review of methodology. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 21, (3): 295-308.
- REILLY, S. & PRITCHARD, T. C. (1996a): Gustatory Thalamus Lesions in the Rat: I. Innate Taste Preferences and Aversions. *Behavioral Neuroscience* 110 (4), 737-745.
- REILLY, S. & PRITCHARD, T. C. (1996b): Gustatory Thalamus Lesions in the Rat: II. Aversive and Appetitive Taste Conditioning. *Behavioral Neuroscience* 110 (4), 746-759.
- REILLY, S. & 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. & TRIFUNOVIC, R. (2000b): Lateral Parabrachial Nucleus Lesions in the rat: Aversive and appetitive gustatory conditioning. *Brain Research Bulletin*, 52 (4), 269-278.
- REILLY, S. (1999): The Parabrachial Nucleus and Conditioned Taste Aversion. *Brain Research Bulletin* 48 (3), 239-254.
- REILLY, S., GRIGSON, P. S. & NORNGREN, R. (1993): Parabrachial Nucleus Lesions and Conditioned Taste Aversion: Evidence Supporting an Associative Deficit. *Behavioral Neuroscience*, 107 (6), 1005-1017.
- REYNOLDS, J.N.J., HYLAND, B.I. & WICKENS, J.R. (2001). A Cellular Mechanism of Reward-Related Learning. *Nature*, Vol.413, 67-70.
- RITTER, R. C., BRENNER, L. & YOX, D. P. (1992a): Participation of vagal sensory neurons in putative satiety signals from the upper gastrointestinal tract. En: Ritter, S., Ritter, R. C. & Barnes, C. D. (Eds.), Neuroanatomy and Physiology of Abdominal Vagal Afferents, CRC Press, pp. 221-247.

- RITTER, R. C., SLUSSER, P. G. & STONE, S. (1981): Glucorreceptors Controlling Feeding and Blood Glucose: Location in the Hindbrain. *Science*, 213, 451-453.
- RITTER, S. (1994). Multiple metabolic controls of feeding. *Appetite*, 23, 199.
- RITTER, S., CALINGASAN, N. Y., HUTTON, B. & DINH, T. T. (1992b): Cooperation of vagal and central neural systems in monitoring metabolic events controlling feeding behavior. En: Ritter, S., Ritter, R. C. & Barnes, C. D. (Eds.), Neuroanatomy and Physiology of Abdominal Vagal Afferents , CRC Press, pp. 249-277.
- RITTER, S., DINH, T. T., & FRIEDMAN, M. I. (1994): Induction of Fos-like immunoreactivity (Fos-li) and stimulation of feeding by 2,5-anhydro-D-mannitol (2,5-AM) require the vagus nerve. *Brain Res.* 646, 53-64.
- RITTER, S. DINH, T. T. & ZHANG, Y. (2000): Localization of hindbrain glucoreceptive sites controlling food intake and blood glucose. *Brain Research*, 856 (1-2), 37-47.
- ROBBINS, T. W. & EVERITT, B. J. (1996): Neurobehavioural Mechanisms of Reward and Motivation. *Current Opinion in Neurobiology*, 6, 228-236.
- ROBBINS, T. W. & EVERITT, B. J. (1999): Motivation and Reward. En: Zigmond et al., Fundamental Neuroscience, Academic Press.
- ROBERT, J. J., OROSCO, M., ROUCH, C., COHEN, Y. & JACQUOT, C. (1991): Effects of Dexfenfluramine and Opioid Peptides, Alone or in Combination, on Food Intake and Brain Serotonin Turnover in Rats. *Pharmacol., Bioch. & Beh.*, 38, 775-780.
- ROBINSON, T.E. & BERRIDGE, K.C. (2003): Addiction. *Annu. Rev. Psychol.*, 54, 10.1-10.29.
- ROBINSON, T. E. & BERRIDGE, K. C. (2000): The psychology and neurobiology of addiction: an incentive-sensitization view. *Addiction* 95 (Suppl. 2), S91-S117.
- ROGERS, P.J. & SMIT, H.J. (2000). Food Craving and Food "Addiction": A Critical Review of The Evidence From a Biopsychosocial Perspective. *Pharmacol. Biochemistry and Behavior*, .66(1), 3-14.
- ROGERS, R. C. & HERMANN, G. E. (1992). Central regulation of brainstem gastric vago-vagal control circuits. En: S. Ritter, R. C. Ritter & C. D. Barnes (Eds.). Neuroanatomy and Physiology of Abdominal Vagal Afferents, (pp. 99-134), CRC press.
- ROGERS, R. C. & HERMANN, G. E. (1992): Central Regulation of Brainstem Gastric Vago-Vagal Control Circuits. En: Ritter, S., Ritter, R. C. & Barnes, C. D. (Eds.), Neuroanatomy and Physiology of Abdominal Vagal Afferents , CRC Press, pp.99-134.
- ROITMAN, M. F., VAN DIJK, G., THIELE, T. E. & BERNSTEIN, I. L. (2001): Dopamine mediation of the feeding response to violations of spatial and temporal expectancies. *Behavioural Brain Research* 122, 193-199.
- ROLLS, E. T. (1982): Feeding and Reward. En: Hoebel, B. G. & Novin, D. (Eds.): The Neural Basis of Feeding and Reward, Haer Institute for Electrophysiol. Research., pp. 323-328.
- ROLLS, E. T. (1994): Neural processing related to feeding in primates. En: Legg, C. R. & Booth, D. A. (Eds.) Appetite , OUP, pp. 11-53.
- ROLLS, E. T. (1996): Neural Processing Related to Feeding in Primates. En: Legg, C. R. & Booth, D. A. (Eds.) Appetite , OUP, pp. 11-53.

BIBLIOGRAFIA

- ROLLS, E. T. (1997). Taste and olfactory processing in the brain and its relation to the control of eating. *Crit. Rev. Neurobiol.*, 11, (4): 263-287.
- ROLLS, E. T. (2000): Memory Systems in the Brain. *Ann. Rev. Psychol.* 51, 599-630.
- ROLLS, E. T., BURTON, M. J. & MORA, F. (1976): Hypothalamic Neuronal Responses associated with the sight of food. *Brain Research*, 111, 53-66.
- ROLLS, E. T., BURTON, M. J. & MORA, F. (1980): Neurophysiological Analysis of Brain-Stimulation Reward in the Monkey. *Brain Res.* 194, 339-357.
- ROUTTENBERG, A. (1976): Self-Stimulation Pathways: Origins and Termination -a three stage technique-. En: Wauquier, A. & Rolls, E. T. (Eds): Brain-Stimulation Reward, North-Holland Publ. Comp., Cap. 2.
- ROWLAND, N. E., MORIEN, A. & LI. B. -H. (1996). The physiology and brain mechanisms of feeding. *Nutrition*, 12, (9): 626-639.
- ROWLAND, N.E., MARSHALL, M. & ROTH, J.D. (2000). Comparison of Either Norepinephrine-Uptake Inhibitors or Phentermine Combined with Serotonergic Agents on Food Intake in Rats. *Psychopharmacology*, 149,77-83.
- ROZIN, P & KALAT, J. W. (1971): Specific hungers and poison avoidance as adaptative specializations of learning. *Psychol. Rev.* 78, 459-486.
- RUDSKY, J. M., BILLINGTON, C. J. & LEVINE, A.S., (1997): A Sucrose-Based Maintenance Diet Increase Sensitivity to Appetite Suppressant Effects of Naloxone. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 58 (3), 679-682.
- RUGG, E. L., DUNBAR, J. S., LATIMER, M. & WINN, P. (1992): Excitotoxic Lesions of the Pedunculopontine Tegmental Nucleus of the Rat. I. Comparison of the Effects of Various Excitotoxins, with Particular Reference to the Loss of Immunohistochemically Identified Cholinergic Neurons. *Brain Res.*, 58, 181-193.
- RUGGIERO, D.A., REGUNATHAN, S., WANG, H., MILNER,T.A. & REIS, D.J. (1998). Immunocytochemical Localization of an Imidazoline Receptor Protein in the Central Nervous System. *Brain Research*, 780, 270-293.
- SAGAR, S. M., SHARP, F. R. & CURRAN, T. (1988): Expression of c-fos Protein in Brain: Metabolic Mapping at the Cellular Level. *Science*, 240, 1328-1331.
- SAKAI, N. & 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. & YAMAMOTO, T. (1998): Role of the Medial and Lateral Parabrachial Nucleus in acquisition and retention of Conditioned Taste Aversion in Rats. *Behavioural Brain Research*, 93, 63-70.
- SAKO, N., HARADA, S., YAMAMOTO, T. (2000): Gustatory information of umami substances in three mayor taste nerves. *Physiology and Behavior* 71, 193-198.
- SALAMONE, J. D. (1994): The involvement of Nucleus Accumbens Dopamine in appetitive and aversive motivation. *Behav. Brain Res.* 61, 117-133.
- SALAMONE, J. D., COUSINS, M. S. & BUCHER, S. (1994a): Anhedonia or anergia?: Effects of haloperidol and Nucleus Accumbens Dopamine Depletion on instrumental response selection in a T-maze cost/benefit procedure. *Beh. Brain Research* 65, 221-229.

- SALAMONE, J. D., COUSINS, M. S. & SNYDER, B. J. (1997): Behavioral Functions of Nucleus Accumbens Dopamine: Empirical and Conceptual Problems with the Anhedonia Hypothesis. *Neurosc. & Biobeh. Rev.* 21 (3), 341-359.
- SALAMONE, J. D., COUSINS, M. S., McCULLOUGH, L. D., CARRIERO, D. L. & BERKOWITZ, R. J. (1994b): Nucleus Accumbens Dopamine Release Increases During Instrumental Lever Pressing for Food but not Free Food Consumption. *Pharmacol., Bioch. & Beh.*, 49 (1), 25-31.
- SALEH, T. M. & CECHETTO, D. F. (1993): Peptides in the Parabrachial Nucleus Modulate Visceral Input to the Thalamus. *Am. J. of Physiol.*, 264 (4), R668-R675.
- SAMANIN, R. & GRIGNASCHI, G. (1996): Role of 5-Hydroxytryptamine Receptor Subtypes in Satiety and Animal Models of Eating Disorders. En: Cooper, S. J. & Clifton, P. G. : Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behavior. Academic Press, pp. 39-58.
- SANGER, D.J. & McCARTHY, P.S. (1980). Differential Effects of Morphine on Food and Water Intake in Food Deprived and Freely-Feeding Rats. *Psychopharmacology*, 72, 103-106.
- SANGER, D.J. & MCCARTHY, P.S. (1981). Increased Food and Water Intake Produced in Rats by Opiate Receptor Agonists. *Psychopharmacology*, 74, 217-220.
- SAPER, C. B. (1995a): The Spinoparabrachial Pathway: Shedding New Light on an Old Path. *The J. of Comp. Neurol.*, 353, 477-479.
- SAPER, C. B. (1995b): Central Autonomic System. En: Paxinos, G.: The Rat Nervous System, second edition, Academic Press, 107-128.
- SAPER, C. B., CHOU, T. C. & ELMQUIST, J.K. (2002): The Need to Feed: Homeostatic and Hedonic Control of Eating. *Neuron* 36, Issue 2, 10 October 2002, Pages 199-211.
- SATORRA-MARÍN, N., COLL-ANDREU, M., PORTELL-CORTES, I., ADALVERT-VERA, L. & MORGADO-BERNAL, I. (2001): Impairment of two-way active avoidance after pedunculo-pontine tegmental nucleus lesions: effects of conditioned stimulus duration. *Behavioural Brain Research*, 118, 1-9.
- SAWCHENKO, P. E. (1982): Anatomic Relationships between the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus and Visceral Regulatory Mechanisms: Implications for the Control of Feeding Behavior. En: Hoebel, B. G. & Novin, D. (Eds.): The Neural Basis of Feeding and Reward, Haer Institute for Electrophysiol. Research., pp. 259-274.
- SCALERA, G., SPECTOR, A. C. & NORNGREN, R. (1995): Excitotoxic Lesions of the Parabrachial Nuclei Prevent Conditioned Taste Aversion and Sodium Appetite in Rats. *Behavioral Neuroscience*, 109 (5), 997-1008.
- SCHACTER, D. L. (1987): Implicit Memory: History and Current Status. *J. Exper. Psychol.: Learning, Mem. & Cognit.*, 3, 501-518.
- SCHACTER, D. L. (1992a): Priming and Multiple Memory Systems: Perceptual Mechanisms of Implicit Memory. *J. of Cognit. Neurosc.*, 4 (3), 244-256.
- SCHACTER, D. L. (1992b): Implicit Knowledge: New Perspectives on Unconscious Processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 11113-11117.
- SCHACTER, D. L., CHIU, C. P. & OCHSNER, K. N. (1993): Implicit Memory: A Selective Review. *Annu. Rev. Neurosc.*, 16, 159-182.

BIBLIOGRAFIA

- SCHAEFFER, L. A., KOCH, J. E. & BODNAR, R. J. (1994): Naltrexone, Dopamine Receptor Agonists and Antagonists, and Food Intake in Rats: 2-Deoxy-D-Glucose. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 49 (1), 205-211.
- SCHARRER, E. (1999). Control of food intake by fatty acid oxidation and ketogenesis. *Nutrition*, 15, (9): 704-714.
- SCHECTER, M.D. & CALCAGNETTI, D. (1998). Continued Trends in the Conditioned Place Preference Literature from 1992 to 1996, Inclusive, with a Cross-Indexed Bibliography. *Neuroscience & Biobehav. Reviews*, Vol.22,N° 6, 827-846.
- SCHROEDER, J.P. & 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. & DUDAI, Y. (1996). Flavor and the frontal cortex. *Behav. Neurosci.*, 110, (4): 760-765.
- SCHULTEIS, G. & KOOB, G.F. (1994). Dark side of Drug Dependence. *Nature*, Vol.371. 108-109.
- SCHULTZ, W. (2002) Getting Formal with Dopamine and Reward, *Neuron*, 36 (2), 241-263 .
- SCHULTZ, W. (1997): Dopamine Neurons and their Role in Reward Mechanisms. *Current Opinion in Neurobiology*, 7, 191-197.
- SCHULTZ, W., TREMBLAY, L. & HOLLERMAN, J.R. (1998): Reward Prediction in Primate Basal Ganglia and Frontal Cortex. *Neuropharmacology* 37, 421-429.
- SCHWARTZ, G. J. (2000) The Role of Gastrointestinal Vagal Afferents in the Control of Food Intake: Current Prospect. *Nutrition*, 16, 866-873.
- SCHWARTZ, M.W., WOODS, S.C., PORTE, D., SEELEY, R.J. & BASKIN, D.G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404, 661-671.
- SELF, D. W., & NESTLER, E. J. (1995): Molecular Mechanisms of Drug Reinforcement and Addiction. *Annu. Rev. Neurosci.*,18, 463-495.
- SELL, L. A., MORRIS, J., BEARN, J. FRACKOWIAK, R. S. J., FRISTON, K. J. & DOLAN, R. J. (1999): Activation of Reward Circuitry in Human Opiate Addicts. *European J. of Neuroscience*, 11, 1042-1048.
- SHABIR, S. & KIRKHAM, T. C. (1999): Diet- Induced Enhancement of Naloxone Sensitivity Is Independent of Changes in Body Weigh. *Pharmacol. Biochem. & Behavior*, 62 (4), 601-605.
- SHIMURA, T. TANAKA, H. & 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.
- SHIPPENBERG, T. S. & BALS-KUBIK, R. (1995): Involvement of the Mesolimbic Dopamine System in Mediating the Aversive Effects of Opioid Antagonists in the Rat. *Behavioural Pharmacol.*, 6, 99-106.
- SHIPPENBERG, T. S. & ELMER, G. I. (1998): The Neurobiology of Opiate Reinforcement. *Critical Rev. Neurobiol.* 12 (4), 267-303.

- SHIPPENBERG, T. S., BALS-KUBIK, R. & HERZ, A. (1993): Examination of the Neurochemical Substrates Mediating the Motivational Effects of Opioids: Role of the Mesolimbic Dopamine System and D-1 Vs. D-2 Dopamine Receptors. *The J. of Pharmacol. & Exp. Therap.*, 265 (1), 53-59.
- SHIPPENBERG, T. S., HERZ, A., SPANAGEL, R., BALS-KUBIK, R. & STEIN, C. (1992): Conditioning of Opioid Reinforcement.- Neuroanatomical and Neurochemical Substrates. *Ann. of the N. Y Acad. Sci.* 654, 347-356.
- SHIZGAL, P. (1997): Neural Basis of Utility Estimation. *Current Opinion in Neurobiology*, 7, 198-208.
- SILLS, T. L. & VACCARINO, F. J. (1998): Individual Differences in the Feeding and Locomotor Stimulatory Effects of Acute and Repeated Morphine Treatments. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 60 (1); 293-303.
- SIMANSKY, K. J. (1996): 5-HT Receptor Subtypes Influencing Feeding and Drinking: Focus on the Periphery. En: Cooper, S. J. & Clifton, P. G. : Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behavior. Academic Press, 59-97.
- SIMANSKY, K.J. & NICKLOUS, D.M. (2002). Parabrachial Infusion of D-Fenfluramine Reduces Food Intake Blockade by the 5-HT_{1B} Antagonist SB-216641. *Pharmacol. Biochemistry and Behavior*, 71 (4), 681-690.
- SIMON, E. J. & HILLER, J. M. (1994): Opioid Peptides and Opioid Receptors. En: Siegel, G. J., Agranoff, B. W., Albers, R. W. & Molinoff, P. B. (Eds.), Basic Neurochemistry (5ª Edic.) Raven Press, pp. 321-339.
- SIMON, E. J., HILLER, J. M. & EDELMAN, I. (1973): Stereospecific Binding of the Potent Narcotic Analgesic [¹H]-Etorphine to Rat Brain Homogenate. *Proceed. Natl. Acad. Sci. USA*, 70, 1947-1949.
- SINHA, R. (2001). How Does Stress Increase Risk of Drug Abuse and Relapse?. *Psychopharmacology*, 158,343-359.
- SIVIY, S. M., CALCAGNETTI, D. J. & REID, L. D. (1982): Opioids and Palatability. En: Hoebel, B. G. & Novin, D. (Eds.): The Neural Basis of Feeding and Reward, Haer Institute for Electrophysiol. Research., pp. 517-524.
- SLUGG, R. M. & LIGHT, A. R. (1994): Spinal Cord and Trigeminal Projections to the Pontine Parabrachial Region in the Rat as Demonstrated with Phaseolus Vulgaris Leucoagglutinin. *J. Comp. Neurol.*, 339 (1), 49-61.
- SMALL, D.M. (2002). Toward an Understanding of the Brain Substrates of Reward in Humans. *Neuron*, 33, 668-671.
- SMITH, B. K., YORK, D. A. & BRAY, G. A. (1998): Chronic d-Fenfluramine Treatment Reduces Fat Intake Independent of Macronutrient Preference. *Pharmacol. Bioch. and Behavior* 60 (1), 105-114.
- SMITH, D. V., LIU, H. & VOGT, M. B. (1994): Neural Coding of Aversive and Appetitive Gustatory Stimuli: Interactions in the Hamster Brain Stem. *Physiol. & Beh.*, 56 (6), 1189-1196.
- SMITH, D. V. & MARGOLSKEE, R. F. (2001): El sentido del gusto. *Investigación y Ciencia*, 296, 4-12.

BIBLIOGRAFIA

- SMITH, G. P., GIBBS, J. & KULKOSKY, P. J. (1982): Relationships between Brain-Gut Peptides and Neurons in the Control of Food Intake. En: Hoebel, B. G. & Novin, D. (Eds.): The Neural Basis of Feeding and Reward, Haer Institute for Electrophysiol. Research., pp. 149-166.
- SMITH, G.P. (2000). The Controls of Eating: A Shift Nutritional Homeostasis to Behavioral Neuroscience. *Nutrition*, 16, 814-820.
- SÖDERPALM, A. H. V., & 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. & 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.
- SOLOMON, R. L. & CORBIT, J. D. (1973): An opponent-process theory of motivation. II. Cigarette Addiction. *J. Abnorm. Psychol.*, 81, 158-171.
- SOMERVILLE, E. M. & CLIFTON, P. G. (1996): Neurochemical Interactions in the Control of Ingestive Behaviour. En: Cooper, S. J. & Clifton, P. G. : Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behavior. Academic Press, pp. 369-388.
- SÖRDERSTEN, P., BEDNAR, I., QURESHI, G. A., CARRER, H., QIAN, M., MAMOUN, H., KAPLAN, J. M. & JOHNSON, A. E. (1996): Cholecystokinin-Dopamine Interactions in Satiety. En: Cooper, S. J. & Clifton, P. G. : Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behavior. Academic Press, pp. 19-38.
- SPANAGEL, R. (1995). Modulation of Drug-induced Sensitization Processes by Endogenous Opioid systems. *Behavioural Brain Research*, 70, 37-49.
- SPANAGEL, R. & WEISS, F. (1999): The Dopamine Hypothesis of Reward: Past and Current Status. *TINS* 22 (11), 521-527.
- SPANAGEL, R., HERZ, A. & SHIPPENBERG, T. S. (1992): Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. 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. & GRILL, H. J. (1992): Parabrachial Gustatory Lesions Impair Taste Aversion Learning in Rats. *Beh. Neurosci.*, 106(1), 147-161.
- SPITERI, T., LE PAPE, G. & 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. (1992): Declarative and Non-Declarative Memory: Multiple Brain Systems Supporting Learning and Memory. *J. of Cognit. Neurosc.*, 4 (3), 232-243.
- SQUIRE, L. R., KNOWLTON, B. & MUSSEN, G. (1993): The Structure and Organization of Memory. *Ann. Rev. Psychol.*, 44, 453-495.
- STAHL, S. M. (2000): Essential Psychopharmacology, second edit. Cambridge University Press.
- STANLEY, B. G. (1996): Glutamate and its Receptors in Lateral Hypothalamic Stimulation of Eating. En: Cooper, S. J. & Clifton, P. G. : Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behavior. Academic Press, pp. 301-322.

- STANTON, M.E. (2000). Multiple Memory Systems, Development and Conditioning. *Behavioural Brain Research*, 110, 25-37.
- STECKLER, T., KEITH, A. B. & SAHGAL, A. (1994): Lesions of the Pedunclopontine Tegmental Nucleus do not alter delayed non-matching to position accuracy. *Behavioural Brain Research*, 61 (1), 107-112.
- STEFURAK, T. L. & VAN DER KOOY, D. (1992): Saccharin's Rewarding, Conditioned Reinforcing, and Memory-Improving Properties: Mediation by Isomorphic or Independent Processes? *Behavioral Neuroscience*, 106 (1), 125-139.
- STEFURAK, T. L. & VAN DER KOOY, D. (1994): Tegmental Pedunclopontine Lesions in Rats Decrease Saccharin's Rewarding Effects but not Its Memory-Improving Effect. *Beh. Neurosci.*, 108 (5), 972-980.
- STEINMETZ, J.E., ROSEN, D.J., CHAPMAN, P.F., LAVOND, D.G. & THOMPSON R.F. (1986). Classical Conditioning of the Rabbit Eyelid Response with a Mossy-Fiber Stimulation CS: I. Pontine Nuclei and Middle Cerebellar Peduncle Stimulation. *Behavioral Neuroscience*, Vol.100, N°6, 878-887.
- STELLAR, E. (1954): The Physiology of Motivation. *Psychol. Rev.*, 61, 5-22.
- STELLAR, J. R. & 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. & Novin, D. (Eds.): The Neural Basis of Feeding and Reward, Haer Institute for Electrophysiological Research., pp. 431-444.
- STEVENS, K. E., SHIOTSU, G. & STEIN, L (1991): Hippocampal μ -receptors mediate opioid reinforcement in the CA3 region. *Brain Res.*, 545, 8-16.
- STEWART, J. (2000): Pathways to relapse: the neurobiology of drug- and stress-induced relapse to drug-taking. *J. Psychiatry Neurosci.* 25, 125-136.
- STEWART, J. & WISE, R. A. (1992): Reinstatement of heroin self-administration habits: morphine prompts and naltrexone discourages renewed responding after extinction. *Psychopharmacology*, 108, 79-84.
- STEWART, M. G., SAVORY, C. J. & 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. & KOOB, G.F. (2000). Opiate Withdrawal-Induced Place Aversion Lasts for Up To 16 Weeks. *Psychopharmacology*, 149, 115-120. *Pharmacol. Bioch. & Beh.*, 72, 87-92.
- STOLERMAN, I. (1992). Drugs of Abuse: Behavioural Principles, Methods and Terms. *Trends in Pharmacological Sciences*, Vol.13, 170-176.
- STRATFORD, T. R. & KELLEY, A. E. (1997): GABA in the Nucleus Accumbens Shell Participates in the Central Regulation of Feeding Behavior. *The J. of Neuroscience*, 17 (11), 4434-4440.
- STRATFORD, T. R., KELLEY, A. E. & SIMANSKY, K. J. (1999): Blockade of GABA-A receptors in the medial ventral pallidum elicits feeding in satiated rats. *Brain Research* 825, 199-203.
- STRATFORD, T. R., SWANSON, C. J. & KELLEY, A. (1998): Specific changes in food intake elicited by blockade or activation of glutamate receptors in the nucleus accumbens shell. *Behavioural Brain Research*, 93, 43-50.

BIBLIOGRAFIA

- SUPPLE, W. F. & KAPP, B. S. (1994): Anatomical and Physiological Relationships between the Anterior Cerebellar Vermis and the Pontine Parabrachial Nucleus in the Rabbit. *Br. Res. Bull.*, 33 (5), 561-574.
- SWANK, M. W. & BERNSTEIN, I. L. (1994): C-Fos Induction in Response to a Conditioned Stimulus after Single Trial Taste Aversion Learning. *Brain Res.* 636, 202-208.
- SWANSON, L. W. (1992): Brain Maps: Structure of the Rat Brain, Elsevier.
- TABER, M. T., ZERNIG, G. & FIBIGER, H. C. (1998): Opioid receptor modulation of feeding-evoked dopamine release in the rat Nucleus Accumbens. *Brain Research*, 785, 24-30.
- TAKAKI, A., NAGAI, K., TAKAKI, S., YANAIHARA, N. & NAKAGAWA, H. (1990): Satiety Function of Neurons Containing a CCK-like Substance in the Dorsal Parabrachial Nucleus. *Physiol. & Behavior*, 48, 865-871.
- TANDA, G. & DI CHIARA, G. (1998). A Dopamine- μ_1 Opioid Link in the Rat Ventral Tegmentum Shared by Palatable Food (Fonzies) and Non-Psychostimulant Drugs of Abuse. *European Journal of Neuroscience*. 10, 1179-1187.
- TASSIN, J.P. (1998). Drogas, Dependencia y Dopamina. *Mundo Científico*, 189, 98-73.
- TERENIUS, L. (1973): Characteristics of the 'receptor' for Narcotic Analgesic in Synaptic Plasma Membrane Fraction from Rat Brain. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 33, 377-384.
- TERRY, P. (1996): Dopamine Receptor Subtypes and Ingestive Behavior. En: Cooper, S. J. & Clifton, P. G. : Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behavior. Academic Press, pp. 233-266.
- THOMPSON, R. F. (1988): The Neural Basis of Basic Associative Learning of discrete behavioral responses. *Trends in Neurosciences*, 11, 170-175.
- THOMPSON, R. H. & SWANSON, L. W. (1998). Organization of inputs to the dorsomedial nucleus of hypothalamus: a reexamination with fluorogold and PHAL in the rat. *Brain Res. Rev.*, 27, 89-118.
- THOMPSON, R. H. & SWANSON, L. W. (2003): Structural characterization of a hypothalamic visceromotor pattern generator network. *Brain Research Reviews*, 41, 153-202.
- TIFFANY, S.T. & CARTER, B.L. (1998). Is Craving the Source of Compulsive Drug Use?. *Journal of Psychopharmacology* 12(1), 23-30.
- TISCHMEYER, W. & GRIMM, R. (1999): Activation of immediate early genes and memory formation. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 564-574.
- TKACS, N. C. & LI, J. (1999): Immune stimulation induces Fos expression in brainstem amygdala afferents. *Brain Research Bulletin*, 48 (2), 223-231.
- TOATES, F. (1989): Sistemas Motivacionales. Debate (1ª edic. en castellano).
- TORDOFF, M. G. & FRIEDMAN, M. I. (1986): Hepatic Control of Feeding: Effect of Glucose, Fructose and Mannitol Infusion. *The American Journal of Physiology*, 254, R969-R976.
- TORDOFF, M. G. & FRIEDMAN, M. I. (1989): Drinking Saccharin Increases Food Intake and Preference. IV. Cephalic Phase and Metabolic Factors. *Appetite*, 12, 37-56.
- TOUZANI, K., TRAMU, G., NAHON, J. L. & VELLELY, L. (1993): Hypothalamic melanin-concentrating hormone and alpha-neoendorphin-immunoreactive neurons project to the medial part of the rat Parabrachial Area. *Neuroscience* 53 (3), 865-876.

- TOWELL, A., MUSCAT, R. & WILLNER, P. (1987): Effects of pimozide on sucrose consumption and preference. *Psychopharmacology*, 92, 264-264.
- TREIT, D. & BERRIDGE, K. C. (1990): A Comparison of Benzodiazepine, Serotonin, and Dopamine Agents in the Taste-Reactivity Paradigm. *Pharmacol. Bioch. & Beh.*, 37, 451-456.
- TRIFUNOVIC, R. & REILLY, S. (2001a). Medial Versus Lateral Parabrachial Nucleus Lesions in the Rat: Effects Cholecystokinin -and D-Fenfluramine- Induced Anorexia. *Brain Research*, 894,288-296.
- TRIFUNOVIC, R. & REILLY, S. (2001b). Medial Versus Lateral Parabrachial Nucleus Lesions in the Rat: Effects on Mercaptoacetate-Induced Feeding and Conditioned Taste Aversion. *Brain Research Bulletin*,58(1), 107-113.
- TROJNAR, W. & STASZEWSKA, M. (1995): Bilateral Lesions of the Pedunclopontine Tegmental Nucleus affect Feeding Induced by Electrical Stimulation of the Ventral Tegmental Area. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 55, 201-206.
- TURENNE, S.D., MILES, C., PARKER, L.A. & SIEGEL, S. (1996). Individual Differences in Reactivity to the Rewarding/Aversive Properties of Drugs: Assessment by. Taste and Place Conditioning. *Pharmacol. 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 Neurob.*,Vol.56, 613-672.
- TZSCHENTKE, T.M. (2001). Pharmacology and Behavioral Pharmacology of The Mesocortical Dopamine System. *Progress in Neurobiology*, 63, 241-320.
- VACCARINO, F. J. (1996): Dopamine-Opioid Mechanisms in Ingestion. En: Cooper, S. J. & Clifton, P. G. : Drug Receptor Subtypes and Ingestive Behavior. Academic Press, pp. 219-231.
- VAN BOCKSTAELE, E. J., & PICKEL, V. M. (1995): GABA-containing neurons in the ventral tegmental area project to the nucleus accumbens in rat brain, *Brain Research*, 682 (1-2), 215-221.
- VAN BOCKSTAELE, E. J., CESTARI, D. M. & PICKEL, V. M. (1994): Synaptic structure and connectivity of serotonin terminals in the ventral tegmental area: potential sites for modulation of mesolimbic dopamine neurons. *Brain Research* 647, 307-322.
- VAN DER KOOY, D., SWERDLOW, N. & KOOB, G.F. (1983): Paradoxical Reinforcing Properties of Apomorphine: Effects of Nucleus Accumbens and Area Postrema Lesions. *Brain Research*, 259, 111-118.
- VASUDEV, R., GENTIL, C. G., & COVIAN, M. R. (1985): Taste Preferences in a Free-Choice Situation Following Electrical Stimulation and Lesion of Septal Area in Rats. *Physiology and Behavior* 34, 619-624.
- VAUGHAN, C. W., INGRAM, S. L., CONNOR, M. A. & CHRISTIE, M. J. (1997): How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. *Nature*, 390, 611-618.
- VEENING, J.G., COOLEN, L.M., SPOOREN, W.J.P.M., JOOSTEN, H., VAN OORSCHOT, R., MOS, J., RONKEN, E. & OLIVIER, B. (1998). Patterns of C-Fos Expression Induced by Fluvoxamine Are Different After Acute vs. Chronic Oral Administration. *European Neuropsychopharmacology*, 8, 213-226.

BIBLIOGRAFIA

- VEZINA, P. & STEWART, J. (1987): Conditioned Locomotion and Place Preference elicited by tactile cues paired exclusively with morphine in an open field. *Psychopharmacology* 131, 115-122.
- WALL, P.D. & MELZACK, R. (1998): Textbook of Pain. Churchill Livingstone, 4th Ed.
- WANG, D., WU, J. DONG, Y. & LI, Y. (2001): Synaptic connections between Trigemino-Parabrachial projection neurons and gamma-aminobutyric acid and glycine-immunoreactive terminals in the rat. *Brain Research*, 921, 133-137.
- WANG, L., CARDIN, S., MARTINEZ, V., TACHE, I. & LLOYD, C. K. (1999): Duodenal loading with glucose induces Fos expression in rat brain: selective blockade by devazepide. *The American J. of Physiology*, 277 (3) R667-R674.
- WANG, L.G., LI H.M. & 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.
- WARACZYNSKY, M. & SHIZGAL, P. (1995): Self-Stimulation of the MFB Following Parabrachial Lesions. *Physiology & Behavior*, 58 (3), 559-566.
- WEINER, N. & MOLINOFF, P. B. (1994): Catecholamines. En: Siegel, G. J., Agranoff, B.W., Albers, R.W. & Molinoff, P.B., Basic Neurochemistry (5^a Ed.) Raven Press.
- WEINSTEIN, A., FELDTKELLER, B., MALIZIA, A., WILSON, S., BAILEY, J. & NUTT, D.J. (1998). Integrating the Cognitive and Physiological Aspects of Craving. *Journal of Psychopharmacology* 12(1),31-38.
- WEISS, F. & PORRINO L.J. (2002). Behavioral Neurobiology of Alcohol Addiction: Recent Advances and Challenges. *The Journal of Neuroscience*,22(9),3332-3337.
- WELZL, H., ADAMO, P. & LIPP, H. P. (2001): Conditioned Taste Aversion as a Learning and Memory Paradigm. *Behavioural Brain Research*, 125, 205-213.
- WHITE, F. J. (2002): A Behavioral/Systems Approach to the Neuroscience of Drug Addiction. *The J. of Neuroscience* 22(9), 3303-3305.
- WHITE, N. M. & MILNER, P. M. (1992): The Psychobiology of Reinforcers. *Ann. Rev. Psychol.*, 43, 443-471.
- WHITE, N. M. (1989): Reward or Reinforcement: What's the Difference?. *Neurosc. & Biobeh. Reviews*, 13, 181-186.
- WICKELGREN, I. (1997). Getting the Brain's Attention. *Science*, Vol.278, 35-37.
- WISE, R. A. & ROMPRE, P. P. (1989): Brain dopamine and reward. *Annual Review of Psychology*, 40, 191-225.
- WISE, R. A. (1982): Common Neural Basis for Brain Stimulation Reward, Drug Reward, and Food Reward. En: Hoebel, B. G. & Novin, D. (Eds.): The Neural Basis of Feeding and Reward, Haer Institute for Electrophysiol. Research., pp. 445-454.
- WISE, R. A. (1994): A Brief History of the Anhedonia Hypothesis. En: Legg, C. R. & Booth, D. A. (Eds.) Appetite , OUP, pp. 243-263.
- WISE, R. A. (1996): Addictive Drugs and Brain Stimulation Reward. *Annual Review of Neuroscience*, 19, 319-340.

- WISE, R. A. (1997): Drug Self-Administration Viewed as Ingestive Behavior. *Appetite*, 28, 1-5.
- WISE, R. A. (1998): Drug-activation of Brain Reward Pathways. *Drug and Alcohol Dependence* 51, 13-22.
- WISE, R. A. (2000): Addiction Becomes a Brain Disease. *Neuron* 26, 27-33.
- WISE, R. A. (2002): Brain Reward Circuitry: Insights from Unsensed Incentives, *Neuron*, Volume 36, 10 (2), 229-240.
- WISE, R. A.(1999): Animal Models of Addiction. En: Charney, D. S., Nestler, E. J. & Bunney, B. S. Neurobiology of Mental Illness. Oxford University Press. N.Y.
- WOLINSKY, T. S., CARR, K. D., HILLER, J. M. & SIMON, E. J. (1994): Effects of Chronic Food Restriction on μ 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. & SIMON, E. J. (1996): Chronic Food Restriction Alters μ and k Opioid Receptor Binding in the Parabrachial Nucleus of the Rat: A Quantitative Autoradiographic Study. *Brain Research*, 706, 333-336.
- WOODS, S. C., FIGLEWICZ, D. P., MADDEN, L., PORTE, D. SIPOLS, A. J. & SEELEY, R. J. (1998b): NPY and food intake: Discrepancies in the model. *Regulatory Peptides*, 75-76, pp. 403-408.
- WOODS, S. C., SEELEY, R. J., PORTE, D. & SCHWARTZ, M. W. (1998a). Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science*, 280, 1378-1383.
- WOODS, S.C, SCHWARTZ M.W., BASKIN, D.G. & SEELEY, R. (2000). Food intake and the regulation of body weight. *Ann.Rev.Psychol*, 51, 255-277.
- WOODS, S. C. & STRICKER, E. M. (1999): Food Intake and Metabolism. En: Zigmond, et al.: Fundamental Neuroscience, Cap. 41, 1091-1109. Academic Press.
- WOOLVERTON, L.W. & JOHNSON, K.M. (1992). Neurobiology of Cocaine Abuse. *Trends in Pharmacological Sciences*, Vol.13, 193-200.
- WURTMAN, J. J. (1985): Neurotransmitter Control of Carbohydrate Consumption. En: *Annals of the New York Academy of Sciences*, 43, 145-151.
- WYVELL, C. L. & BERRIDGE, K. C. (2001): Incentive Sensitization by Previous Amphetamine Exposure: Increased Cue-Triggered 'Wanting' for Sucrose Reward. *The J. of Neuroscience*, 21 (19), 7831-7840.
- XU, B., LI, B. -H., ROWLAND, N. E. & KALRA, S. P. (1995): Neuropeptide Y injection into the fourth cerebroventricle stimulates C-Fos expression in the Paraventricular Nucleus and other nuclei in the Forebrain: effect of food consumption. *Brain Research*, 698 (1-2), 227-231.
- YAKABI, K., IWABUCHI, H., NAKAMURA, T., ENDO, K., FUKUNAGA, Y., KUMAKI, I. & TAKAYAMA, K. (2002). Neuronal Expression of Fos Protein in the Brain After Intravenous Injection of Gastrin in Rats. *Neuroscience Letters* 317, 57-60.
- YAMADA, J., & KITAMURA, T. (1992): Spinal Cord Cells Innervating the Bilateral Parabrachial Nuclei in the Rat: A Retrograde Fluorescent Double-Labeling Study. *Neurosc. Res.*, 15 (4), 273-280.
- YAMADA, S., OHSHIMA, T., ODA, H., ADACHI, M. & SATOH, T. (1990): Synchronized Discharge of Taste Neurons Recorded Simultaneously in Rat Parabrachial Nucleus. *J. of Neurophysiology*, 63 (2) 294-302.

BIBLIOGRAFIA

- YAMAMOTO, T & SAWA, K. (2000a). C-Fos- Like Immunoreactivity in the Brainstem Followig Gastric Loads of Various Chemical Solutions in Rats. *Brain Research*, 866,135-143.
- YAMAMOTO, T & SAWA, K. (2000b). Comparison of C-Fos- Like Immunoreactivity in the Brainstem Followig Intraoral and Intra gastric Infusions of Chemical Solutions in Rats. *Brain Research*, 866,144-151.
- YAMAMOTO, T. & FUJIMOTO, Y. (1991): Brain Mechanisms of Taste Aversion Learning in the Rat. *Brain Res. Bull.*, 27, 403-406.
- YAMAMOTO, T. (1993): Neural Mechanisms of Taste Aversion Learning. *Neurosc. Res.* 16, 181-185.
- YAMAMOTO, T., NAGAI, T., SHIMURA, T. & YASOSHIMA, Y. (1998). Roles of chemical mediators in the taste system. *Jpn. J. Pharmacol.*, 76, 325-348.
- YAMAMOTO, T., SHIMURA, T., SAKAI, N. & OZAKI, N. (1994): Representation of Hedonics and Quality of Taste Stimuli in the Parabrachial Nucleus of the Rat. *Physiol. & Beh.*, 56 (6), 1197-1202.
- YAMAMOTO, T., SHIMURA, T., SAKO, N., AZUMA, S., BAI, W. Z. & WAKISAKA, S. (1992): C-Fos Expression in the Rat Brain after Intraperitoneal Injection of Lithium Chloride. *Neuro Report* 3, 1049-1052.
- YEOMANS, J. S. & BAPTISTA, M. (1997): Both Nicotinic and Muscarinic Receptors in Ventral Tegmental Area Contribute to Brain-Stimulation Reward. *Pharmacol., Bio. & Beh.* 57 (4), 915-921.
- YEOMANS, J. S. (1982): The Cells and Axons Mediating Medial Forebrain Bundle Reward. En: Hoebel, B. G. & Novin, D. (Eds.): The Neural Basis of Feeding and Reward, Haer Institute for Electrophysiol. Research., pp. 405-418.
- YEOMANS, J. S. (1990): Principles of Brain Stimulation, OUP.
- YEOMANS, J. S., MATHUR, A. & TAMPAKERAS, M. (1993): Rewarding Brain Stimulation: Role of Tegmental Cholinergic Neurons that Activate Dopamine Neurons. *Beh. Neurosc.*, 107 (6), 1077-1087.
- YEOMANS, M. R. (2000): Rating changes over the course of meals: what do they tell us about motivation to eat?. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 24, 249-259.
- YEOMANS, M. R., JACKSON, A., LEE, M. D., NESIC, J. & DURLACH, P. J. (2000): Expression of flavour preferences conditioned by caffeine is dependent on caffeine deprivation state. *Psychopharmacology* 150, 208-215.
- YOSHIDA, A., CHEN, K., MORITANI, M., YABUTA, N. H., NAGASE, Y., TAKEMURA, M. & SHIGENAGA, Y. (1997): Organization of the Descending Projections from the Parabrachial Nucleus to the Trigeminal Sensory Nuclear Complex and Spinal Dorsal Horn in the Rat. *The J. of Comparative Neurology*, 383, 94-111.
- YOUNG, R. F., TRONNIER, V. & RINALDI, P. C. (1992): Chronic Stimulation of the Kölliker-Fuse nucleus region for relief of intractable pain in humans. *J. Neurosurg* 76, 979-985.
- YOUSFI-MALKI, M. & 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., RUEGG, H. & BODNAR, R.J. (1997). Delta and Kappa Opioid Receptor Subtypes and Ingestion: Antagonist and Glucoprivic Effects. *Pharmacol. Biochemistry and Behavior*, .56,(3), 353-361.
- YU, W.Z., SCLAFANI, A., DELAMATER, A.R. & BODNAR, R.J. (1999). Pharmacology of Flavor Preference Conditioning in Sham-Feeding Rats: Effects of Naltrexone. *Pharmacol. Biochemistry and Behavior*, .64(3), 573-584.
- YUAN, C. S. & BARBER, W. D. (1991): Parabrachial Nucleus: Neuronal Evoked Responses to Gastric Vagal and Greater Splanchnic Nerve Stimulation. *Brain Res. Bull.*, 27 (6), 797- 803.
- ZAFRA, M. A. (2000). Tesis Doctoral.
- ZEKI, S. (1995): Una Visión del Cerebro, Ariel.
- ZHANG, M. & KELLEY, A. E. (1997): Opiate agonists microinjected into the Nucleus Accumbens enhance sucrose drinking in rats. *Psychopharmacology*, 132, 350-360.
- ZHANG, M. & KELLEY, A. E. (2000): Enhanced intake of High-Fat Food following Striatal Mu-Opioid Stimulation: Microinjection mapping and Fos-expression. *Neuroscience*, 99 (2), 267-277.
- ZHANG, M., GOSNELL, B. A. & KELLEY, A. E. (1998): Intake of High-Fat Food is Selectively Enhanced by Mu Opioid Receptor Stimulation within the Nucleus Accumbens. *The J. of Pharmacol. and Exper. Therap.* 285 (2), 908-914.
- ZHANG, Z. H. & OPPENHEIMER, S. M. (2000): Baroreceptive and somatosensory convergent thalamic neurons project to the posterior insular cortex in the rat. *Brain Research* 861 (2), 241-256.
- ZIDICHOUSKY, J. A. & JHAMANDAS, J. H. (1999): Characterization of a Hyperpolarizing-Activated current in rat Lateral Parabrachial Neurons. *Neuroscience*, 89 (3), 863-871.
- ZIGMOND, M. J., BLOOM, F. E., LANDIS, S. C., ROBERTS, J. L. & SQUIRE, L. R. (1999): Fundamental Neuroscience. Academic Press.
- ZITO, K. A., VICKERS, G. & ROBERTS, D. C. S. (1985): Disruption of Cocaine and Heroin Self-Administration Following Kainic Acid Lesions of the Nucleus Accumbens. *Pharmacol. Bioch. & Beh.*, 23, 1029-1036.