

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA FUNCIONAL

SISTEMAS DOPAMINÉRGICOS EN EL TELENCEFALO  
DEL RATÓN: PAPEL EN EL PROCESAMIENTO DE  
ESTÍMULOS REFORZANTES NATURALES.

JOSÉ MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
Servei de Publicacions  
2009

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 17 de juliol de 2009 davant un tribunal format per:

- Dr. Agustín González Gallegos
- Dr. Tomás González Hernández
- Dr. Francisco Olucha Bordonau
- Dra. Patricia Robledo Montoya
- Dr. Juan Nácher Roselló

Va ser dirigida per:

Dr. Fernando Martínez García

Dr. Enrique Lanuza Navarro

©Copyright: Servei de Publicacions  
José Martínez Hernández

---

Dipòsit legal: V-946-2011

I.S.B.N.: 978-84-370-7713-0

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115

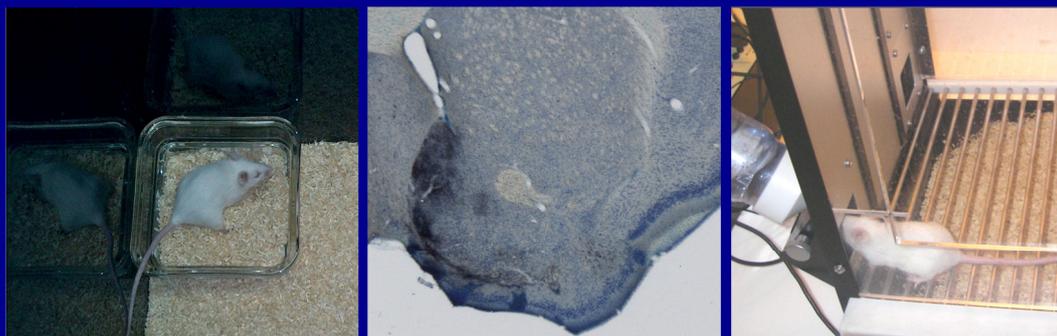
VNIVERSITAT DE VALÈNCIA



Facultat de Ciències Biològiques

Departament de Biologia Funcional  
i Antropologia Física

Departament de Biologia Cel·lular i Parasitologia



# SISTEMAS DOPAMINÉRGICOS EN EL TELENCEFALO DEL RATON: Papel en el procesamiento de estímulos reforzantes naturales

**Tesis Doctoral**  
**José Martínez Hernández**  
**València, 2009**



**SISTEMAS DOPAMINÉRGICOS EN  
EL TELENCEFALO DEL RATÓN**  
**Papel en el procesamiento de estímulos  
reforzantes naturales**

Tesis Doctoral

José Martínez Hernández

València, 2009





VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Ciències Biològiques

Departament de Biologia Funcional  
i Antropologia Física

D. Fernando Martínez García y D. Enrique Lanuza Navarro, doctores en Biología y Profesores Titulares de los Departamentos de Biología Funcional y Antropología Física y de Parasitología y Biología Celular de la Universidad de Valencia

### C E R T I F I C A N

Que D. **José Martínez Hernandez**, licenciado en Biología por la *Universitat de València*, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado *“SISTEMAS DOPAMINÉRGICOS EN EL TELENCÉFALO DEL RATÓN: Papel en el procesamiento de estímulos reforzantes naturales”* para la obtención del grado de Doctor en Biología.

Para que conste, en cumplimiento de la legislación, firmamos el presente certificado en:

Valencia a 29 de mayo de 2009

Dr. Fernando Martínez García

Dr. Enrique Lanuza Navarro

Para la realización de esta tesis, el autor ha sido beneficiario de una beca del Programa de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia.

Este trabajo se ha enmarcado dentro de los proyectos financiados por el Ministerio de Educación y Ciencia y los fondos FEDER *Neurobiología de la atracción sexual: bases neurales del refuerzo inducido por feromonas sexuales* (BFU2004-04272/BFI) y *Papel de las vías amigdalostriatales en el procesamiento del valor reforzante de las feromonas sexuales y sus componentes* (BFU2007-67912-C02-01), así como los financiados por la Junta de Comunidades Castilla-La Mancha *Vías paralelas de información vomeronasal en la amígdala: una aproximación comportamental* (PAC-05-007-2) y *La organización de los sistemas quimiosensoriales y la vía del refuerzo y la adicción* (PCC08-0064)

*A mi familia*



“Aún en las ciencias más perfectas  
nunca deja de encontrarse alguna doctrina  
exclusivamente mantenida por el principio de autoridad”

*Santiago Ramón y Cajal*

“But the reason I call myself by my childhood name is to remind myself that a scientist must also be absolutely like a child. If he sees a thing, he must say that he sees it, whether it was what he thought he was going to see or not. See first, think later, then test. But always see first. Otherwise you will only see what you were expecting. Most scientists forget that. I'll show you something to demonstrate that later. So, the other reason I call myself Wonko the Sane is so that people will think I am a fool. That allows me to say what I see when I see it. You can't possibly be a scientist if you mind people thinking that you're a fool”

*Douglas Adams*

“L'esprit est un produit de l'organisation du cerveau  
tout comme la vie est un produit de l'organisation des molécules »

*François Jacob*

“Mientras el cerebro sea un misterio,  
el universo continuará siendo un misterio”

*Santiago Ramón y Cajal*

“My brain?  
That's my second favourite organ.”

*Woody Allen*



## **AGRADECIMIENTOS**

Ha arribat el moment més personal de tota tesi, en el que has de repassar com es que s'ha aplegat a aquesta situació, i és per això que comence els agraïments en català (encara que després canviaré), perquè així és com la sentisc, encara que estiga en castellà. Han sigut moltes persones les que s'han creuat en el meu camí mentre feia aquesta tesi i d'una manera o altra han tingut un impacte sobre mi i per tant en aquest treball, i per això estic segur que algú m'oblidaré. No m'ho tingueu en compte.

Però als primers que de agrair-s'ho són a Fernando i Quique, que em permetreu començar a treballar en el vostre laboratori i amb la vostra tutela i direcció aquesta tesi ha arribat a bon port. De vosaltres dos he après principalment el que sé hui en dia de ciència i espere que el futur vos depare encara més èxits.

Encara que el laboratori era xicotet, no estava mal acompanyat. Moltes gràcies Amparo, Joana, Carme i M<sup>a</sup> José per compartir tantes estones de laboratori i especialment a Amparo que li va tocar ensenyar-me al principi. I en aquest sentit, també li he d'agrair a José, ja que part de esta tesi parteix de la seva. M'agradaria haver passat més temps amb la nova gent que ha entrat. Però el meu temps ja havia passat.

I tot això va ocórrer en el immillorable marc de la Facultat de Ciències Biològiques. Moltes gràcies als departaments de Biologia Funcional i Biologia Cel·lular, que sempre varen facilitar les coses en la mesura del que era possible i per tenir tan bons companys als dos i a la resta de la Universitat.

També he d'agrair a Juan Nàcher la oportunitat de treballar al seu laboratori quan es va acabar la meva beca. Em vaig sentir molt agust amb tot l'equip, Carlos, José Miguel i Maria, i especialment a Ramón, Esther, M<sup>a</sup> Angeles y Laura que em féreu sentir com un company més.

Además, quiero agradecersele a todos mis amigos, de diferentes ámbitos y diferentes épocas. Muchas gracias a los que estuvieron ahí, pero sobre todo a los que se mantienen. Bea, desde hace ya algunos años has venido ocupando un lugar muy importante entre mis amigos. Echo de menos nuestras carreras por el río, porque me has ayudado a mantenerme en forma, y más importante,

por las conversaciones que tuvimos. Espero que todo te vaya siempre muy bien y continuemos coincidiendo en el futuro.

Carlos y Dani, compañeros de aventuras durante años, me alegra que continuemos hablando y coincidiendo siempre que es posible, han pasado muchos años desde el instituto y cada vez se hace más complicado, con trabajos diferentes y países diferentes. Pero siempre merece la pena.

A tota la colla de "ihuionanem" amb la que he anat a tantes excursions i viatges i hem fet tant quilometres amb les nostres botes mentres discutíem de ciència o de la vida. Espere que puguem fer-ho en el futur de nou. Gràcies a Santi, Raül, Eli, Tonyo, Victor, Salut, Bárbara, Lluís, Ximo, M<sup>a</sup> Jesús, Rosa, Gabi, Ángel, Edu, Jorge i tota la resta.

Jorge, además de amigo, estuvimos compartiendo piso, al igual que con Carlos, y una lista bastante larga para poner aquí. Muchas gracias a todos por hacer la convivencia tan placentera.

A més tinc la sort de comptar amb molts amics de la època de la carrera, alguns dels quals han agarrat el mateix camí de fer una tesi en Neurociències Ximo i Aitana; i alguns en altres camps de la ciència com Mariola, Neus, Anna i Elena; i altres que han agarrat camins completament diferents com Vicent, Reme, Marta, Teto, Varis, Lupe, Dani, Carme, Carles, Ester; Felix i tota la resta que sempre és un plaer retrobar-nos.

He de agradecerles también todas las veces que nos hemos juntado en la universidad o fuera de ella, para charlar o cenar. Gracias Santi, Almú, Marta, Sara, Anna y el resto.

Gracias también a mis compañeros y compañeras de los cursos de doctorado con los que siempre era bueno juntarse a cenar, Blanca, Aitana, Ana Pérez, Ana Cervera, Cintia, Jordi, Mariana, y a los que no coincidimos en los cursos pero estaban en el laboratorio y de ahí surgió la amistad como Sara y Melissa.

Gracias a Bea he conocido mucha gente como sus compis de piso y de laboratorio, y además conocí a Isabel, Jordi, Sonia y Jesús (bueno a Jesús ya le conocía), con los que he pasado buenas cenitas y clases.

Moltes gràcies per els vespres de ciència i cervesa, Ignasi, Toni, Miguel, Frago i Use.

A més vull agrair-li la lluita que fa contra la precarietat en la Ciència a l'organització Joves Investigadors, i més en concret a la gent que vaig conèixer gràcies a l'associació com Isabel, Martina, Dani, Juanvi, Vicent, Pere, Gloria, Jordi, Virgilio, Marta, Santi, Andrés, Paco i tants altres. Además, quiero agradecerles la lucha contra la precariedad a nivel estatal la FJI, Federación de Jóvenes Investigadores, ya que en los últimos años hemos sido testigos de importantes avances, y como no a la gente que conocí en sus listas como Gloria, Tatiana, Lara, Salomón, Nacho, Oscar, Oriol, Natalia, Cecilia, Gloria y muchos más que ahora no puedo recordar.

Also, I want to thank to Dr. Satoshi Ikemoto for allowing me to go to his laboratory. And thanks to Rick Shin and his wife and Robert, for being so good lab partners and coffee drinkers. Thanks to Bob, my flat mate and Alex, lab mate, but also travel and adventures partners.

Gracias a Isabel Millán por las litografías para la portada.

Llegando casi al final, es evidente, que tengo que agradecerse a mi familia. Tengo que darles las gracias tanto a mis padres y hermano, como a mi abuela, a todos los tíos, tías, primos y primas, somos demasiados, y los que ya nos están. Papá, mamá si Fernando y Quique me educaron en ciencia vosotros, me educasteis en la vida. Muchas gracias por todo vuestro apoyo incondicional siempre, aunque no entendiésteis exactamente qué es lo que hacía. A ti, Paco, no solo te he de agradecer que seas mi hermano y tu apoyo, sino que además, tuviste que ver los videos de los ratones del capítulo 3. Muchas gracias por un trabajo que no tenias obligación de hacer. Muchas gracias ya que ha vosotros os debo la persona que soy. Todo mi amor.

Et en dernier, mais le plus spécial à Nath, pour avoir vécu la dernière partie de la thèse avec moi, mais surtout pour m'avoir accompagner dans cette dernière aventure de tous les jours. Merci. JTM



<b>ABREVIATURAS</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>13</b>
<b>1. La dopamina y la neurobiología del refuerzo</b>	<b>15</b>
Refuerzo y autoestimulación cerebral	16
Drogas adictivas y neurobiología del refuerzo	18
Dopamina y refuerzos naturales: La hipótesis de la dopamina	19
<b>2. Nuevas ideas sobre la naturaleza y neurobiología del refuerzo</b>	<b>21</b>
Dopamina y motivación inducida por refuerzo	23
Actividad de las neuronas dopaminérgicas: error, predicción del refuerzo y aprendizaje	25
<b>3. Un nuevo modelo para el estudio del refuerzo</b>	<b>26</b>
El sexo y las feromonas sexuales	27
<b>4. Objetivos y estructura</b>	<b>30</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>32</b>
<b>CAPÍTULO I:</b>	<b>41</b>
<b>Introducción</b>	<b>43</b>
Primeros estudios de caracterización de los grupos celulares aminérgicos	43
Conocimiento actual sobre la organización de los sistemas dopaminérgicos.	45
El ratón como modelo experimental para el estudio de las enfermedades derivadas de alteraciones en el sistema dopaminérgico	46
<b>Material y métodos</b>	<b>49</b>
Animales de experimentación	49
Detección inmunohistoquímica del DAT y la TH	49
Análisis de los resultados	50
<b>Resultados</b>	<b>51</b>
1. Distribución de células inmunoreactivas para TH y DAT en el mesencéfalo y prosencéfalo del ratón	54
2. Distribución de fibras inmunoreactivas para TH y DAT en los hemisferios telencefálicos del ratón	62
<b>Discusión</b>	<b>71</b>
Distribución de somas dopaminérgicos en mamíferos	71
¿Está la expresión de DAT restringida a los grupos A8-A10?	73
Significado funcional de la expresión de DAT en células dopaminérgicas	75
Patrón de inervación dopaminérgica del córtex de ratón	78
Patrón de inervación dopaminérgica de las áreas subcorticales del telencéfalo de ratón	79
Patrón de inervación dopaminérgica de la amígdala de ratón	83
Aspectos comparados	84
<b>Bibliografía</b>	<b>86</b>

<b>CAPÍTULO II:</b>	<b>103</b>
<b>Introducción</b>	<b>105</b>
<b>Material y métodos</b>	<b>109</b>
Animales de experimentación	109
Trazado neuroanatómico	109
Análisis de los resultados	110
<b>Resultados</b>	<b>112</b>
1.a. Marcaje retrógrado (Fig. 2.3A-P)	113
1.b. Marcaje anterógrado en el telencéfalo (Fig. 2.4A-I)	121
1.c. Marcaje atribuible a fibras de paso (no ilustrado)	126
2.a. Marcaje retrógrado (Fig. 2.10A-P)	127
2.b. Marcaje anterógrado en el telencéfalo (Fig. 2.10A-J)	134
3. a. Inyecciones control adyacentes al VTA	139
<b>Discusión</b>	<b>146</b>
Consideraciones metodológicas	146
Aferencias comunes al VTA del ratón: anatomía funcional de los estímulos reforzantes	148
Vías tegmento-estriatales y estriado-tegmentales: una espiral de ida y vuelta (Fig. 2.19)	156
La espiral dopaminérgica y el refuerzo: ¿una función con cada vuelta?	159
<b>Bibliografía</b>	<b>163</b>
<b>CAPITULO III:</b>	<b>175</b>
<b>Introducción</b>	<b>177</b>
<b>Material y métodos</b>	<b>179</b>
Animales y diseño experimental	179
Cirugía y cuidados post-operatorios	179
Tests de preferencia por las señales químicas derivadas de machos y comportamiento químio-investigador	180
Test de actividad locomotora	181
Test de preferencia por el sabor dulce	182
Metodología histológica	182
Tratamiento de los datos y análisis estadístico	182
Control histológico de la lesión	183
Comportamiento químio-investigador	183
Preferencia por sacarosa	184
Correlación entre el tamaño de la lesión y la preferencia comportamental por las feromonas de macho y el sabor dulce	184
<b>Resultados</b>	<b>185</b>
Evaluación histológica de las lesiones	185
Tests de preferencia por la feromona de macho	186
Test de preferencia por sacarosa	189
Correlación estadística entre el “tamaño de la lesión” y el comportamiento	190
<b>Discusión</b>	<b>192</b>
Las células dopaminérgicas del VTA no están implicadas de la misma manera en la expresión de todos los comportamientos dirigidos a una meta	192
¿Las feromonas tienen un sistema neuronal específico para señalar el refuerzo?	193
Los efectos de la lesión en la preferencia por sacarosa	195
El substrato neural de la preferencia innata por los refuerzos naturales	196

<b>Bibliografía</b>	199
<b>CAPÍTULO IV:</b>	<b>205</b>
<b>Introducción</b>	<b>207</b>
<b>Material y métodos</b>	<b>211</b>
Animales y diseño experimental	211
Cirugía y cuidados post-operatorios	211
Test de actividad locomotora	211
Test de preferencia por el sabor dulce	212
Metodología histológica	212
Tratamiento de los datos y análisis estadístico	213
Comportamiento químico-investigador	213
Preferencia por sacarosa	214
Tests de preferencia por las señales químicas derivadas de machos y comportamiento químico-investigador	215
<b>Resultados</b>	<b>216</b>
Evaluación histológica de las lesiones	216
Tests de actividad motora	216
Tests de preferencia por la feromona de macho	217
Test de preferencia por sacarosa	220
Dinámica de la preferencia por sacarosa en los tests del primer y segundo día	223
<b>Discusión</b>	<b>233</b>
La atracción innata por feromonas presenta una dinámica lineal y no requiere dopamina en el AcbShM	233
La depleción dopaminérgica del AcbShM altera la dinámica de adquisición de preferencia por sacarosa	235
Estímulos apetitivos diferentes tienen dinámicas de obtención diferentes	238
¿Cuál es la función de la dopamina en el AcbShM?	239
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>251</b>
El sistema tegmento estriatal: un caso de evolución conservadora	253
Las vías dopaminérgicas y la espiral tegmento-estriado-tegmental	256
Sexo y sabor dulce: ¿Uno o varios sistemas de refuerzo?	261
Dopamina, motivación y atención	266
¿De qué depende la hedonía?	267
<b>Bibliografía</b>	<b>271</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>283</b>



**ABREVIATURAS**

6-OHDA	6-hidroxidopamina
AA	área anterior amigdalina
AAD	división dorsal del área anterior amigdalina
AAV	división ventral del área anterior amigdalina
AADC	descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos
AADC-ir	reactivo para la descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos
ABC	complejo avidina-biotina-peroxidasa
AC	núcleo comisural anterior
<i>aca</i>	rama anterior de la comisura anterior
Acb	núcleo accumbens
AcbC	región <i>Core</i> del núcleo accumbens
AcbSh	región <i>Shell</i> del núcleo accumbens
AcbShV	área ventral de la región <i>Shell</i> del núcleo accumbens
AcbShM	área medial de la región <i>Shell</i> del núcleo accumbens
ACo	núcleo amigdalino cortical anterior
<i>Acp</i>	rama posterior de la comisura anterior
ADP	núcleo preóptico anterodorsal
AH	núcleo anterior hipotalámico
Ahi	área amigdaló-hipocámpica
AHP	división posterior del núcleo anterior hipotalámico
AI	corteza insular agranular
AID	corteza insular agranular dorsal
AIP	corteza insular agranular posterior
AIV	corteza insular agranular ventral
AO	núcleo olfativo anterior
AOB	bulbo olfativo accesorio
AOD	núcleo olfativo anterior dorsal
AOM	núcleo olfativo anterior medial
AOV	núcleo olfativo anterior ventral
Apir	transición amigdalopiriforme
Arc	núcleo arqueado del hipotálamo

## *Abreviaturas*

AStr	área de transición amigdaloestrial
AVPe	núcleo periventricular antero-ventral (
Bar	núcleo de Barrington
BDA	dextranamina biotinilada
BL	núcleo basolateral de la amígdala
BLA	núcleo basolateral anterior de la amígdala
BLP	núcleo basolateral posterior de la amígdala
BMA	núcleo basomedial anterior de la amígdala
BMP	núcleo basomedial posterior de la amígdala
BrdU	bromodesoxiuridina
BST	núcleo de la <i>stria terminalis</i>
BSTIA	porción intraamigdalina del núcleo de la <i>stria terminalis</i>
BSTLD	porción lateral dorsal del núcleo de la <i>stria terminalis</i>
BSTLJ	porción lateral yuxtacapsular del núcleo de la <i>stria terminalis</i>
BSTLP	porción lateral posterior del núcleo de la <i>stria terminalis</i>
BSTLV	porción lateral ventral del núcleo de la <i>stria terminalis</i>
BSTM	división medial del núcleo de la <i>stria terminalis</i>
BSTMA	porción medial anterior del núcleo de la <i>stria terminalis</i>
BSTMPI	porción medial posterior intermedia del núcleo de la <i>stria terminalis</i>
BSTMPL	porción medial posterior lateral del núcleo de la <i>stria terminalis</i>
BSTMPL	porción medial posterior medial del núcleo de la <i>stria terminalis</i>
BSTMV	porción medial ventral del núcleo de la <i>stria terminalis</i>
BSTS	porción supracapsular del núcleo de la <i>stria terminalis</i>
C/C	test control de preferencia con sustrato limpio en ambos recipientes
C/M	test de preferencia de sustrato utilizado por macho contra sustrato limpio
CA1	porción 1 del asta de amón del hipocampo
CA2	porción 2 del asta de amón del hipocampo
CA3	porción 3 del asta de amón del hipocampo
CB	puentes celulares del estriado ventral
cc	cuerpo caloso
Ce	núcleo central de la amígdala
CeC	división capsular del núcleo central de la amígdala
CeL	división lateral del núcleo central de la amígdala
CeLi	división lineal del núcleo central de la amígdala

CeM	división medial del núcleo central de la amígdala
Cg1	Corteza cingular primaria
Cg2	Corteza cingular secundaria
CGPn	área gris central pontina
CGRP	péptido relacionado con el gen de la calcitonina
Cl	núcleo del claustró
CLi	núcleo linear caudal del rafe
CnF	núcleo cuneiforme
<i>cp</i>	pedúnculo cerebral
CPu	<i>Caudatus Putamen</i>
CR	corticotropina
CxA	zona de transición cortico-amigdalina
D1R	receptor 1 de la dopamina
D2R	receptor 2 de la dopamina
DA	Dopamina
DAB	diaminobenzidina
DAT	transportador de dopamina
DAT-ir	inmunoreactivo para el transportador de dopamina
DB	núcleo de la banda diagonal
DBH	$\beta$ -hidroxilasa de la dopamina
Den	núcleo endopiriforme dorsal
DI	corteza insular disgranular
DLO	corteza orbital dorsolateral
DG	giro dentado del hipocampo
DLPAG	sustancia gris periacueductal dorsolateral
DMH	núcleo dorsomedial hipotalámico
DMPAG	sustancia gris periacueductal dorsomedial
DMTg	núcleo dorsomedial tegmental
DOPAC	ácido dihidroxifenilacético (metabolito de la DA)
DP	área peduncular dorsal
DpMe	núcleo profundo del mesencéfalo
DR	núcleo dorsal del Raphe
DRD	rafe dorsal dorsal
DRI	rafe dorsal interfascicular

## *Abreviaturas*

DRV	rafe dorsal ventral
DTM	núcleo tuberomamilar dorsal
DTT	<i>taenia tecta</i> dorsal
Ect	área cortical ectorrinal
En	núcleo endopiriforme
EW	núcleo de Edinger-Westphal
<i>f</i>	fornix
<i>fr</i>	fascículo retroflejo
Glu	Glutamato
GP	<i>globus pallidus</i>
HDB	núcleo horizontal de la banda diagonal
I	masas intercaladas de la amígdala
ICj	islotes de Calleja
ICjM	islote mayor de Calleja
IF	núcleo interfascicular
IL	Corteza infralímbica
IP	núcleo interpeduncular
IPAC	núcleo intersticial del fascículo posterior de la comisura anterior
IPACL	división lateral del núcleo intersticial del fascículo posterior de la comisura anterior
IPACM	división medial del núcleo intersticial del fascículo posterior de la comisura anterior
IRt	núcleo intermedio de la formación reticular
KDa	kilodalton
La	núcleo lateral de la amígdala
LA	área hipotalámica anterolateral
LaDL	división dorsolateral de la amígdala lateral
LaVL	división ventrolateral de la amígdala lateral
LaVM	división ventromedial de la amígdala lateral
LC	<i>locus coeruleus</i>
L-DOPA	3,4-dihidroxifenilalanina
LDTg	núcleo laterodorsal tegmental
LEnt	área entorrinal lateral
LGP	globo pálido lateral

LH	área hipotalámica lateral
LHb	núcleo de la habenula lateral
LL	núcleo del lemnisco lateral
<i>lo</i>	tracto olfativo lateral
LO	cortex orbitofrontal lateral
LOT	núcleo del tracto olfativo lateral
LPAG	sustancia gris periacueductal lateral
LPB	área parabraquial lateral
LPO	área hipotalámica preóptica
LS	septum lateral
LSD	división dorsal del septum lateral
LSI	división intermedia del septum lateral
LSS	banda lateral del estriado
LSV	división ventral del septum lateral
LTP	potenciación a largo plazo
LV	ventrículo lateral
M1	corteza motora primaria
M2	corteza motora secundaria
MCPO	núcleo magnocelular preóptico
ME	eminencia media
Me	amígdala medial
MeA	amígdala medial anterior
MeAD	division medial de la amígdala medial anterior
MeAV	division ventral de la amígdala medial anterior
MeP	amígdala medial posterior
<i>mfb</i>	tracto prosencefálico medial
MGP	globo pálido medial
MHb	núcleo de la habénula medial
<i>ml</i>	lemnisco medial
ML	núcleo mamilar lateral
MM	núcleo mamilar medial
MnPO	núcleo preóptico mediano
MnR	núcleo mediano del rafe
MO	corteza orbital medial

## *Abreviaturas*

MOB	bulbo olfativo principal
MPA	área preóptica medial
MPB	área parabraquial medial
MPO	núcleo preóptico medial
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
MS	septum medial
<i>mt</i>	tracto mamilotalámico
OT	tubérculo olfativo
PaAP	subdivisión anterior del núcleo paraventricular
PAG	área gris periacueductal
PaLM	núcleo paraventricular lateromedial
PaPo	núcleo paraventricular posterior
PaV	subdivisión ventral del núcleo paraventricular
PBN	núcleo parabraquial
PBS	tampón fosfato salino
PCRtA	núcleo parvocelular de la formación reticular
Pe	núcleo hipotalámico periventricular
PeF	núcleo perifornical
PF	núcleo parafascicular
PH	área posterior hipotalámica
Pir	Corteza piriforme
PLCo	núcleo cortical posterolateral de la amígdala
PMCo	núcleo cortical posteromedial de la amígdala
PMnR	núcleo paramediano del rafe
PnR	núcleo pontino del rafe
PPTg	núcleo tegmental pedunculopontino
PR	área prerrubra
PrC	núcleo precomisural
PRh	corteza perirrinal
PrL	Corteza prelímbica
PrM	Corteza premotora
PV	parvoalbumina
R	Núcleo rojo
RCh	área retroquiasmática

RDA	tetrametil rodamina
RLi	núcleo linear rostral
RRF	campo retrorrubro
RSA	corteza retrosplenial agranular
RSG	corteza retrosplenial granular
SCh	núcleo supraquiasmático
SHi	núcleo septohipocampal
SI	<i>substantia innominata</i>
SL	núcleo semilunar
SLEA	parte sublenticular de la amígdala extendida
SN	<i>substantia nigra</i>
SNC	<i>substantia nigra pars compacta</i>
SNR	<i>substantia nigra pars reticulata</i>
Spa	zona subparaventricular
SPF	núcleo subparafascicular talámico
Su3	núcleo supraoculomotor
Su5	núcleo supratrigeminal
SubI	núcleo subincerto
SuCD	núcleo subcoeruleo dorsal
SuM	núcleo supramamilar
TC	<i>tuber cinereum</i>
TH	hidroxilasa de tirosina
TH-ir	reactivo para la hidroxilasa de tirosina
VDB	porción vertical del núcleo de la banda diagonal
Ven	núcleo endopiriforme ventral
VGluT1	transportador vesicular de glutamato subtipo 1
VGluT2	transportador vesicular de glutamato subtipo 2
VLPAG	sustancia gris periacueductal ventrolateral
VMAT2	transportador vesicular de monoaminas
VMH	núcleo ventromedial hipotalámico
VMPO	núcleo ventromedial preóptico
VO	cortex orbitofrontal ventral
VP	<i>ventral pallidum</i>
VRe	núcleo reuniens ventral

## *Abreviaturas*

VTA      área ventral tegmental

ZI      *zona incerta*

## **Introducción general**



## **1. La dopamina y la neurobiología del refuerzo**

El refuerzo es un fenómeno psicológico que nos permite aprender de las experiencias y, consecuentemente, modelar nuestro comportamiento de acuerdo con sus consecuencias. Las propiedades reforzantes de un estímulo provocan que los sujetos desarrollen o repitan más asiduamente determinados comportamientos precedentes al estímulo o en respuesta a éste. Esto implica el establecimiento o potenciación de determinadas conexiones neurales en el sistema cerebral del refuerzo.

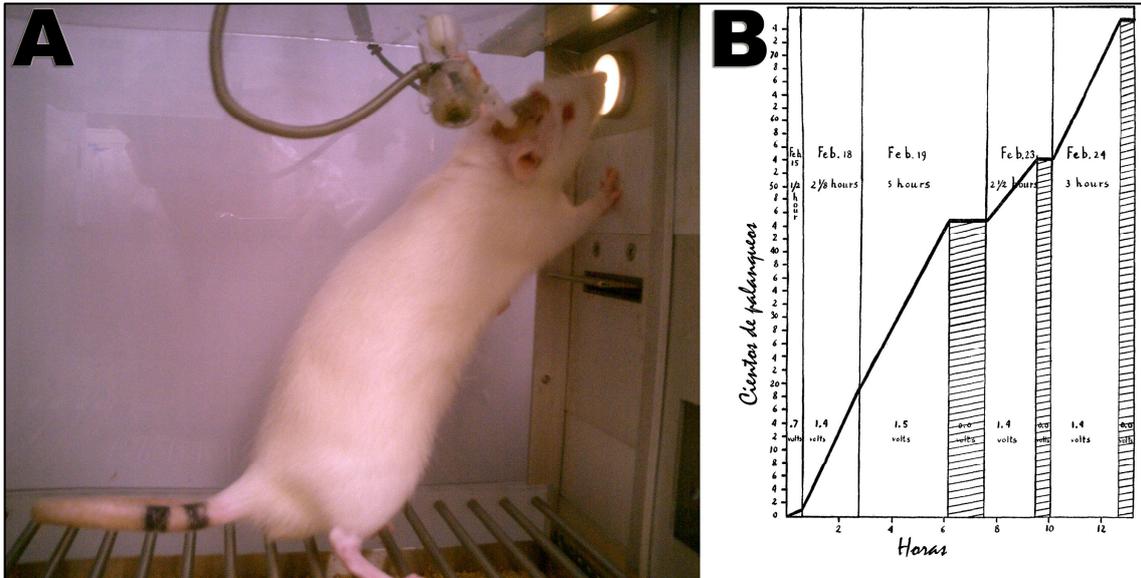
Sin embargo, el estudio del refuerzo es complicado porque, como fenómeno psicológico que es, resulta difícil de cuantificar. De hecho, el refuerzo no es una característica intrínseca de un estímulo ni, por lo tanto, se presenta necesariamente asociado a la intensidad del mismo, dado que un mismo estímulo puede ser reforzante o no dependiendo del estado del animal. Por ejemplo, para un animal hambriento el alimento es reforzante, mientras que este mismo alimento deja de serlo tras la saciedad completa, o específica de este alimento (lo que se denomina devaluación; Dwyer, 2005). Más aún, el carácter reforzante de un alimento se modifica con la experiencia, de manera que un alimento puede pasar de reforzar un comportamiento a ser aversivo tras su asociación con una indigestión (o con un malestar inducido experimentalmente, tal como se utiliza en el paradigma de condicionamiento aversivo al gusto (Samson *et al.*, 2004; Dwyer, 2005).

Muchas veces se han asociado o utilizado como sinónimos refuerzo y placer. Efectivamente, un estímulo placentero puede ser usado como premio para reforzar determinados comportamientos y por ello, entender los procesos neurales que provocan el placer constituye un reto de gran interés, que contribuiría sustancialmente a comprender la neurobiología del refuerzo. Sin embargo, como veremos, el placer (que en términos neurobiológicos suele nombrarse con el eufemismo ‘hedonia’) es sólo uno de los componentes del refuerzo. En cualquier caso, el placer también resulta difícil de medir, y por ello no parece el componente más adecuado para el estudio experimental del refuerzo. En la mayor parte de los estudios experimentales sobre refuerzo, el método empleado para identificar el valor reforzante de un estímulo es someter al animal experimental a un paradigma comportamental operante, en el que éste tenga que trabajar para obtener el estímulo supuestamente reforzante. Sin embargo, estos paradigmas implican no sólo una experiencia previa con el estímulo, sino también un aprendizaje

del comportamiento operante que posteriormente será cuantificado. Por tanto los circuitos neurales implicados en una respuesta operante de este tipo incluirán, necesariamente, no sólo aquellos que procesan el valor hedónico del estímulo, sino también aquellos implicados en la motivación para realizar la respuesta, así como los necesarios para asociar el estímulo reforzante y el comportamiento a realizar (Berridge & Robinson, 2003; Wise, 2006). Y por supuesto los circuitos motores implicados en la realización de la respuesta operante. Por tanto, para clarificar la base neural de estos diferentes componentes del refuerzo (placer, motivación, aprendizaje) resulta de mucho interés estudiar respuestas innatas a estímulos reforzantes naturales, es decir, respuestas que no impliquen aprendizaje. En este sentido, como se discutirá más adelante, hemos optado por utilizar la atracción ejercida por estos estímulos naturales reforzantes como una aproximación para el estudio del componente hedónico del refuerzo.

### **Refuerzo y autoestimulación cerebral**

El estudio de las bases neurobiológicas del refuerzo tuvo su origen histórico en los trabajos clásicos de James Olds y Peter Milner (1954), quienes llevaron a cabo los primeros experimentos de autoestimulación cerebral. Tras implantar un electrodo crónicamente en una región del encéfalo de la rata, conectaban este electrodo a un circuito que el animal podía cerrar apretando una palanca, lo que le permitía provocar la estimulación de la zona en la que tenía implantado el electrodo. Si el animal encontraba placentera la activación de esa zona del encéfalo, mostraba pautas de autoestimulación compulsiva. Usando este paradigma observaron autoestimulación en varias áreas del cerebro del animal. Entre éstas, destacaba por dar tasas de palanqueo elevadísimas el tracto prosencefálico medial (*mfb*, del inglés *medial forebrain bundle*) en el que los animales se llegaban a autoestimularse unas 4 veces por segundo durante varios minutos.



**Figura 1.1.** En A fotografía de una rata en una caja de Skinner dispuesta con una palanca para que el animal pueda autoestimularse o autoadministrarse drogas intracerebralmente. En B curva acumulada de palanqueo de una rata con un electrodo implantado en el cerebro. Modificado de Olds & Milner, 1954.

El *mfb* atraviesa en dirección antero-posterior el hipotálamo lateral (LH) y posee numerosos axones de proyección ascendentes y descendentes que interconectan estructuras del telencéfalo y del mesencéfalo, y axones cortos que conectan estructuras adyacentes. Entre los axones de proyección ascendentes, existe una diversidad de neurotransmisores dependiendo del área de origen, como la dopamina (DA), la serotonina y la noradrenalina. Pronto se observó que muchos de los sitios en los que los electrodos daban lugar a comportamientos de autoestimulación coincidían con la localización de las neuronas catecolaminérgicas (noradrenérgicas o dopaminérgicas), o de los tractos por donde discurrían o terminaban sus axones (Wise & Rompre, 1989).

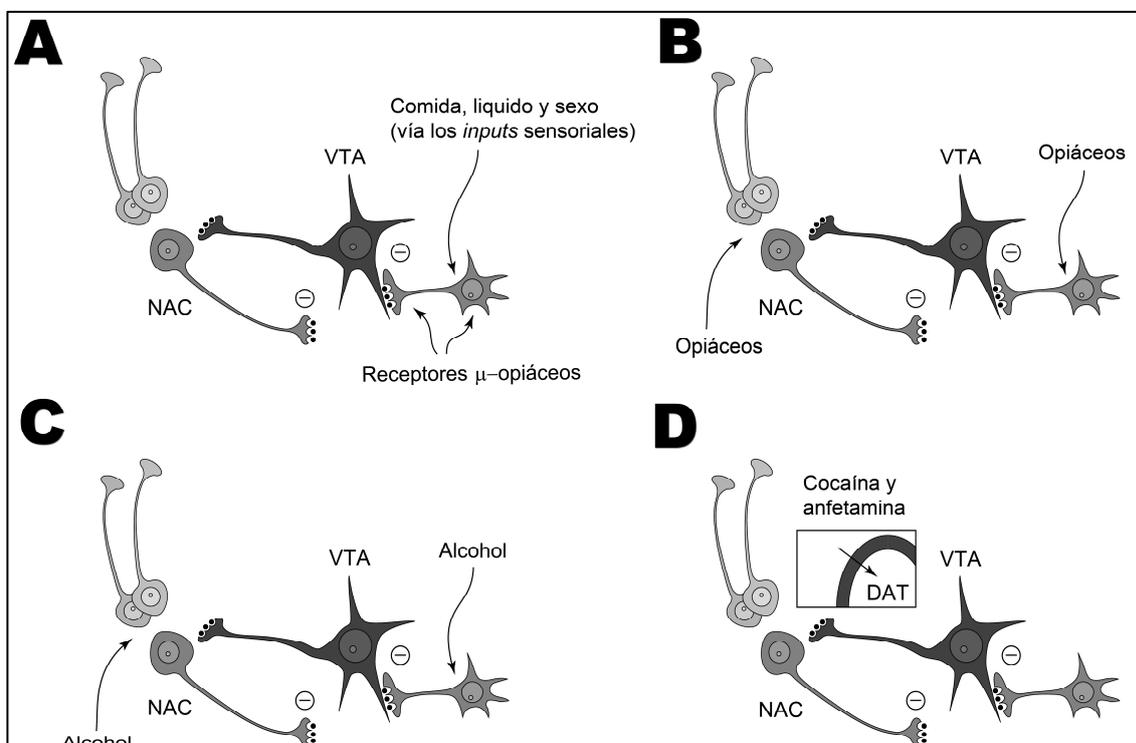
Además, la administración de amfetamina, un potente agonista de la DA, provocaba un gran incremento en la tasa a la que el animal respondía a la estimulación cerebral reforzante (Stein, 1964). Por el contrario, los antagonistas de la dopamina, como el espiroperidol, provocaban un decremento en la autoestimulación cerebral a través de electrodos implantados en el *mfb* (Phillips & Fibiger, 1978). Estos datos sugerían que la DA era el neurotransmisor clave en el proceso del refuerzo y condujeron a la idea de que el valor reforzante de la autoestimulación del *mfb* se debía a que, durante la misma, se activaban las fibras ascendentes de este tracto (Nelson et al., 1981), de naturaleza dopaminérgica, que conectan el área ventral tegmental (ventral tegmental area, VTA) con centros telencefálicos que incluían el estriado ventral o núcleo accumbens (Acb), el cortex frontal, y otras estructuras del sistema límbico (septum y

amígdala). Esta conexión tecto-telencefálica se conoce como vía mesocortico-límbica.

***Drogas adictivas y neurobiología del refuerzo***

Las drogas de abuso no sólo lo son para los seres humanos, sino que también son auto-administradas por animales experimentales (Pickens et al., 1978; Johanson & Uhlemuth, 1978; Johanson & Schuster, 1981, Markou *et al.*, 1993). La auto-administración de drogas es una muestra de las propiedades reforzantes de las mismas ya que la adicción es consecuencia, en última instancia, de las propiedades reforzantes de las drogas. Por ello el estudio de la neurobiología de la drogadicción se halla unido al de las bases del refuerzo.

En este sentido, los estudios de adicción indicaban que entre las drogas más adictivas se encuentran las drogas que son agonistas de la DA, también llamadas drogas psicoestimulantes (Snyder & Solomon, 1992). Mediante los estudios de microdiálisis intracerebral se ha observado que estas drogas psicoestimulantes, como la cocaína (Kuczenski *et al.*, 1991) y las anfetaminas (Carboni *et al.*, 1989), provocan la liberación



**Figura I.2.** Los mecanismos de acción de los refuerzos naturales y drogas sobre las neuronas dopaminérgicas mesolímbicas. En A los refuerzos naturales actúan de manera indirecta para activar las neuronas del VTA. En B y C, opiáceos y alcohol actúan de manera indirecta para aumentar la actividad neuronal y liberación de DA. En D, cocaína y anfetamina incrementan los niveles de DA inhibiendo el transportador de DA. Modificado de Spanagel & Weiss, 1999.

de DA en el estriado ventral. Curiosamente, otras drogas de abuso con propiedades farmacológicas bien diferentes, como los narcóticos (Di Chiara & Imperato, 1988), la nicotina (Imperato *et al.*, 1986), el etanol (Imperato & Di Chiara, 1986) o la fenciclidina (Carboni *et al.*, 1989), también provocan un incremento en las concentraciones extracelulares de DA en el Acb a pesar de no afectar directamente las neuronas DAérgicas.

El mecanismo por el que cada droga de abuso estimula la liberación de DA depende del grupo de drogas al que pertenezca (Fig. I.2). La cocaína y las anfetaminas en realidad son agonistas indirectos, que potencian la neurotransmisión DAérgica inhibiendo la recaptación de esta catecolamina por su transportador (*Dopamine Transporter*, DAT), prolongando así su tiempo de acción en la hendidura sináptica (Thibaut *et al.*, 1995; Spanagel & Weiss, 1999, Riddle *et al.*, 2005). Las drogas no-psicoestimulantes (narcóticos, nicotina, etanol) provocan una liberación de DA en el Acb mediante una estimulación o desinhibición de las neuronas DAérgicas del VTA (Matthews & German, 1984; Gessa *et al.*, 1985; Mereu *et al.*, 1987, Spanagel & Weiss, 1999), o mediante su acción directa localmente en el propio núcleo accumbens.

#### ***Dopamina y refuerzos naturales: La hipótesis de la dopamina***

Los estudios de microdiálisis demostraron que, como las drogas adictivas, los estímulos naturales reforzantes como la comida, el sabor dulce o el sexo provocaban la liberación de DA en el Acb (Fibiger *et al.*, 1992; Westerink *et al.*, 1994; Pfaus, 1999; Becker *et al.*, 2001; Hajnal *et al.*, 2004; Kelley, 2004).

Además, las drogas agonistas de dopamina incrementan el valor recompensante de los estímulos reforzantes naturales ya que los animales tratados con estas drogas realizan comportamientos operantes más complejos o de mayor esfuerzo (una mayor tasa de palanqueo) que los animales control para conseguir la misma recompensa, mientras que los antagonistas de DA tienen el efecto contrario (Fouriezos & Wise, 1976; Wise, 2004). Por su parte, la microinfusión de antagonistas de opioides en la VTA impide la liberación de DA en el Acb inducida por comida (Tanda & DiChiara, 1998) indicando que la comida utiliza este neurotransmisor para activar las neuronas DAérgicas del VTA (Fig. I.2), probablemente a través de interneuronas opioidérgicas tegmentales.

La ingesta de alimentos y líquidos es un proceso importante para el control de las condiciones fisiológicas de los animales. En este contexto, la ingesta de alimentos con sabor dulce intenso es altamente reforzante, lo que refleja que los alimentos muy dulces tienen un elevado contenido en azúcares y, por lo tanto, constituyen una fuente rápida de energía. Por ello el uso de sacarosa como estímulo reforzante es habitual en paradigmas comportamentales de laboratorio para el estudio del refuerzo (Hull, 1943; Phillips *et al.*, 1991; Wedzony *et al.*, 2003), en los que se observa una relación clara entre el valor reforzante de la solución dulce y la concentración de sacarosa en la misma (Bradshaw *et al.*, 1981; Heyman & Monaghan, 1994).

En este sentido, se ha observado que la ingestión o consumo de ciertas comidas apetitosas incrementa la expresión de *c-fos* no sólo en el sistema gustativo (como era de esperar) sino también en diversas áreas del sistema límbico y en la vía tegmento-estriatal (Park & Carr, 1998). Igualmente, los estudios de microdiálisis indican un incremento notable de los niveles de DA en el Acb tras lamer una solución azucarada, altamente preferida, frente a los que se observan en el mismo núcleo tras beber agua (Hajnal & Norgren, 2001, Hajnal *et al.*, 2004). Además, se observó que la administración mediante microdiálisis inversa de una solución de nomifensina (un agente bloqueante de la recaptación de DA) en el Acb induce un aumento en el consumo de sacarosa (Hajnal & Norgren, 2001). Por último, la ingesta preferente de soluciones de azúcar parece ser dependiente de DA, ya que la lesión de las neuronas DAérgicas del VTA (Shimura, 2002) reduce el sobreconsumo (consumo preferente) de sacarosa frente a agua.

Este tipo de evidencias llevaron a Wise y Rompré (1989), a proponer la llamada hipótesis de la dopamina del refuerzo o de la hedonia. Esta hipótesis se basaba en la idea de que los estímulos reforzantes provocan sensaciones de placer a las que se atribuían sus profundos efectos sobre el comportamiento. El valor hedónico de los estímulos reforzantes se debería, en última instancia, a que desencadenan o potencian la liberación de DA en las sinapsis del Acb.

## **2. Nuevas ideas sobre la naturaleza y neurobiología del refuerzo**

En los últimos 15 años, esta hipótesis de la DA del refuerzo ha sido muy cuestionada desde numerosos puntos de vista. Por un lado, pronto se demostró que las drogas psicoestimulantes (la cocaína o las anfetaminas), a pesar de ser muy adictivas y de actuar directamente como agonistas de DA no producen una sensación de placer o hedonia, sino que suelen dar una sensación de euforia (Volkow *et al.*, 1997). Así pues, no estaba clara la relación entre hedonia y refuerzo, aunque se sigue manteniendo la idea de que la inducción de sensaciones subjetivas de euforia o hedonia constituye un atributo específico de los estímulos reforzantes naturales y de las drogas adictivas.

Por otra parte, las investigaciones sobre el posible papel de la DA en estos efectos subjetivos (euforia o placer) en humanos también ponen en cuestión la hipótesis de la dopamina. Los estudios de imágenes cerebrales muestran que la euforia producida por estimulantes está ligeramente correlacionada con el grado de liberación de DA inducido por la droga (Laruelle *et al.*, 1995; Volkow *et al.*, 1999; Drevets *et al.*, 2001). Sin embargo, las personas adictas dejan de inyectarse el placebo, mientras que continúan inyectándose dosis bajas de cocaína que el sujeto encuentra subjetivamente indistinguibles del placebo (Martinez *et al.*, 2004) por lo que parece que el refuerzo se produce de manera subliminal, sin que el adicto experimente sensaciones subjetivas de placer o euforia. Además, en estudios con diversas drogas de abuso se ha observado que es posible separar el refuerzo del placer. Así, a lo largo de sesiones de autoadministración de drogas adictivas se observa un rápido efecto de tolerancia (pérdida de efecto con la misma dosis) en la sensación de placer subjetivo que experimenta el sujeto, tanto con cocaína (Foltin & Fischman, 1991), como con morfina (Lamb *et al.*, 1991) o nicotina (Russell, 1989). Sin embargo, aunque el placer disminuye durante la sesión la tasa de auto-administración de las drogas no desciende (Johanson & Uhlhuth, 1978).

El estudio de la hedonia o euforia inducidos por estímulos reforzantes o drogas en animales experimentales es una tarea difícil. Con el objetivo de analizar experimentalmente el valor hedónico de un estímulo independientemente de los factores motivación y aprendizaje, algunos autores han analizado las respuestas instintivas (innatas) a estímulos reforzantes naturales, con el fin de poder cuantificar supuestos “estados de ánimo” asociados, lo que se suele denominar respuestas afectivas. Por ejemplo, se ha observado que los roedores muestran un patrón estereotipado de

expresiones faciales cuando se les administra una solución dulce o amarga en la boca, y que estas expresiones son similares a las expresiones de los bebés humanos y de otros primates frente a las mismas soluciones sápidas (Grill & Norgren, 1978; Berridge, 1996, 2000). De hecho, un observador avezado podía identificar la solución sávida que se introducía en la boca del animal (o del bebe) con sólo observar sus expresiones faciales. Por ello, Berridge y colaboradores usaron estas expresiones faciales como indicadores de la hedonia inducida por estas soluciones, y observaron que ni las lesiones de las vías DAérgicas meso-cortico-límbicas (Berridge *et al.*, 1989) ni las drogas neurolépticas (antagonistas de la DA, Peciña *et al.*, 1997) alteraban las reacciones orofaciales asociadas al sabor de la sacarosa. Estos hallazgos llevaron a los autores a sugerir que el valor hedónico del sabor dulce es independiente de la DA, dando así la puntilla definitiva a la hipótesis dopaminérgica de la hedonia. Sin embargo, hay quien cuestiona esta interpretación de los resultados. Por ejemplo, también se observan movimientos orofaciales normales frente a la sacarosa en ratas descerebradas (Grill & Norgren, 1978) y bebés anencefálicos (Steiner, 1973), lo que indica que estos movimientos faciales están más relacionados con patrones de acción fijos y estereotipados (Berridge *et al.*, 1984) que con los mecanismos telencefálicos del refuerzo.

No obstante, la idea de que la DA no es un agente causal en la hedonia y, en general, en el refuerzo del sabor dulce, también se sustenta en el hecho de que animales modificados genéticamente para alterar sus sistemas DAérgicos mantienen una preferencia clara por una solución azucarada frente a agua. Cannon y Palmiter (2003) estudiaron una cepa de ratón con una delección génica para la tirosina hidroxilasa, con lo que sus niveles de DA eran casi nulos (menores del 1% respecto de la cepa salvaje), y observaron una preferencia del sabor dulce frente al agua similar a los animales de la cepa salvaje. Sin embargo, esta cepa de ratones modificados genéticamente necesitaba unos cuidados especiales ya que eran casi completamente afágicos y acinéuticos, por lo que se les suministraba cafeína para mantenerlos en niveles de actividad aceptables. Aun así, y a pesar de mantener la preferencia por el sabor dulce, estos mutantes presentaban alteraciones en la microestructura del patrón comportamental de ingesta de líquidos (períodos de ingesta continuada de mayor duración, mayor número de lametones por período de ingesta continuada, pero menor número total de lametones o períodos de ingesta continuada) que los autores atribuían a deficiencias motoras de ejecución, o motivacionales.

Además, el estudio de las reacciones orofaciales de ratones transgénicos hiperdopaminérgicos (tan solo poseían un 10% del DAT, lo que provocaba un aumento de un 70 % en los niveles basales de DA) indica que éstas son normales (Peciña *et al.*, 2003). Estos animales no mostraban aumentadas sus reacciones hedónicas innatas antes de la sacarosa, aunque como veremos después, sí que mostraban alteraciones en otros procesos.

Por otra parte, los resultados de la aplicación de fármacos DAérgicos son consistentes con los de los animales transgénicos mencionados arriba. Así, las infusiones intra-accumbens de antagonistas D1 y D2 que dificultan la locomoción, no alteraban la ingesta de comida ni la latencia por alimentarse (Baldo *et al.*, 2002), aunque alteraba la estructura de la ingesta (se alimentaba menos veces pero de mayor duración, con lo que consumía la misma cantidad total de comida). Esto sugiere que la DA no tiene un efecto en el valor reforzante de la comida, si no en parte del procesado del refuerzo.

### **Dopamina y motivación inducida por refuerzo**

Para explicar la discrepancia entre los efectos de las alteraciones de los sistemas DAérgicos sobre la hedonia de los estímulos reforzantes y sobre el aprendizaje instrumental inducido por éstos, Berridge (1996, 2000, 2007) propone que el refuerzo no es un proceso único, si no que se puede dividir en varias fases que se pueden estudiar de manera independiente (Berridge, 2007) y serían afectadas en diferente grado por distintas intervenciones experimentales. Por una parte, los estímulos recompensantes producen hedonia (en inglés *liking*), y por otra parte inducen una activación motivacional que hacen que el animal desee procurarse el estímulo (en inglés *wanting*). De manera que para Berridge, el *liking* (la hedonia) es independiente de DA, mientras que el *wanting* o la motivación para conseguir el estímulo y realizar el paradigma operante necesario sería dependiente de la DA.

Que la DA tiene un papel importante en el refuerzo queda claro por el efecto devastador de las lesiones grandes de los grupos tegmentales DAérgicos en los comportamientos apetitivos. Así, los animales lesionados muestran con frecuencia adipsia y afagia severas (Ungersted, 1971; Sakai & Gash, 1994) que los conducen a la muerte por deshidratación e inanición si no se les dan cuidados intensivos. Aunque algunos autores atribuyen estos efectos a lesiones de fibras ascendentes que cruzan el

tegmento hacia el prosencéfalo (Nadaud *et al.*, 1984), cuando las lesiones son específicas de células dopaminérgicas y respetan las fibras de paso, el efecto es igualmente devastador (Shimura *et al.*, 2002; resultados propios).

No obstante, la función de la DA como responsable del refuerzo en las fases primarias (hedonia) no es refrendada por el análisis del comportamiento de animales alterados genéticamente. Así, tanto los animales hiperdopaminérgicos (Knock-down para el transportador de dopamina, DAT; Pecina *et al.*, 2003) cómo los que carecen de DA (Knock-out para la hidroxilasa de tirosina; Cannon & Palmiter, 2003; Cannon & Bseikri, 2004) continúan mostrando preferencia por el consumo de estímulos reforzantes, si bien muestran alteraciones de este consumo.

Los animales KO para el DAT (Pecina *et al.*, 2003) poseen una mayor concentración de DA extracelular al no poder recaptar la DA. Estos animales mostraban las mismas reacciones hedónicas frente a la infusión intraoral de sacarosa que la cepa salvaje, lo que indicaba que el impacto hedónico del sabor dulce de la sacarosa no se hallaba alterado. Sin embargo, cuando se situaban en un pasillo donde al final obtenían comida, los ratones KO para el DAT recorrían el pasillo más rápido y con menos titubeos, y consumían una cantidad de comida mayor que la cepa salvaje. Así pues, el incremento de DA no se traduce en un mayor impacto hedónico de la comida, si que no posiblemente produce una mayor motivación por obtenerla.

Apoyando esta hipótesis, los trabajos de Salamone y colaboradores (Salamone 1992, 1994; Salamone *et al.*, 1997, 2003; Salamone & Correa, 2002) aportan más evidencias en contra de que la DA sea responsable de las propiedades hedónicas de la comida. Estos autores diseñaron experimentos en los que las ratas tenían que elegir entre realizar una respuesta operante o una de aproximación directa para obtener comida, obteniendo o bien un alimento más apetitoso o bien una mayor cantidad de comida si realizaban el comportamiento operante. Observaron que tras la administración sistémica de antagonistas de la DA las ratas aumentaban el consumo de comida por aproximación directa y disminuían la respuesta operante para obtener la comida. Así pues, parece que el bloqueo de los receptores de la DA provoca que los animales centren su elección en aquellos comportamientos que conlleven menor esfuerzo, aun cuando conlleven menos refuerzo. Según los autores, esto indica que la disminución de la neurotransmisión DAérgica no impide al animal identificar el valor reforzante de la comida, pero le provoca una pérdida de motivación por conseguir una mayor cantidad de comida o una comida más apetitosa.

### **Actividad de las neuronas dopaminérgicas: error, predicción del refuerzo y aprendizaje**

Otra manera de abordar el estudio del refuerzo y el papel de la DA en el mismo es estudiar la respuesta de las neuronas DAérgicas a la detección de estímulos reforzantes. En este sentido, los estudios fisiológicos (Cooper, 2006; Lapish *et al.*, 2007) indican que la actividad de las neuronas del VTA y, por tanto, la liberación de DA en el Acb, se produce de dos maneras. Por un lado, las neuronas tegmentales DAérgicas muestran una actividad tónica basal, que se traduce en una liberación de DA de manera tónica y regular. Además, al ser estimuladas, las células DAérgicas pasan a un modo de actividad fásica consistente en trenes de potenciales de acción que desencadenan la liberación de grandes cantidades de DA en el estriado. Aparentemente, es la actividad fásica de las neuronas tegmentales la relacionada con el refuerzo. Aun así, esta actividad no sólo es inducida por estímulos reforzantes, sino que también parece ser desencadenada por cualquier estímulo inesperado, sea reforzante o aversivo (Schultz, 2001). Sin embargo, otros autores han observado que algunas neuronas DAérgicas se inhiben ante un estímulo aversivo, y para estos autores las neuronas registradas por Schultz que aumentan su tasa de respuesta por un estímulo aversivo deben ser interneuronas inhibitorias (Ungless *et al.*, 2004).

En cualquier caso, el tipo de respuesta de las neuronas tegmentales DAérgicas a los estímulos reforzantes es muy peculiar. Schultz (1998) expuso a macacos a un estímulo predictor (un tono, una luz) que era seguido sistemáticamente por un refuerzo (zumo de frutas), mientras registraba la actividad eléctrica de sus neuronas DAérgicas tegmentales. En un principio las neuronas se activan cuando el animal recibía el estímulo reforzante. Pero, a medida que el animal adquiría experiencia en el paradigma experimental, y el zumo era asociado con el estímulo predictor, las neuronas del VTA dejaban de aumentar su actividad ante el zumo, y pasaban a hacerlo en respuesta a los estímulos que lo precedían. Esto sugería a Schultz que las neuronas tegmentales codifican la predicción del refuerzo por estímulos que lo preceden.

Sin embargo si, tras el entrenamiento, en una ocasión el estímulo predictor no iba seguido del estímulo reforzante (el zumo), la actividad de las neuronas DAérgicas sufría una marcada inhibición en el momento en que el refuerzo era esperado. Por el contrario, si el refuerzo era superior al esperado (mayor cantidad o concentración del zumo) las neuronas DAérgicas volvían a responder al mismo. Schultz interpreta estos resultados

como demostrativos de que las neuronas DAérgicas estarían relacionadas con la predicción del refuerzo y la detección de errores en esta predicción.

### **3. Un nuevo modelo para el estudio del refuerzo**

Como hemos expuesto, la mayor parte de los estudios relativos a los procesos de refuerzo y a los mecanismos neuroanatómicos y neuroquímicos subyacentes (como el papel de la dopamina) se han llevado a cabo utilizando drogas adictivas o estímulos reforzantes naturales relacionados con la ingesta, como la alimentación o el sabor dulce, y generalmente se han utilizado paradigmas comportamentales de condicionamiento operante. Esto nos hace preguntarnos si estos resultados son generalizables a todos los procesos de refuerzo.

En este sentido, podríamos clasificar los estímulos reforzantes en dos grandes grupos: aquellos relacionados con el mantenimiento de la homeostasis (estímulos relacionados con la ingesta de sólidos o líquidos o con la temperatura de confort) y los relacionados con la reproducción, como los estímulos que median interacciones sexuales o parento-filiales. Esto nos plantea la cuestión de si ambos tipos de refuerzo utilizan los mismos mecanismos neurobiológicos. Esta pregunta no tiene fácil respuesta dado que no son numerosos los estudios acerca de las bases neurobiológicas del refuerzo del sexo (ni de las interacciones parento-filiales).

Para estudiar experimentalmente el refuerzo asociado al sexo es necesario un estímulo sexual que desencadene una respuesta apetitiva innata (no aprendida) y que sea fácil de administrar sin que el animal tenga que aprender a ejecutar una respuesta motora. De esta manera eliminamos la posible influencia del aprendizaje y disminuimos el papel de la motivación y de la ejecución de una respuesta motora compleja. Un congénere del otro sexo en las condiciones hormonales adecuadas es, seguramente, un objeto sexual atractivo, pero constituye en realidad una pléyade de estímulos (químicos, auditivos, somatosensoriales, visuales) difíciles de administrar controladamente. Por ello decidimos estudiar un estímulo químico que resulta sexualmente atractivo de manera innata (Moncho-Bogani et al., 2002), como son las feromonas sexuales, utilizando un paradigma comportamental sencillo basado en el comportamiento exploratorio de los ratones.

### **El sexo y las feromonas sexuales**

El valor reforzante del sexo deriva evidentemente de que el objetivo de la vida es autopropetarse. El comportamiento sexual es parte fundamental de la reproducción de los individuos, y por ello puede ser desencadenado por de manera innata por diversos estímulos sensoriales, resultando en respuestas comportamentales incondicionadas estereotipadas.

Aunque el acto sexual sea el objetivo último de los comportamientos sexuales, el proceso se puede dividir en dos fases (Hull *et al.*, 2002; Blaustein & Erskine, 2002). La fase consumatoria, cuando se realiza la copula, y la fase de apetencia, previa a la fase consumatoria, que abarca desde la detección búsqueda y localización de una pareja sexual hasta los juegos pre-copulatorios.

En la fase de apetencia muchas especies utilizan estímulos visuales para llamar la atención de los congéneres del sexo contrario, lo que ha potenciado el desarrollo evolutivo de caracteres sexuales secundarios y su crecimiento mediante fenómenos de selección sexual (Darwin, 1859; 1871). Son estos fenómenos los que explican el vistoso plumaje de los pavos reales o las aves del paraíso.

Sin embargo los roedores no utilizan estímulos visuales ni muestran dimorfismo sexual evidente. La razón es que en roedores, el comportamiento social y sexual depende fundamentalmente de estímulos químicos. Las primeras descripciones de sustancias químicas secretadas por animales que desencadenaban respuestas estereotipadas en sus congéneres se realizaron en insectos. Basándose en estos estudios, Karlson & Luscher (1959) acuñaron el término feromona para describir estos mensajeros químicos intra-específicos (Karlson & Butenandt, 1959). Según su definición “las feromonas son sustancias que son segregadas al exterior de un individuo y recibidas por un segundo individuo de la misma especie, en el que desencadenan una reacción específica, como por ejemplo, un comportamiento concreto o el inicio de un proceso del desarrollo”. Pocos años después se observó que en mamíferos también existían respuestas neuroendocrinas desencadenadas por sustancias de tipo feromonal (Bruce, 1960; Dominic, 1965, 1966; Bronson & Whitten, 1968), si bien la identidad química de las mismas quedó por determinar y aun hoy en día no se han identificado con seguridad (Doty, 2003).

Además de respuestas neuroendocrinas, las feromonas también median respuestas comportamentales en los roedores. Así, Stowers *et al.* (2002) demostraron que el reconocimiento intraespecífico en ratones depende de moléculas presentes en la orina de

los ratones que aportan información sobre el estado del animal. Cuando en una jaula donde había un ratón macho se introducía un macho castrado, el primer macho ofrecía un comportamiento de exploración hacia al segundo, pero poco después pasaba a ignorarlo. Por el contrario, si antes de introducir en la jaula al macho castrado éste era impregnado con la orina de un macho intacto, el macho residente empezaba a atacarlo desde su entrada en la jaula. Así pues, la orina de macho desencadena en sus congéneres un comportamiento agresivo.

En este contexto, nuestro grupo se propuso comprobar si la atracción intersexual en ratones era desencadenada por feromonas. Utilizando hembras que habían sido criadas en ausencia de machos o de sus señales químicas en la habitación, a las que denominaremos *químicamente vírgenes*, se observó que disponiéndolas en un caja dividida en dos compartimentos comunicados por una puerta, las hembras pasaban mayor tiempo en el compartimiento donde había substrato utilizado por machos que en el que había substrato utilizado por hembras (Moncho-Bogani *et al.*, 2002). Esto sugiere que hay alguna sustancia en el substrato utilizado por machos que resulta innatamente atractiva para las hembras de ratón y que constituiría, por tanto, una feromona sexual. Esta respuesta comportamental tan solo ocurría si los animales tenían acceso directo, con contacto, al substrato (Moncho-Bogani *et al.*, 2002; 2005; Martínez-Ricós *et al.*, 2007). Si, por el contrario, se insertaba una plataforma agujereada que impedía el contacto con la viruta ensuciada, pero permitía a los animales oler los volátiles que emanaban de la misma, las hembras no preferían ninguno de los compartimentos, pasando alrededor del 50% del tiempo de test en cada uno. Por lo tanto, la feromona sexual masculina atractiva para las hembras es un compuesto no volátil (o con algún componente no volátil crítico), mientras que los olores (volátiles) del sustrato no son innatamente atractivos para las hembras. Sin embargo, si las hembras no eran químicamente vírgenes, sino que se les había dado experiencia reiterada con substrato ensuciado por machos, preferían los olores de macho (volátiles) a los de hembra o macho castrado (Moncho-Bogani *et al.*, 2002; Martínez-Ricós *et al.*, 2008). Esto sugiere que la experiencia con sustrato de macho promovía un aprendizaje mediante el cual el valor atractivo de las feromonas sexuales se trasladaba a los olores asociados a ellas.

La atracción por las feromonas sexuales no depende del estado hormonal de la hembra, ya que se da por igual en hembras ovariectomizadas sin tratamiento y tratadas con diferentes esteroides sexuales (estradiol, progesterona o ambos; Moncho-Bogani *et al.*, 2004).

Todos estos datos sugerían que las feromonas sexuales masculinas eran reforzantes para las hembras. Teniendo en cuenta que se trata de moléculas no volátiles que, por lo tanto, no son detectadas hasta que el animal contacta con la fuente de las mismas, la única posible explicación para la aparente atracción que ejercen estas moléculas sobre las hembras es que sean reforzantes. Por ello, Martínez-Ricos *et al.* (2007) intentaron demostrar esta posibilidad comprobando si las feromonas masculinas eran capaces de inducir preferencia condicionada por un lugar en el que eran presentadas sistemáticamente, es decir producir una preferencia condicionada de lugar, un paradigma muy utilizado en el estudio de las propiedades reforzantes de estímulos naturales o artificiales (Crowder y Hutto, 1992). Los resultados de este estudio demostraron inequívocamente que la preferencia de las hembras por el sustrato ensuciado por machos es un reflejo de las propiedades reforzantes de las feromonas que este sustrato contiene. Así pues, las feromonas sexuales constituyen un nuevo reforzante natural que puede ser muy útil para el estudio del refuerzo, ya que se trata de un reforzante natural asociado al sexo y no a la homeostasis del animal.

La mayor parte de los vertebrados, incluyendo los roedores, poseen dos órganos nasales capaces de detectar señales químicas del exterior, el epitelio olfativo y el órgano vomeronasal (VNO; Halpern & Martínez-Marcos, 2003). El VNO está situado en una cavidad del hueso vómer, entre la cavidad craneal y la nasal, y presenta un epitelio pseudoestratificado de neuronas sensoriales que expresan un tipo específico de receptores diferentes de los olfativos (los receptores vomeronasales; Dulac & Axel, 1998; Belluscio *et al.*, 1999). Los axones de las neuronas vomeronasales proyectan al bulbo olfativo accesorio, cuyas neuronas mitrales originan una vía vomeronasal secundaria que acaba en diversos centros de la amígdala (que constituyen por ello la amígdala vomeronasal) (Scalia & Winans, 1975).

El carácter no volátil de las feromonas sexuales masculinas reforzantes sugiere que éstas no son detectadas por el epitelio olfativo sino por el VNO (Wysocki *et al.*, 1980). Este extremo ha sido demostrado recientemente por Martínez-Ricós *et al.* (2008) al observar que las lesiones del bulbo olfativo accesorio en hembras de ratón químicamente vírgenes elimina su preferencia por viruta ensuciada por machos.

Así pues, las feromonas sexuales constituyen un estímulo químico relacionado con el sexo, reforzante para las hembras de ratón de manera innata y detectado por el órgano vomeronasal. Estas características hacen de las feromonas sexuales un estímulo ideal

para contrastar las actuales hipótesis del refuerzo y comprobar si son generalizables o sólo aplicables a los reforzantes homeostáticos.

#### **4. Objetivos y estructura**

Por tanto, nos planteamos como objetivos de esta tesis la comparación del papel que juega la DA en el refuerzo inducido por dos estímulos naturales diferentes. Por un lado un reforzante ampliamente utilizado en estudios previos, como es la sacarosa. Por otro, un estímulo natural hasta ahora escasamente utilizado en neurobiología del comportamiento, las feromonas sexuales.

Para nuestros estudios hemos decidido usar como especie experimental el ratón. De hecho los ratones son cada vez más empleados como sujetos experimentales para el análisis de las bases cerebrales del comportamiento, fundamentalmente por la sencillez de su mantenimiento y cría y porque se ha convertido en un modelo para la modificación genética (transgénesis), especialmente desde que se secuenció su genoma (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002). Por estas razones, nuestro grupo viene usando el ratón de la cepa CD1 como modelo experimental para el estudio del refuerzo inducido por feromonas sexuales y su sustrato neurobiológico, y tiene sentido continuar nuestros estudios con este animal en el que el nuevo modelo de refuerzo está mejor caracterizado.

En cualquier caso, la comprensión del papel de las vías DAérgicas en el refuerzo pasa por un conocimiento detallado de la organización de estas vías y de sus conexiones aferentes. Sin embargo, los estudios anatómicos a este respecto se restringen a dos trabajos en ratas (Phillipson, 1979; Geisler & Zahm, 2005). Por ello, los dos primeros capítulos de esta tesis constituyen estudios anatómicos detallados de los sistemas DAérgicos del ratón. En el Capítulo I realizamos una descripción de la distribución de las células y fibras dopaminérgicas en el encéfalo del ratón marcadas mediante la detección inmunohistoquímica de dos enzimas asociados a la dopamina, la hidroxilasa de tirosina (TH) y el transportador de dopamina (DAT), puesto que los datos publicados a este respecto son notablemente incompletos (véase la Introducción del Capítulo I). En el **Capítulo II** estudiamos las conexiones de la VTA mediante inyecciones de trazadores neuroanatómicos en el tegmento y en algunos de sus núcleos aferentes y eferentes. Estos capítulos nos han permitido identificar y caracterizar en el ratón la espiral tegmento-estriado-tegmental que describieron por primera vez en monos Haber

et al (2000), y postular hipótesis acerca del papel de los distintos componentes de la misma en el refuerzo.

Los siguientes capítulos están dedicados a estudiar el efecto de alteraciones experimentales de la vía tegmento-estriatal, mediante lesiones específicas DAérgicas, sobre comportamientos apetitivos relacionados con la obtención de una solución azucarada y de feromonas sexuales. En el **Capítulo III** analizamos el efecto de lesiones subtotales de las neuronas DAérgicas de la VTA sobre el consumo preferente de sacarosa (frente a agua) a largo plazo y sobre la exploración preferente de viruta ensuciada por macho en *tests* en que se enfrenta este estímulo con viruta limpia.

Por último, en el **Capítulo IV** estudiamos el efecto de la denervación DAérgica de un centro clave de la espiral tegmento-estriado-tegmental, el cortex medial, *shell* medial en la terminología anglosajona, del núcleo accumbens, en la dinámica de la adquisición de los dos estímulos reforzantes mencionados durante los primeros minutos en animales sin ninguna experiencia previa con los mismos. Los resultados de estos experimentos nos permiten entender mejor los importantes fenómenos de aprendizaje que ocurren en esta primera experiencia y su modulación por la dopamina.

Globalmente, nuestros resultados sugieren que los distintos estímulos reforzantes poseen sustratos anatómicos y neuroquímicos en los que la dopamina juega un papel claramente diferente. En cualquier caso, nuestros resultados apoyan los datos acumulados en los últimos años en el sentido de que la activación de la vía DAérgica tegmento-estriatal no es el fenómeno causal de la hedonia de los estímulos reforzantes, sea cual sea su naturaleza y el sistema sensorial que los detecte.

## **Bibliografía**

- Baldo, B. A., Sadeghian, K., Basso, A.M. & Kelley, A.E. (2002) Effects of selective dopamine D1 or D2 receptor blockade within nucleus accumbens subregions on ingestive behavior and associated motor activity. *Behav. Brain Res.*, 137, 165-177.
- Becker, J. B., Rudick, C.N. & Jenkins, W.J. (2001) The role of dopamine in the nucleus accumbens and striatum during sexual behavior in the female rat. *J. Neurosci.*, 21, 3236-3241.
- Belluscio, L., Koentges, G., Axel, R. & Dulac, C. (1999) A map of pheromone receptor activation in the mammalian brain. *Cell*, 97, 209-220.
- Berridge, K. C., Venier, I.L. & Robinson, T.E. (1989) Taste reactivity analysis of 6-hydroxydopamine-induced aphagia: Implications for arousal and anhedonia hypotheses of dopamine function. *Behav. Neurosci.*, 103, 36-45.
- Berridge, K. C. (1996) Food reward: Brain substrates of wanting and liking. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 20, 1-25.
- Berridge, K. C. (2000) Measuring hedonic impact in animals and infants: Microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 24, 173-198.
- Berridge, K. C. & Robinson, T.E. (2003) Parsing reward. *Trends Neurosci.*, 26, 507-513.
- Berridge, K. C. (2007) The debate over dopamine's role in reward: The case for incentive salience. *Psychopharmacology (Berl)*, 191, 391-431.
- Blaustein, J. D. & Erskine, M. S. (2002) Feminine sexual behavior: Cellular integration of hormonal and afferent information in the rodent brain. In Pfaff, D. W., Arnold, A. P., Etgen, A. M., Fahrbach, S. E. & Rubin, R. T. (eds), *Hormones Brain and Behavior*. Academic Press, San Diego, pp. 139-214.
- Bradshaw, C. M., Ruddle, H.V. & Szabadi, E. (1981) Relationship between response rate and reinforcement frequency in variable-interval schedules: II. effect of the volume of sucrose reinforcement. *J. Exp. Anal. Behav.*, 35, 263-269.
- Bronson, F. H. & Whitten, W.K. (1968) Oestrus-accelerating pheromone of mice: Assay, androgen-dependency and presence in bladder urine. *J. Reprod. Fertil.*, 15, 131-134.
- Bruce, H. M. (1960) A block to pregnancy in the mouse caused by proximity of strange males. *J. Reprod. Fertil.*, 1:96-103., 96-103.

- Cannon, C. M. & Palmiter, R.D. (2003) Reward without dopamine. *J. Neurosci.*, 23, 10827-10831.
- Cannon, C. M. & Bseikri, M.R. (2004) Is dopamine required for natural reward? *Physiol. Behav.*, 81, 741-748.
- Carboni, E., Imperato, A., Perezani, L. & Di Chiara, G. (1989a) Amphetamine, cocaine, phencyclidine and nomifensine increase extracellular dopamine concentrations preferentially in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Neuroscience*, 28, 653-661.
- Carboni, E., Imperato, A., Perezani, L. & Di Chiara, G. (1989b) Amphetamine, cocaine, phencyclidine and nomifensine increase extracellular dopamine concentrations preferentially in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Neuroscience*, 28, 653-661.
- Cooper, D. C., Klipec, W.D., Fowler, M.A. & Ozkan, E.D. (2006) A role for the subiculum in the brain motivation/reward circuitry. *Behav. Brain Res.*, 174, 225-231.
- Crowder, W. F. & Hutto, C.W., Jr. (1992) Operant place conditioning measures examined using morphine reinforcement. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 41, 825-835.
- Darwin, C. (1871) *The descent of man and selection in relation to sex*. John Murray, London.
- Darwin, C. (1859) *On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life*. John Murray, London.
- D'Este, L., Casini, A., Puglisi-Allegra, S., Cabib, S. & Renda, T.G. (2007) Comparative immunohistochemical study of the dopaminergic systems in two inbred mouse strains (C57BL/6J and DBA/2J). *J. Chem. Neuroanat.*, 33, 67-74.
- Di Chiara, G. & Imperato, A. (1988) Opposite effects of mu and kappa opiate agonists on dopamine release in the nucleus accumbens and in the dorsal caudate of freely moving rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 244, 1067-1080.
- Dominic, C. J. (1965) The origin of the pheromones causing pregnancy block in mice. *J. Reprod. Fertil.*, 10, 469-472.
- Dominic, C. J. (1966) Block to pseudopregnancy in mice caused by exposure to male urine. *Experientia*, 22, 534-535.
- Doty, R. L. (2003) Mammalian pheromones: Fact or fantasy? In Doty, R. L. (ed), *Handbook of Olfaction and Gustation*. Marcel Dekker, New York, pp. 345-384.
- Drevets, W. C., Gautier, C., Price, J.C., Kupfer, D.J., Kinahan, P.E., Grace, A.A., Price, J.L. & Mathis, C.A. (2001) Amphetamine-induced dopamine release in human ventral striatum correlates with euphoria. *Biol. Psychiatry*, 49, 81-96.

- Dulac, C. & Axel, R. (1998) Expression of candidate pheromone receptor genes in vomeronasal neurons. *Chem. Senses*, 23, 467-475.
- Dwyer, D. M. (2005) Reinforcer devaluation in palatability-based learned flavor preferences. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.*, 31, 487-492.
- Fibiger, H. C., Nomikos, G.G., Pfaus, J.G. & Damsma, G. (1992) Sexual behavior, eating and mesolimbic dopamine. *Clin. Neuropharmacol.*, 15 Suppl 1 Pt A, 566A-567A.
- Foltin, R. W. & Fischman, M.W. (1991) Smoked and intravenous cocaine in humans: Acute tolerance, cardiovascular and subjective effects. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 257, 247-261.
- Fouriezos, G. & Wise, R.A. (1976) Pimozide-induced extinction of intracranial self-stimulation: Response patterns rule out motor or performance deficits. *Brain Res.*, 103, 377-380.
- Geisler, S. & Zahm, D.S. (2005) Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions 6598. *J. Comp. Neurol.*, 490, 270-294.
- Gessa, G. L., Muntoni, F., Collu, M., Vargiu, L. & Mereu, G. (1985) Low doses of ethanol activate dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res.*, 348, 201-203.
- Grill, H. J. & Norgren, R. (1978) The taste reactivity test. II. mimetic responses to gustatory stimuli in chronic thalamic and chronic decerebrate rats. *Brain Res.*, 143, 281-297.
- Haber, S. N., Fudge, J.L. & McFarland, N.R. (2000) Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *J. Neurosci.*, 20, 2369-2382.
- Hajnal, A. & Norgren, R. (2001) Accumbens dopamine mechanisms in sucrose intake. *Brain Res.*, 904, 76-84.
- Hajnal, A., Smith, G.P. & Norgren, R. (2004) Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 286, R31-R37.
- Halpern, M. & Martinez-Marcos, A. (2003) Structure and function of the vomeronasal system: An update. *Prog. Neurobiol.*, 70, 245-318.
- Heyman, G. M. & Monaghan, M.M. (1994) Reinforcer magnitude (sucrose concentration) and the matching law theory of response strength. *J. Exp. Anal. Behav.*, 61, 505-516.
- Hull CL (1943) *Principles of Behavior, an Introduction of Behavior Theory*. Appleton-Century, New York.
- Hull, E. M., Meisel, R. L. & Sachs, B. D. (2002) Male sexual behavior. In Pfaff, D. W., Arnold, A. P., Etgen, A. M., Fahrbach, S. E. & Rubin, R. T. (eds), *Brain Hormones and Behavior*. Academic Press, San Diego, pp. 1-138.

- Imperato, A. & Di Chiara, G. (1986) Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 239, 219-228.
- Imperato, A., Mulas, A. & Di Chiara, G. (1986) Nicotine preferentially stimulates dopamine release in the limbic system of freely moving rats. *Eur. J. Pharmacol.*, 132, 337-338.
- Johanson, C. E. & Uhlenhuth, E.H. (1978) Drug self-administration in humans. *NIDA Res. Monogr.*, (20), 68-85.
- Johanson, C. E. & Schuster, C.R. (1981) A comparison of the behavioral effects of l- and dl-cathinone and d-amphetamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 219, 355-362.
- Karlson P, B. A. (1959) Pheromones (ectohormones) in insects. *Annual Review of Entomology*, 4, 39-58.
- Karlson, P. & Luscher, M. (1959) Pheromones': A new term for a class of biologically active substances. *Nature*, 183, 55-56.
- Kelley, A. E. (2004) Ventral striatal control of appetitive motivation: Role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 27, 765-776.
- Kuczenski, R., Segal, D.S. & Aizenstein, M.L. (1991) Amphetamine, cocaine, and fencamfamine: Relationship between locomotor and stereotypy response profiles and caudate and accumbens dopamine dynamics. *J. Neurosci.*, 11, 2703-2712.
- Lamb, R. J., Preston, K.L., Schindler, C.W., Meisch, R.A., Davis, F., Katz, J.L., Henningfield, J.E. & Goldberg, S.R. (1991) The reinforcing and subjective effects of morphine in post-addicts: A dose-response study. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 259, 1165-1173.
- Lapish, C. C., Kroener, S., Durstewitz, D., Lavin, A. & Seamans, J.K. (2007) The ability of the mesocortical dopamine system to operate in distinct temporal modes. *Psychopharmacology (Berl)*, 191, 609-625.
- Laruelle, M., Abi-Dargham, A., van Dyck, C.H., Rosenblatt, W., Zea-Ponce, Y., Zoghbi, S.S., Baldwin, R.M., Charney, D.S., Hoffer, P.B. & Kung, H.F. (1995) SPECT imaging of striatal dopamine release after amphetamine challenge. *J. Nucl. Med.*, 36, 1182-1190.
- Markou, A., Weiss, F., Gold, L.H., Caine, S.B., Schulteis, G. & Koob, G.F. (1993) Animal models of drug craving. *Psychopharmacology (Berl)*, 112, 163-182.
- Martinez, D., Broft, A., Foltin, R.W., Slifstein, M., Hwang, D.R., Huang, Y., Perez, A., Frankle, W.G., Cooper, T., Kleber, H.D., Fischman, M.W. & Laruelle, M. (2004) Cocaine dependence and d2 receptor availability in the functional subdivisions of the striatum: Relationship with cocaine-seeking behavior. *Neuropsychopharmacology*, 29, 1190-1202.

- Martinez-Ricos, J., Agustin-Pavon, C., Lanuza, E. & Martinez-Garcia, F. (2007) Intraspecific communication through chemical signals in female mice: Reinforcing properties of involatile male sexual pheromones. *Chem. Senses*, 32, 139-148.
- Martinez-Ricos, J., Agustin-Pavon, C., Lanuza, E. & Martinez-Garcia, F. (2008) Role of the vomeronasal system in intersexual attraction in female mice. *Neuroscience*, 153, 383-395.
- Matthews, R. T. & German, D.C. (1984) Electrophysiological evidence for excitation of rat ventral tegmental area dopamine neurons by morphine. *Neuroscience*, 11, 617-625.
- Mereu, G., Yoon, K.W., Boi, V., Gessa, G.L., Naes, L. & Westfall, T.C. (1987) Preferential stimulation of ventral tegmental area dopaminergic neurons by nicotine. *Eur. J. Pharmacol.*, 141, 395-399.
- Moncho-Bogani, J., Lanuza, E., Hernandez, A., Novejarque, A. & Martinez-Garcia, F. (2002) Attractive properties of sexual pheromones in mice. innate or learned? *Physiol. Behav.*, 77, 167-176.
- Moncho-Bogani, J., Lanuza, E., Lorente, M.J. & Martinez-Garcia, F. (2004) Attraction to male pheromones and sexual behaviour show different regulatory mechanisms in female mice. *Physiol. Behav.*, 81, 427-434.
- Moncho-Bogani, J., Martinez-Garcia, F., Novejarque, A. & Lanuza, E. (2005) Attraction to sexual pheromones and associated odorants in female mice involves activation of the reward system and basolateral amygdala. *Eur. J. Neurosci.*, 21, 2186-2198.
- Nadaud, D., Simon, H., Herman, J.P. & Le Moal, M. (1984) Contributions of the mesencephalic dopaminergic system and the trigeminal sensory pathway to the ventral tegmental aphagia syndrome in rats. *Physiol. Behav.*, 33, 879-887.
- Olds, J. & Milner, P. (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 47, 419-427.
- Park, T. H. & Carr, K.D. (1998) Neuroanatomical patterns of fos-like immunoreactivity induced by a palatable meal and meal-paired environment in saline- and naltrexone-treated rats. *Brain Res.*, 805, 169-180.
- Pecina, S., Berridge, K.C. & Parker, L.A. (1997) Pimozide does not shift palatability: Separation of anhedonia from sensorimotor suppression by taste reactivity. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 58, 801-811.
- Pecina, S., Cagniard, B., Berridge, K.C., Aldridge, J.W. & Zhuang, X. (2003) Hyperdopaminergic mutant mice have higher "wanting" but not "liking" for sweet rewards. *J. Neurosci.*, 23, 9395-9402.

- Pfaus, J. G. (1999) Neurobiology of sexual behavior. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 9, 751-758.
- Phillips, A. G. & Fibiger, H.C. (1978) The role of dopamine in maintaining intracranial self-stimulation in the ventral tegmentum, nucleus accumbens, and medial prefrontal cortex. *Can. J. Psychol.*, 32, 58-66.
- Phillips, G., Willner, P. & Muscat, R. (1991) Suppression or facilitation of operant behaviour by raclopride dependent on concentration of sucrose reward. *Psychopharmacology (Berl)*, 105, 239-246.
- Phillipson, O. T. (1979) Afferent projections to the ventral tegmental area of tsai and interfascicular nucleus: A horseradish peroxidase study in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 187, 117-144.
- Pickens R, Meisch RA & Thompson T (1978) Drug-self administration: An analysis of the reinforcing effects of drugs. In Iversen SO, S. S. (ed), *Handbook of Psychopharmacology*. Plenum Press, Nueva York, pp. 1-37.
- Riddle, E. L., Fleckenstein, A.E. & Hanson, G.R. (2005) Role of monoamine transporters in mediating psychostimulant effects. *AAPS J.*, 7, E847-51.
- Ruggiero, D. A., Baker, H., Joh, T.H. & Reis, D.J. (1984) Distribution of catecholamine neurons in the hypothalamus and preoptic region of mouse. *J. Comp. Neurol.*, 223, 556-582.
- Russell, M. A. (1989) Subjective and behavioural effects of nicotine in humans: Some sources of individual variation. *Prog. Brain Res.*, 79, 289-302.
- Sakai, K. & Gash, D.M. (1994) Effect of bilateral 6-OHDA lesions of the substantia nigra on locomotor activity in the rat. *Brain Res.*, 633, 144-150.
- Salamone, J. D. (1992) Complex motor and sensorimotor functions of striatal and accumbens dopamine: Involvement in instrumental behavior processes. *Psychopharmacology (Berl)*, 107, 160-174.
- 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. & Snyder, B.J. (1997) Behavioral functions of nucleus accumbens dopamine: Empirical and conceptual problems with the anhedonia hypothesis. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 21, 341-359.
- Salamone, J. D. & Correa, M. (2002) Motivational views of reinforcement: Implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behav. Brain Res.*, 137, 3-25.

- Salamone, J. D., Correa, M., Mingote, S. & Weber, S.M. (2003) Nucleus accumbens dopamine and the regulation of effort in food-seeking behavior: Implications for studies of natural motivation, psychiatry, and drug abuse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 305, 1-8.
- Samson, H. H., Cunningham, C.L., Czachowski, C.L., Chappell, A., Legg, B. & Shannon, E. (2004) Devaluation of ethanol reinforcement. *Alcohol*, 32, 203-212.
- Scalia, F. & Winans, S.S. (1975) The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J. Comp. Neurol.*, 161, 31-55.
- Schultz, W. (1998) Predictive reward signal of dopamine neurons. *J. Neurophysiol.*, 80, 1-27.
- Schultz, W. (2001) Reward signaling by dopamine neurons. *Neuroscientist*, 7, 293-302.
- Shimura, T., Kamada, Y. & Yamamoto, T. (2002) Ventral tegmental lesions reduce overconsumption of normally preferred taste fluid in rats. *Behav. Brain Res.*, 134, 123-130.
- Snyder, S. H. (1992) *Drogas y cerebro*. Barcelona: Prensas Científicas; 1992. p. 33. 14.
- Spanagel, R. & Weiss, F. (1999) The dopamine hypothesis of reward: Past and current status. *Trends Neurosci.*, 22, 521-527.
- Stein, L. (1964) Self-stimulation of the brain and the central stimulant action of amphetamine. *Fed. Proc.*, 23, 836-850.
- Steiner, J. E. (1973) The gustofacial response: Observation on normal and anencephalic newborn infants. *Symp. Oral Sens. Percept.*, (4), 254-278.
- Stowers, L., Holy, T.E., Meister, M., Dulac, C. & Koentges, G. (2002) Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science*, 295, 1493-1500.
- Tanda, G. & Di Chiara, G. (1998) A dopamine-mu1 opioid link in the rat ventral tegmentum shared by palatable food (fonzies) and non-psychostimulant drugs of abuse. *Eur. J. Neurosci.*, 10, 1179-1187.
- Thibaut, F., Vaugeois, J.M. & Petit, M. (1995) The dopamine transporter: Characterization and physiopathologic implications. *Encephale*, 21, 445-451.
- Ungerstedt, U. (1971) *Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ungless, M. A., Magill, P.J. & Bolam, J.P. (2004) Uniform inhibition of dopamine neurons in the ventral tegmental area by aversive stimuli. *Science*, 303, 2040-2042.
- Volkow, N. D., Wang, G.J., Fischman, M.W., Foltin, R.W., Fowler, J.S., Abumrad, N.N., Vitkun, S., Logan, J., Gatley, S.J., Pappas, N., Hitzemann, R. & Shea, C.E. (1997)

- Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy. *Nature*, 386, 827-830.
- Volkow, N. D., Wang, G.J., Fowler, J.S., Logan, J., Gatley, S.J., Wong, C., Hitzemann, R. & Pappas, N.R. (1999) Reinforcing effects of psychostimulants in humans are associated with increases in brain dopamine and occupancy of D(2) receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 291, 409-415.
- Wedzony, K., Koros, E., Czyrak, A., Chocyk, A., Czepiel, K., Fijal, K., Mackowiak, M., Rogowski, A., Kostowski, W. & Bienkowski, P. (2003) Different pattern of brain c-fos expression following re-exposure to ethanol or sucrose self-administration environment. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 368, 331-341.
- Westerink, B. H., Teisman, A. & de Vries, J.B. (1994) Increase in dopamine release from the nucleus accumbens in response to feeding: A model to study interactions between drugs and naturally activated dopaminergic neurons in the rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 349, 230-235.
- Wise, R. A. (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nat. Rev. Neurosci.*, 5, 483-494.
- Wise, R. A. (2006) The parsing of food reward. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 291, R1234-5.
- Wise, R. A. & Rompre, P.P. (1989) Brain dopamine and reward. *Annu. Rev. Psychol.*, 40, 191-225.
- Wysocki, C. J., Wellington, J.L. & Beauchamp, G.K. (1980) Access of urinary nonvolatiles to the mammalian vomeronasal organ. *Science*, 207, 781-783.



Capítulo I:

**Organización anatómica de los sistemas  
dopaminérgicos en el cerebro del ratón.**



## **Introducción**

La dopamina (DA) es una catecolamina (compuestos orgánicos que contienen un anillo bencénico con dos grupos hidroxilo adyacentes y opuestos a un grupo etilamina), y como tal pertenece a la familia de las monoaminas (Fig 1.1). La DA tiene una función como hormona y como neurotransmisor. Su papel central fue descubierto en 1952 por Arvid Carlsson (Carlsson, 1959; véase las revisiones de Benes, 2001; Marsden, 2006), quien demostró que no era exclusivamente un precursor de la norepinefrina y la epinefrina, ya que la concentración de estas catecolaminas y de la dopamina variaba de forma no correlacionada en distintas partes del cerebro (Carlsson, 1959), siendo la DA especialmente abundante en el estriado. La dopamina debe su nombre a su precursor, la 3,4-dihidroxifenilalanina, o abreviado L-DOPA.

### **Primeros estudios de caracterización de los grupos celulares aminérgicos**

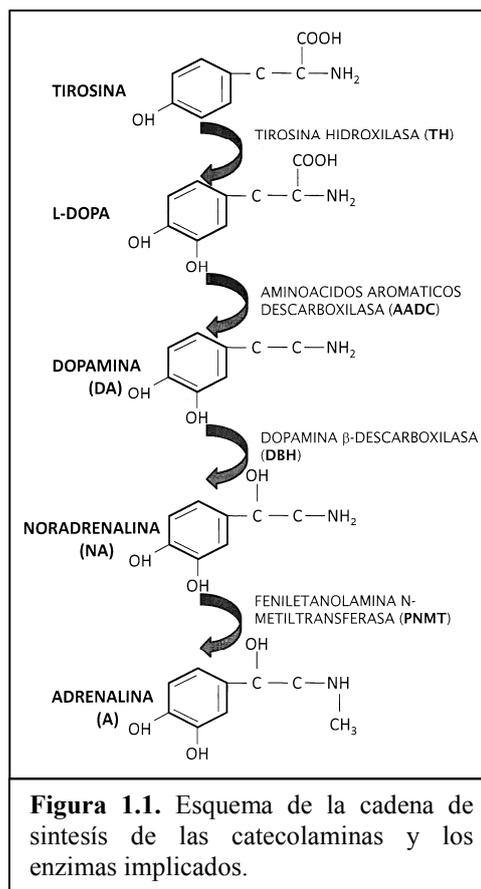
Entre los años 1950-70 se desarrollaron las técnicas necesarias para la detección histoquímica de las catecolaminas. A principios de los años 50, Eränkö descubrió que secciones de medula adrenal de roedores mostraban fluorescencia tras fijarlas con formaldehído (Eränkö, 1955). Esta técnica mejorada por Falck *et al.* (1962), permitió cartografiar la distribución de catecolaminas en el sistema nervioso central. En un primer momento se describieron 12 grupos catecolaminérgicos, que no coincidían plenamente con las agrupaciones neuronales descritas previamente, por lo que se etiquetaron como los grupos A1 al A12, de caudal a rostral (Dahlstrom & Fuxe, 1964).

A principios de la década de los 80, la identificación y purificación de los enzimas que catalizaban la síntesis de las catecolaminas permitió obtener antisueros específicos contra estos enzimas y contra las propias catecolaminas lo que permitió la detección inmunohistoquímica de las neuronas catecolaminérgicas. Mediante la detección específica de cada uno de los diferentes enzimas de la ruta de síntesis (Fig 1.1) se podía establecer cuando finalizaba esta ruta biosintética en cada grupo celular en particular, y por lo tanto discriminar las células DAérgicas de las adrenérgicas y noradrenérgicas.

La utilización de estas técnicas reveló una cantidad de células y de innervación catecolaminérgica mucho mayor que la descrita anteriormente. Se amplió el número de grupos catecolaminérgicos hasta el A17 (Björklund & Lindvall, 1984; Hökfel *et al.*, 1984), incluyendo varios grupos en el hipotálamo, el bulbo olfativo y la retina. Además aparecieron algunos grupos de neuronas cuyo perfil de inmunoreactividad era difícil de

explicar, ya que la cadena de síntesis acababa con la L-DOPA (Smeets & Steinbusch, 1990) o eran reactivas para la DA o noradrenalina pero no para la hidroxilasa de tirosina (*tyrosine hydroxylase*, TH) (Smeets & Gonzalez, 1990), enzima anterior en la cadena de síntesis (ver Discusión).

Los principales grupos DAérgicos se encontraron en el mesencéfalo y determinados niveles rostrales a éste. En el mesencéfalo se describieron 3 grupos (A8-A10), entre los que había cierta continuidad. Los grupos A9 y A10 se situaban, *grosso modo*, en la *substantia nigra* (SN) y el *área ventral tegmental* (VTA) respectivamente. Estos dos núcleos (VTA y SN) no fueron considerados como entidades



separadas en el cerebro humano (en un primer momento), pero sí en animales en los que la SN estaba menos desarrollada. Así, ya en 1925 Tsai identificó una estructura medial en el tegmento de la zarigüeya (Tsai, 1925), bien diferenciada de la SN, a la que denominó núcleo ventral tegmental (*nucleus ventralis tegmenti*). Sin embargo, esta misma estructura fue llamada núcleo del pedúnculo mamilar por Papez (1932) en el estudio del encéfalo del armadillo.

De estas dos alternativas, la nomenclatura más utilizada para la descripción de la región mesencefálica en otras especies de mamíferos fue la de Tsai, pero a partir de 1958 se convirtió casi en la exclusiva cuando Nauta (1958) acuñó, en su descripción del mesencéfalo de gato, el término *área tegmental ventral* de Tsai para referirse a este grupo celular. El empleo de la palabra “*área*” en lugar de “*núcleo*” se justificaba en función de la heterogeneidad citoarquitectónica de la región, así como por la falta de límites claros y bien definidos con las estructuras que la rodean. Además, en éste y en otros estudios, Nauta (1956, 1958, 1960) describió que ciertas estructuras límbicas proyectan a territorios del tegmento que incluyen la VTA pero no la SN, lo que reforzó la idea que la VTA era una estructura diferente, anatómica y funcionalmente, de la SN.

La complejidad arquitectónica del tegmento y la confusión terminológica provocó que durante un tiempo algunos autores consideraran que VTA era sinónimo del grupo

A10 (Dahlstrom & Fuxe, 1964; Fallon & Moore, 1978; Moore & Bloom, 1978) y por tanto incluyeran en la VTA las células DAérgicas de la línea media del mesencéfalo. La inclusión de núcleos de la línea media que contenían algunas neuronas DAérgicas significaba que la VTA contenía el núcleo interfascicular (IF), el núcleo linear rostral (RLi) y el núcleo lineal central (CeLi) del rafe (Oades & Halliday, 1987). Sin embargo, Swanson (1982) considerando otras evidencias citoarquitectónicas excluyó estos núcleos en la definición de la VTA.

Pocos años después, Hokfelt (1984) mediante inmunofluorescencia, describió neuronas DAérgicas localizadas en el núcleo supramamilar (SuM), la habenula medial (MHb), el núcleo dorsal del rafe (DR) y el área gris periacueductal (PAG), y las incluyó en el grupo A10, ampliándolo así considerablemente.

### **Conocimiento actual sobre la organización de los sistemas dopaminérgicos.**

La mayoría de estudios y descripciones de los sistemas DAérgicos cerebrales se han realizado en rata (Dahlstrom & Fuxe, 1964; Lindvall & Björklund, 1974; Fallon & Moore, 1978, Hokfelt *et al.*, 1984; Ciliax *et al.*, 1995; Harris & Nestler, 1996; Mitsuma *et al.*, 1998), si bien hay algunos estudios en otros mamíferos como primates (incluyendo humanos; Nobin & Björklund, 1973; Pickel *et al.*, 1980; Pearson *et al.*, 1983; Gaspar *et al.*, 1992) y gatos (Rodrigo *et al.*, 1998; Kitahama *et al.*, 2007). Además existen estudios en diversos vertebrados no mamíferos (Smeets & Reiner, 1994). Todos estos estudios indican que los sistemas DAérgicos han sufrido una evolución muy conservada, lo que sugiere que desempeñan una función básica en el cerebro de los vertebrados tetrápodos. De hecho, la depleción del *input* DAérgico al estriado provoca alteraciones motoras en todos los tetrápodos estudiados (Greenberg *et al.*, 1988; Reiner, 1994; Cousins & Salamone, 1996). Pero además de esta implicación en el control motor, los sistemas DAérgicos cerebrales participan de manera muy relevante en procesos cognitivos (Robbins, 2005) y motivacionales (Di Chiara, 2005). No es de extrañar, por tanto, que el interés por entender la organización y la función del sistema dopaminérgico continúe siendo un objetivo de primer orden 50 años después del descubrimiento de la dopamina como neurotransmisor (Björklund & Dunnett, 2007).

Además, se ha relacionado la innervación DAérgica telencefálica y sus alteraciones con diversas patologías neurológicas y psiquiátricas. Así, se ha relacionado la alteración de los niveles de DA en el telencéfalo con la depresión (Kapur & Mann, 1992; Dailly *et al.*, 2004; Nestler & Carlezon, 2005; Mällo *et al.*, 2007), la ansiedad (Espejo, 1997;

Mällo *et al.*, 2006), la esquizofrenia (Koh *et al.*, 2003; Iversen & Iversen, 2007; Meisenzahl *et al.*, 2007; Toda & Abi-Darghan, 2007), el síndrome de déficit de atención con hiperactividad (Iversen & Iversen, 2007), el síndrome de Tourette (Tarnok *et al.*, 2007; Yeh *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2007), la enfermedad de Parkinson (Parkinson, 1817; Chinta & Andersen, 2006; Iversen & Iversen, 2007) y evidentemente con las adicciones (Koob & Le Moal, 1997; Bonci *et al.*, 2003; diChiara *et al.*, 2004; Hyman, 2005; Alcaro *et al.*, 2007; Koob & Le Moal, 2008).

### **El ratón como modelo experimental para el estudio de las enfermedades derivadas de alteraciones en el sistema dopaminérgico**

La posibilidad de generar ratones modificados genéticamente con alteraciones de la transmisión dopaminérgica ha provocado que el ratón se haya convertido en los últimos años en la especie más utilizada como modelo experimental para el estudio de las patologías neurológicas y psiquiátricas citadas anteriormente (Takao *et al.*, 2007), modelo en el que además se inicia la prueba de fármacos destinados al tratamiento de estas enfermedades (Swerdlow & Geyer, 1998; Olincy & Stevens, 2007; Gainetdinov, 2008). De hecho, se han llevado a cabo estudios tanto con animales hiperdopaminérgicos, en los que las neuronas DAérgicas no podían recaptar la DA del espacio sináptico (*Knock-down* para el transportador de dopamina, DAT; Pecina *et al.*, 2003), cómo en animales que carecen de DA (*Knock-out* para la hidroxilasa de tirosina; Cannon & Palmiter, 2003; Cannon & Bseikri, 2004). Estos últimos animales son más problemáticos ya que al no tener TH no pueden sintetizar ninguna catecolamina, y necesitan inyecciones diarias de L-DOPA para su supervivencia, y el uso de algún estimulante (cafeína) para poder desarrollar un comportamiento motor normal. Además, se han estudiado los animales modificados genéticamente para eliminar cada uno de los cinco tipos de receptores de dopamina (Horne *et al.*, 2005).

A pesar de esta abundancia de estudios sobre la función de los sistemas DAérgicos en ratones transgénicos, se desconoce parcialmente la organización anatómica de estos sistemas en el ratón (Bentivoglio & Morelli, 2005). Los estudios anatómicos en el ratón se restringen a descripciones parciales de centros DAérgicos concretos (Ruggiero *et al.*, 1984 – hipotálamo; Zeiss, 2005 – tegmentum) o a estudios de detalles muy específicos en los que se buscan diferencias entre distintas cepas (Ross *et al.*, 1976; Zaborsky & Vadasz, 2001; D'Este *et al.*, 2007).

Por ello, como paso previo para abordar el estudio del papel de los sistemas dopaminérgicos en el refuerzo mediado por sustancias químicas, hemos realizado una descripción exhaustiva tanto de los grupos de neuronas DAérgicas del encéfalo de ratón, revisando sus límites y los núcleos que los incluyen, como de la innervación dopaminérgica del telencéfalo. Para ello hemos utilizado la detección inmunohistoquímica de la TH, con el fin de contrastar la distribución de las neuronas TH-positivas en el ratón con los datos obtenidos en rata, así como en otras especies, y hemos completado el estudio con la caracterización inmunohistoquímica del transportador de dopamina (DAT), que es un marcador específico de los grupos dopaminérgicos mesencefálicos (Lorang *et al.*; 1994; Ciliax *et al.*, 1995; Jansson *et al.*, 1999).

A8	Área retrorubra (RRF)	Tegmento mesencefálico
A9	Substantia nigra (SN). Presenta continuidad con A10.	
A10	Área ventral tegmental (AVT); incluye neuronas en el área gris periacueductal (PAG)	
A11	Núcleo subparafascicular talámico, y alrededor del tracto mamillo-talámico	Hipotálamo
A12	Núcleo arqueado del hipotálamo	
A13	Zona incerta y el núcleo paraventricular posterior	
A14	Compartimento periventricular del hipotálamo anterior y preóptico	
A15	Núcleo anterodorsal preóptico y núcleo supraóptico	
A16	Bulbo olfativo	Telencéfalo

**Tabla 1.1.** Tabla con la ubicación de los grupos dopaminérgicos clásicos que se encuentran en el mesencéfalo, diencéfalo y telencéfalo.



## **Material y métodos**

### **Animales de experimentación**

El presente estudio se realizó utilizando hembras de ratón ( $n = 10$ ) de la cepa CD-1 (Harlan, Barcelona, España) que fueron tratadas de acuerdo con las directrices EEC de las Directivas del Consejo de la Comunidad Europea del 24 de Noviembre de 1986 (86/609/EEC).

### **Detección inmunohistoquímica del DAT y la TH**

Los ratones fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital sódico (0.14 g/Kg) y perfundidos intracardialmente con tampón fosfato salino (0.9% NaCl) seguido de formaldehído 4% en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.4). Algunos animales ( $n = 4$ ) se perfundieron con formaldehído (4%) y gluteraldehído (1%).

Se extrajeron los cerebros y se post-fijaron durante 4 h en el mismo fijador a 4 °C, y se guardaron en sacarosa al 30% hasta que se hundieron. Usando un microtomo de congelación, obtuvimos secciones coronales de 40  $\mu\text{m}$  de espesor en cinco series paralelas. En 2 casos se realizaron secciones sagitales. Para la localización de ambos marcadores de células dopaminérgicas utilizamos la inmunohistoquímica indirecta de la avidina-biotina peroxidasa. Para ello, en primer lugar inhibimos las peroxidasa endógenas, mediante la incubación de las secciones durante 30 minutos en una solución al 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en tampón TRIS salino (TBS; 0.05M pH 7.6) a temperatura ambiente. Después las secciones se incubaron en el anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal de rata anti-DAT, Chemicon International, Ternecula, CA; anticuerpo monoclonal de ratón anti-TH, Sigma Chemical Company, St Louis, MO) diluidos (1:2000 para el DAT; 1:5000 para la TH) en TBS con Triton X-100 (0.3%) y suero normal de conejo (1%) durante toda la noche 4°C. Tras lavar las secciones con TBS las incubamos con el correspondiente anticuerpo secundario (IgG de conejo anti-rata diluidas 1:200, Chemicon International, para el DAT; IgG de caballo anti-ratón diluidas 1:200, Vector Labs., para la TH). Ambos anticuerpos secundarios se utilizaron conjugados con biotina y diluidos en TBS-Tx en 1% suero normal de conejo, durante dos horas a temperatura ambiente. Se volvió a lavar las secciones y se incubaron en el complejo peroxidasa-avidina-biotina (ABC Elite kit; Vector Laboratorios, Burlingame, CA) en TBS con Triton X-100 (0.3%) durante dos horas a temperatura ambiente. La actividad peroxidasa resultante se reveló con diaminobencidina (DAB) como cromógeno (0.04 % en 0.05 M

tampón Tris, pH 8.0), las series anti-DAT se suplementaron con sal de níquel (0.4 % de sulfato de amonio y níquel) para intensificar la reacción. Las secciones se bañaron en gelatina a 38°C (diluida en tampón TRIS) y se montaron en portaobjetos limpios.

Además en algunas series, para eliminar el ruido de fondo causado al utilizar anticuerpos monoclonales de ratón sobre tejido de la misma especie, se siguió el protocolo del kit MOM (*Mouse On Mouse*, Vector). Sin embargo, este protocolo comercial no rindió mejores resultados que la adición de 1% de glutaraldehído al fijador utilizado en la perfusión.

Como control se realizaron series paralelas omitiendo el anticuerpo primario, para asegurarnos que la marca que observamos es específica. En estos experimentos control encontramos células reactivas en algunas partes del neuroepitelio del acueducto y del tercer ventrículo. Esta reactividad no se ha descrito con los resultados, dado que no se debe a la especificidad del anticuerpo. Algunas series, después de estar montadas en portaobjetos, fueron teñidas con azul de toluidina (2%) para la observación de los detalles citoarquitectónicos. Después de unos minutos en el azul de toluidina, los cortes fueron lavados y transferidos a alcohol acético (0.2%), a continuación fueron deshidratados en una serie creciente de alcoholes, aclarados en xileno y cubiertos con Permout (Fisher).

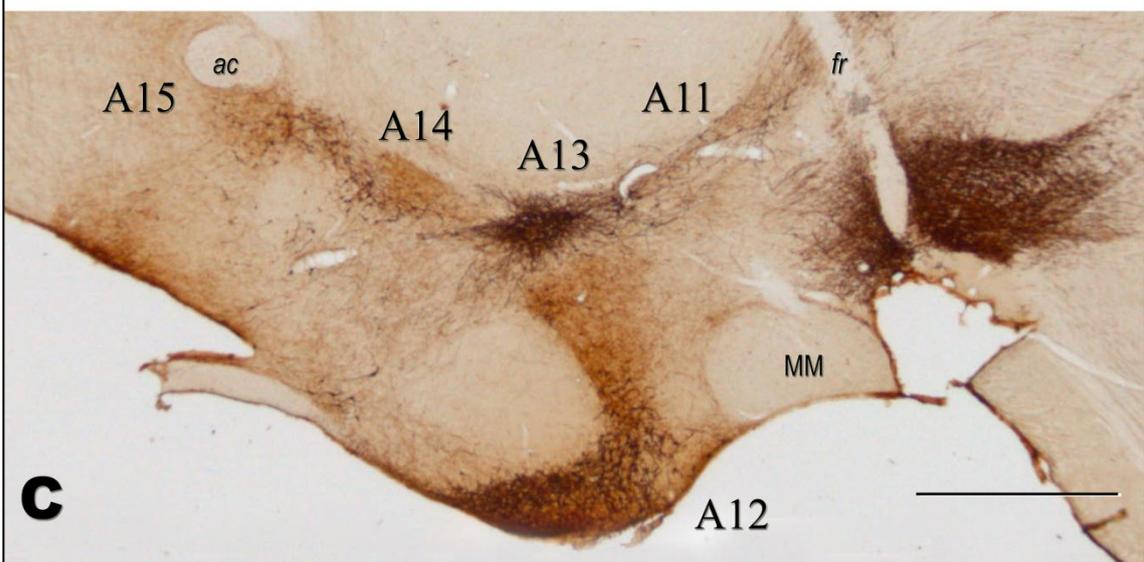
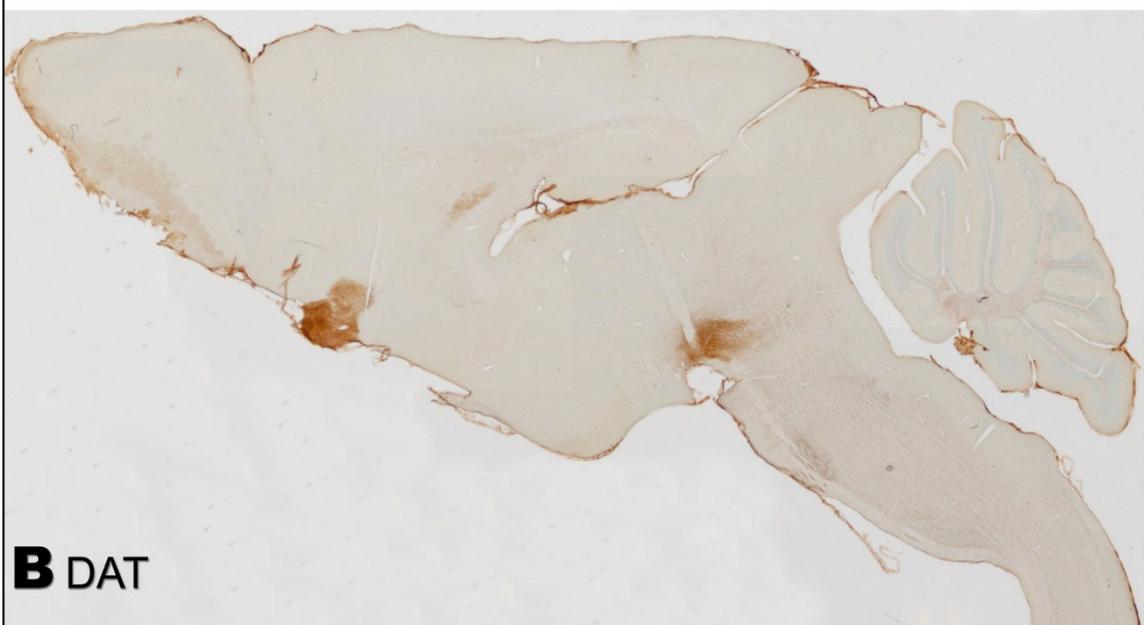
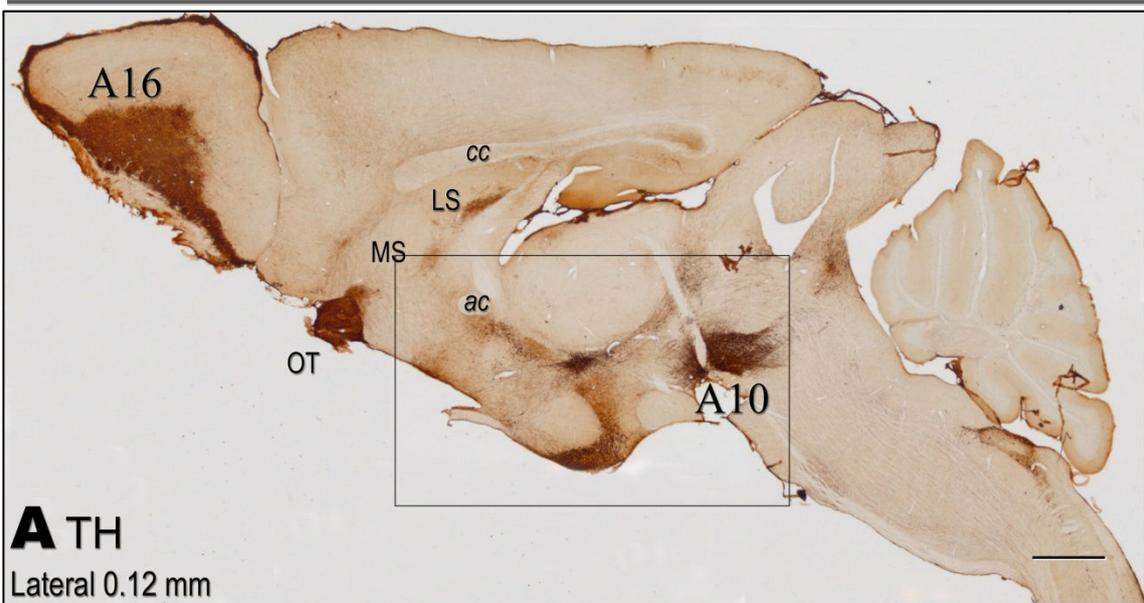
### **Análisis de los resultados**

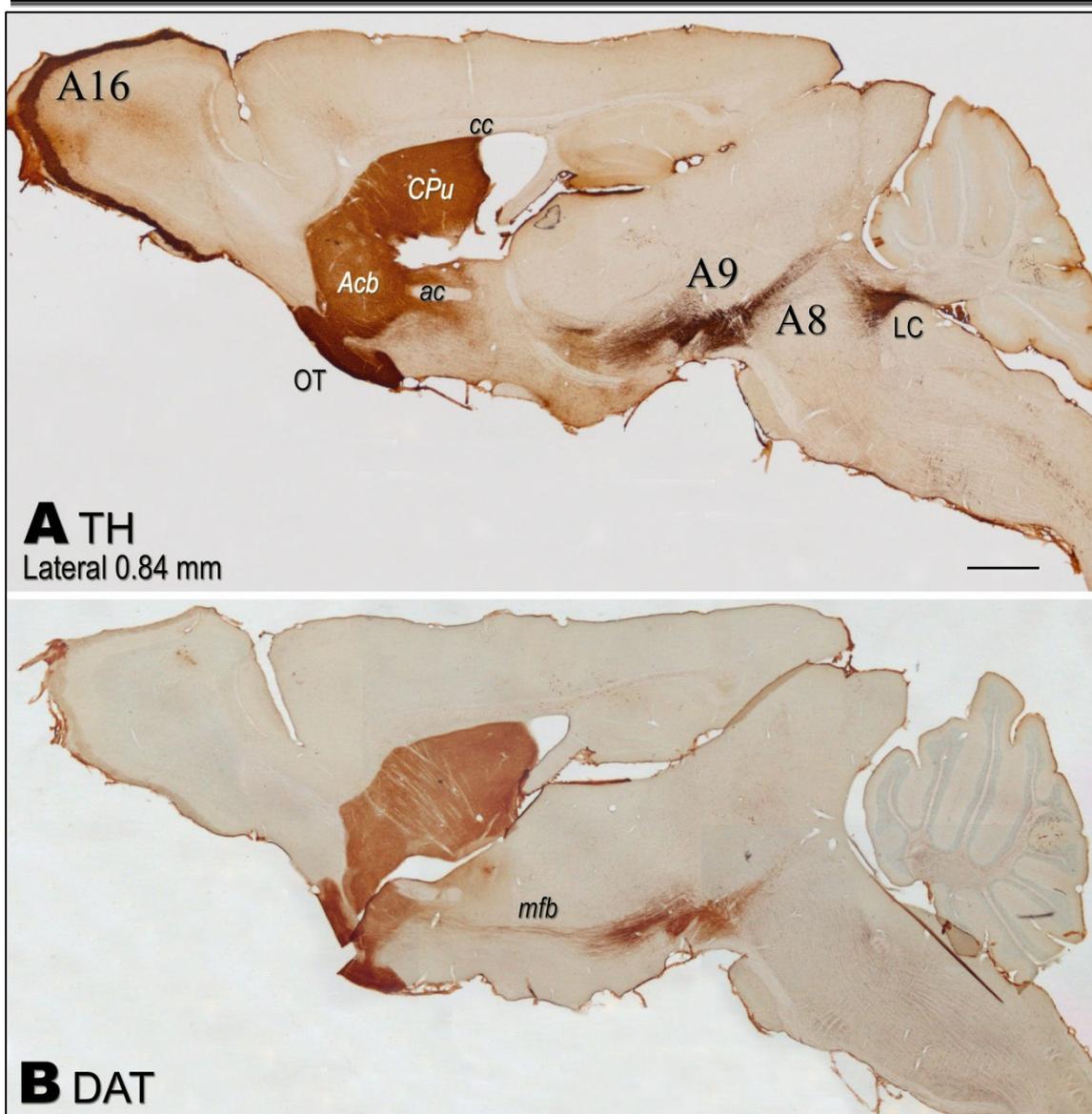
De las preparaciones se obtuvieron fotografías digitales con un microscopio Leitz DMRB acoplado a una cámara digital Leica DC 300 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Para la confección de láminas con aspecto homogéneo, se importaron las imágenes con Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, Mountain View, CA) y se les ajustó el brillo y el contraste de las imágenes originales.

## **Resultados**

Nuestros datos indican la existencia de neuronas inmunoreactivas para TH (TH-ir) en grupos celulares relativamente compactos equivalentes a los grupos aminérgicos descritos en otras especies, desde niveles pontino-mesencefálico (A8-A10) hasta el bulbo olfativo (A16; no hemos estudiado la retina, A17) (Figs. 1.2.A y 1.3.A). Sin embargo, tan solo son reactivos para el DAT los grupos A8, A9 y A10 (Figs. 1.2.B y 1.3.B). En las figuras 1.2. y 1.3. se muestran cortes sagitales del cerebro de ratón en los que podemos ver la ordenación caudo-rostral de los grupos aminérgicos y de los campos de fibras terminales más importantes.

Además, nuestras preparaciones muestran poblaciones dispersas de neuronas TH-ir situadas entre los grupos aminérgicos clásicos, de forma que aparentemente existe continuidad entre los mismos. Esto podemos observarlo tanto en los cortes sagitales como en los frontales. Finalmente, en algunos centros prosencefálicos existen neuronas TH-ir que no coinciden con ninguno de los grupos aminérgicos descritos previamente.

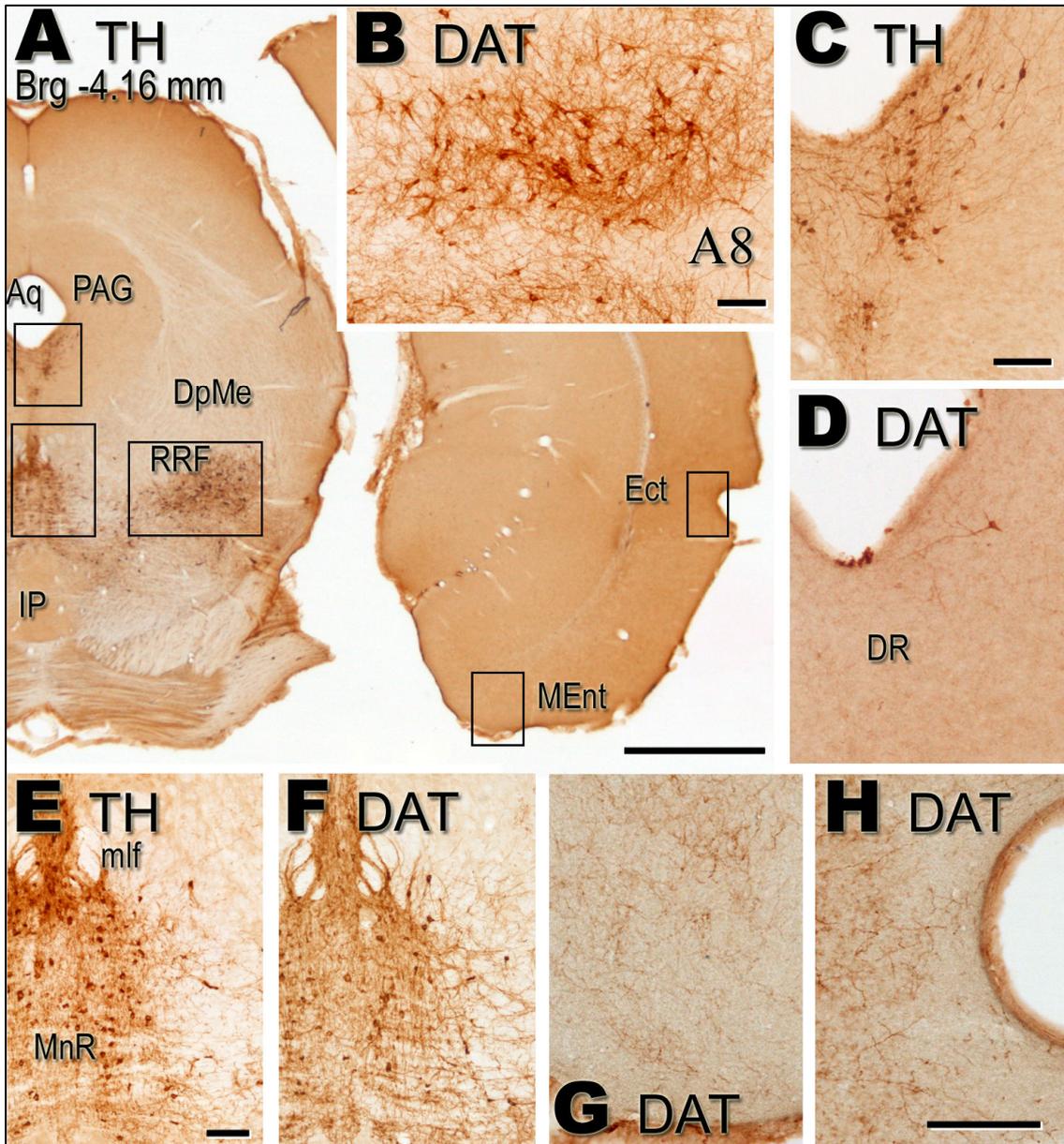




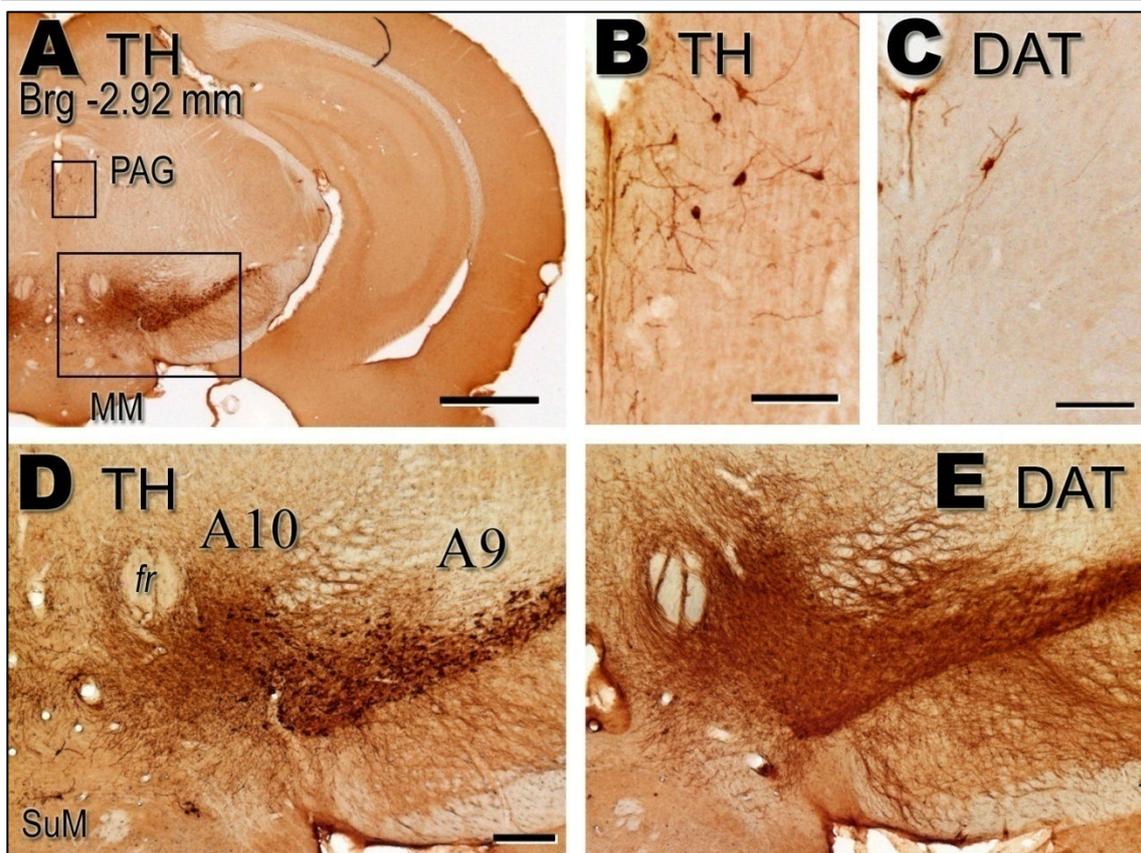
**Figura 1.3.** Reconstrucción a partir de fotomicrografías digitales de secciones sagitales del cerebro de ratón a un nivel lateral de 0.84 mm desde la línea media. **A** y **C** muestran la inmunohistoquímica para la tirosina hidroxilasa (TH). **B** muestra la inmunohistoquímica para el transportador de la dopamina (DAT). En **A** y **B** observamos los grupos aminérgicos mesencefálicos A8 (campo retrorrubro, RRF) y A9 (SN) así como los campos de terminación estriatales. En **A** además observamos el *locus coeruleus* ya que es noradrenérgico. Por tanto sus células contienen TH, pero no DAT al no ser DAérgico. Al LC también se le denomina A6. Barra de calibración (Bc) **A**: 1 mm.

**Izquierda Figura 1.2.** Reconstrucción a partir de fotomicrografías digitales de secciones sagitales del cerebro de ratón a un nivel lateral de 0.12 mm desde la línea media. **A** y **C** muestran la inmunohistoquímica para la tirosina hidroxilasa (TH). **B** muestra la inmunohistoquímica para el transportador de la dopamina (DAT). En **C** se observan en detalle el grupo A10 y los grupos hipotalámicos A11-15 así como la continuidad entre ellos. Barra de calibración (Bc) **A** y **C**: 1 mm.

1. Distribución de células inmunoreactivas para TH y DAT en el mesencéfalo y prosencéfalo del ratón

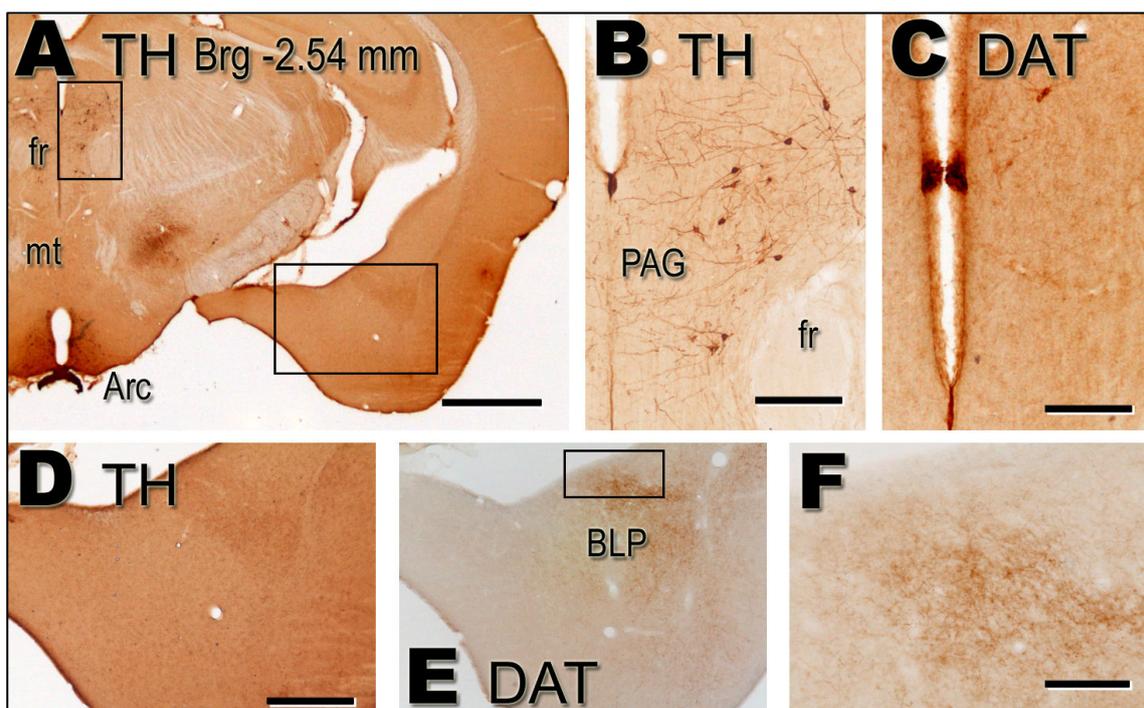


**Figura 1.4.** Fotomicrografías digitales de secciones transversales del cerebro de ratón a un nivel antero-posterior de -4.16 mm desde Bregma. **A**, **C** y **E** muestran la inmunohistoquímica para la tirosina hidroxilasa (TH). **B**, **D**, **F**, **G** y **H** muestran la inmunohistoquímica para el transportador de la dopamina (DAT). En **A** y **B** vemos el grupo aminérgico mesencefálico A8 correspondiente al campo retrorrubro (RRF). BcA: 1 mm. **B**: 100  $\mu$ m. En **C** y **D** vemos la diferencia de reactividad para ambas inmunohistoquímicas en el núcleo del rafe dorsal (DR) Bc: 100  $\mu$ m. En **E** y **F** vemos la reactividad del núcleo del rafe medial para ambas inmunohistoquímicas Bc: 100  $\mu$ m. En **G** y **H** vemos los campos terminales de fibras en la corteza entorrinal medial (MEnt) y ectorrinal (Ect) respectivamente. Bc: 100  $\mu$ m.



**Figura 1.5.** Fotomicrografías digitales de secciones transversales del cerebro de ratón a nivel mesencefálico (Bregma: -2.92 mm). **A**, **B** y **D** muestran, mediante la inmunohistoquímica para la tirosina hidroxilasa (TH), los grupos aminérgicos mesencefálicos A9 (*substantia nigra*) y A10 (área ventral tegmental), así como las células marcadas en el área gris periacueductal (detalle en **B**). **C** y **E** muestran, a efectos de comparación, la innervación dopaminérgica de estas mismas estructuras reveladas mediante la inmunohistoquímica para el transportador de la dopamina (DAT). Bc: **A**: 1 mm. **D** y **E**: 200  $\mu$ m. **B** y **C**: 100  $\mu$ m

A niveles mesencefálicos (Fig. 1.4) el grupo A8 está compuesto por células situadas en el área retrorubra (RRF) y en zonas adyacentes del núcleo profundo del mesencéfalo (DpMe) y del núcleo tegmental pedunculopontino (PPTg) rostral. En esta localización se observan células inmunoreactivas para ambos marcadores (TH-ir y DAT-ir) (Fig 1.4A-B). A niveles anteriores, el grupo A8 muestra límites difusos con el A9, localizado en la *substantia nigra* (sobre todo en sus divisiones compacta y lateral) que igualmente presenta neuronas TH-ir y DAT-ir. Medial al grupo A9 se localiza el A10 (Fig. 1.5A, D-E) que está formado por las células TH-ir y DAT-ir del VTA. Además, en el límite pontino-mesencefálico, el rafe dorsal (DR) muestra numerosas neuronas TH-ir y unas pocas neuronas DAT-ir (Fig. 1.4C-D). Este patrón de inmunoreactividad se extiende rostralmente en la sustancia gris periacueductal (PAG) ventral (Figs. 1.5B-C y 1.6B-C). Desde esta población periacueductal, un pequeño grupo de células con un patrón de inmunoreactividad similar se extiende ventralmente por la línea media, entre los núcleos de Edinger-Westphal (EW) y a través de la división

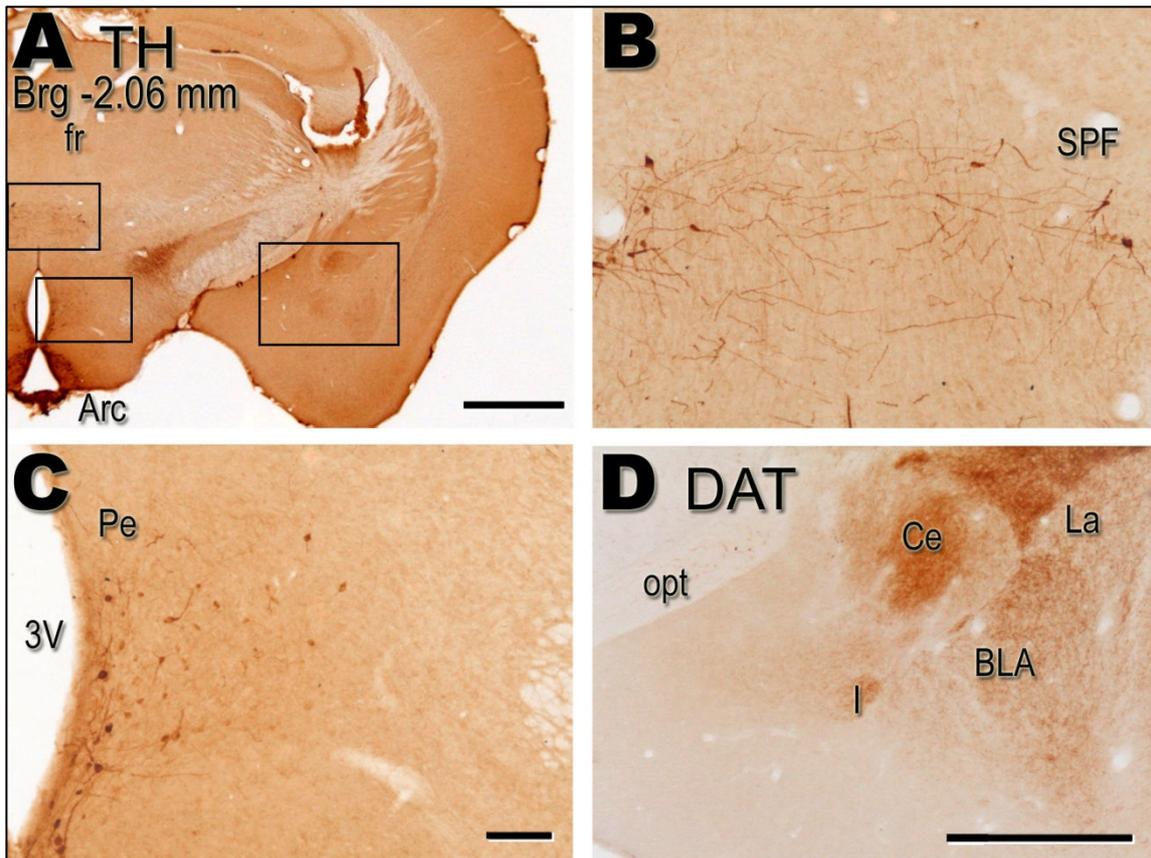


**Figura 1.6.** Fotomicrografías digitales de secciones transversales del cerebro de ratón a un nivel antero-posterior de -2.54 mm desde Bregma. **A**, **B** y **D** muestran la inmunohistoquímica para la tirosina hidroxilasa (TH). **C**, **E** y **F** muestran la inmunohistoquímica para el transportador de la dopamina (DAT). En **B** y **C** vemos las neuronas TH-ir y DAT-ir respectivamente del grupo aminérgico A10 en el área gris periacueductal (PAG). En **D** y **E** vemos la diferencia de reactividad para ambas inmunohistoquímicas en la amígdala caudal y el campo de terminación axonal en la amígdala basolateral posterior (BLP), que se muestra en detalle en **F**. Bc: **A**: 1 mm. **B** y **C**: 100  $\mu$ m. **D** y **E**: 400  $\mu$ m. **F**: 100  $\mu$ m.

rostral del núcleo linear del rafe (RLi) hasta la VTA anterior. La población periacueductal de células TH-ir (parte de las cuales son DAT-ir), se puede seguir rostralmente hasta niveles claramente diencefálicos, en donde se observan células TH-ir y DAT-ir entre ambos fascículos retroflejos (*fr*) (Fig 1.6A-C).

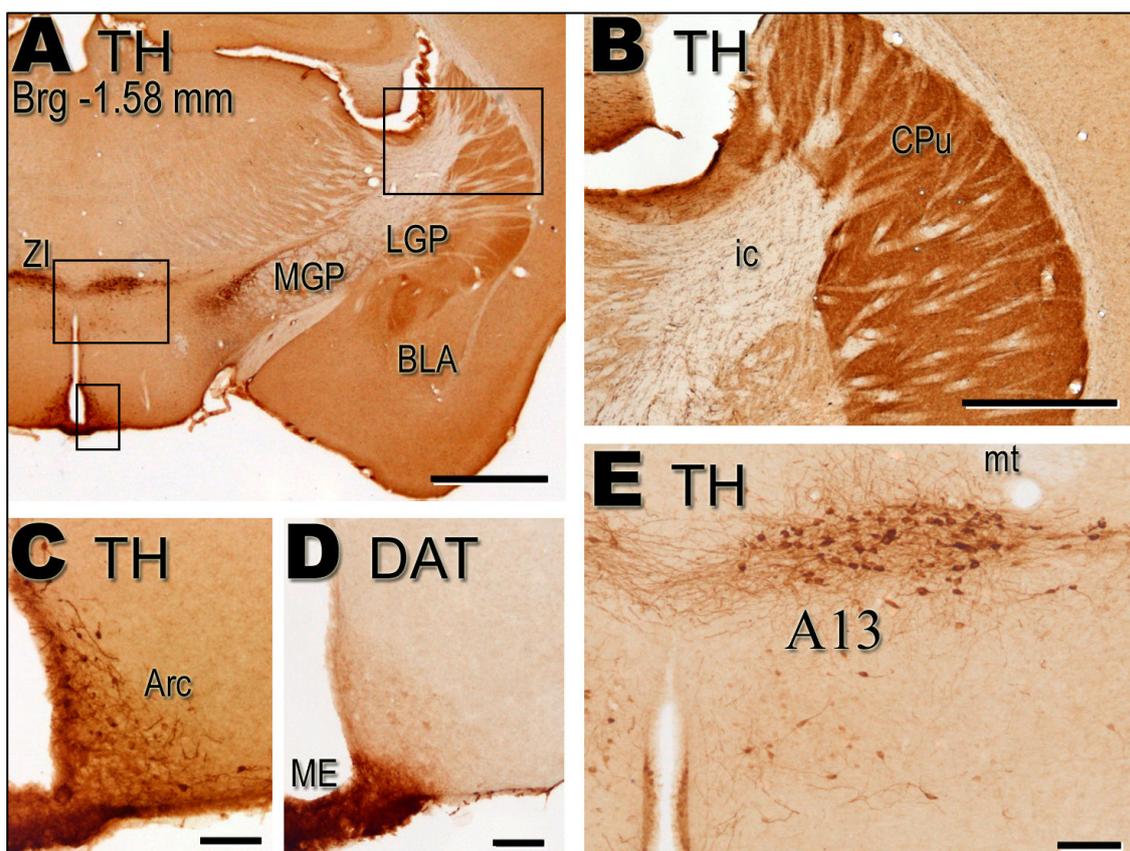
Con esta excepción, en el prosencéfalo no encontramos neuronas claramente inmunorreactivas para DAT, si bien se observan numerosas agrupaciones de células TH-ir, que coincidían a grandes rasgos con la descripción clásica de los grupos aminérgicos del prosencéfalo. Así, el grupo de neuronas TH-ir del PAG se extiende hacia el tálamo posterior, en donde se observa un pequeño grupo de neuronas TH-ir a nivel del núcleo subparafascicular talámico (SPF) y, más rostralmente, alrededor del tracto mamillo-talámico. Esta población celular debe constituir el grupo A11 del ratón (Fig. 1.7B)

El grupo A12 queda bien delimitado en el núcleo arqueado del hipotálamo (Arc) que es claramente TH-ir Fig. 1.8A, C-D). Sin embargo, con la inmunohistoquímica del DAT utilizando tiempos de reacción largos se pueden intuir los perfiles de algunos somas (ver Fig. 1.8 D). Llama también la atención la fuerte reacción TH y DAT en la



**Figura 1.7.** Fotomicrografías digitales de secciones transversales del cerebro de ratón a un nivel antero-posterior de -2.06 mm desde Bregma. **A**, **B** y **C** muestran la inmunohistoquímica para la tirosina hidroxilasa (TH). **D** muestra la inmunohistoquímica para el transportador de la dopamina (DAT). En **B** y **C** vemos las neuronas TH-ir respectivamente del grupo aminérgico A11 y las neuronas TH-ir del hipotálamo periventricular. En **D** vemos la inervación dopaminérgica en la amígdala. Bc: **A**: 1 mm. **B** y **C**: 100  $\mu$ m. **D**: 500  $\mu$ m.

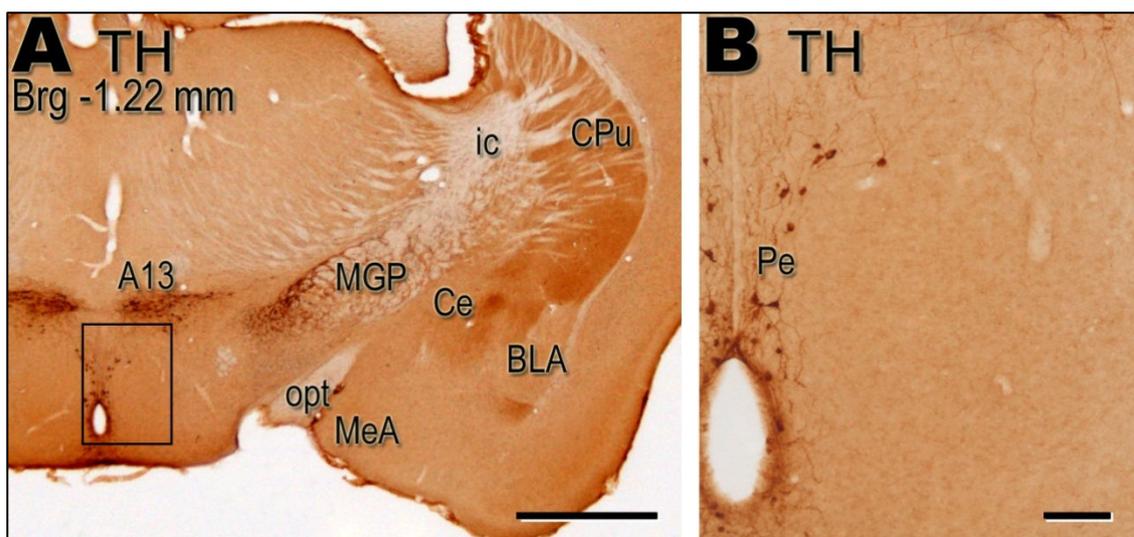
eminencia media (ME, Fig. 1.8A, C-D). El grupo A13 está formado por una población compacta de células TH-ir situada entre la zona incerta (ZI) y el núcleo paraventricular posterior (PaPo; Fig. 1.8E). Este grupo parece mostrar continuidad con el A11, a través de una población más dispersa de células TH-ir localizadas en el núcleo reuniens ventral (VRe) e inmediatamente ventrales al tracto mamilotalámico (*mt*) y con el A12 mediante un grupo de neuronas dispersa en el núcleo hipotalámico periventricular (Pe, Fig. 1.9B). El grupo aminérgico 14 del ratón (A14) está formado por células TH-ir situadas en el compartimento periventricular del hipotálamo anterior y preóptico. Estas células se agrupan mayoritariamente en la subdivisión ventral (PaV) y anterior del núcleo paraventricular (PaAP) (Fig. 1.11A, B, en los núcleos periventriculares anterior y preóptico y en la zona subparaventricular (SPa). Como en los casos anteriores, este grupo celular incluye células dispersas adyacentes, como las situadas en el núcleo anterior hipotalámico (AH), en el área preóptica medial (MPA) y, a niveles más anteriores, en el núcleo comisural anterior (AC). También se observan células del A14



**Figura 1.8.** Fotomicrografías digitales de secciones transversales del cerebro de ratón a un nivel antero-posterior de -1.58 mm desde Bregma. **A**, **B**, y **E** muestran la inmunohistoquímica para la tirosina hidroxilasa (TH). **D** muestran la inmunohistoquímica para el transportador de la dopamina (DAT). En **A** visión general. En **B** vemos la innervación TH-ir del CPu. En **C** y **D** vemos el grupo aminérgico A12 y la diferencia de reactividad para ambas inmunohistoquímicas en el Arc y la eminencia media. . En **E** vemos el grupo A13 correspondiente a la zona incerta y PaPo. Bc: **A**: 1 mm. **B**: 500  $\mu$ m. **C** y **D**: 100  $\mu$ m. **E**: 100  $\mu$ m.

desplazadas lateralmente en el área hipotalámica anterolateral (LA, Fig. 1.11B), inmediatamente laterales al núcleo supraquiasmático (Sch).

El último grupo aminérgico hipotalámico clásico es el grupo A15, formado por neuronas TH-ir adyacentes al grupo A14 pero situadas más lateralmente, en los compartimentos medial y lateral del hipotálamo preóptico y anterior. El núcleo A15 se suele subdividir en dos porciones, dorsal (A15d) y ventral (A15v) respectivamente. El A15d se identifica con relativa facilidad en nuestras preparaciones como un grupo más o menos compacto situado bajo la comisura anterior, en y alrededor del núcleo anterodorsal preóptico (ADP; Tillet, 1994) (Fig 1.12 A, C). El A15v se describe en la bibliografía de rata (van Vulpén *et al.*, 1999) y ratón (Tillet, 1994), como un grupo de células TH-ir localizadas en las inmediaciones del núcleo supraóptico (SO). En nuestro material esta región apenas presenta neuronas inmunoreactivas que, además, aparecen poco marcadas (Fig. 1.10B).

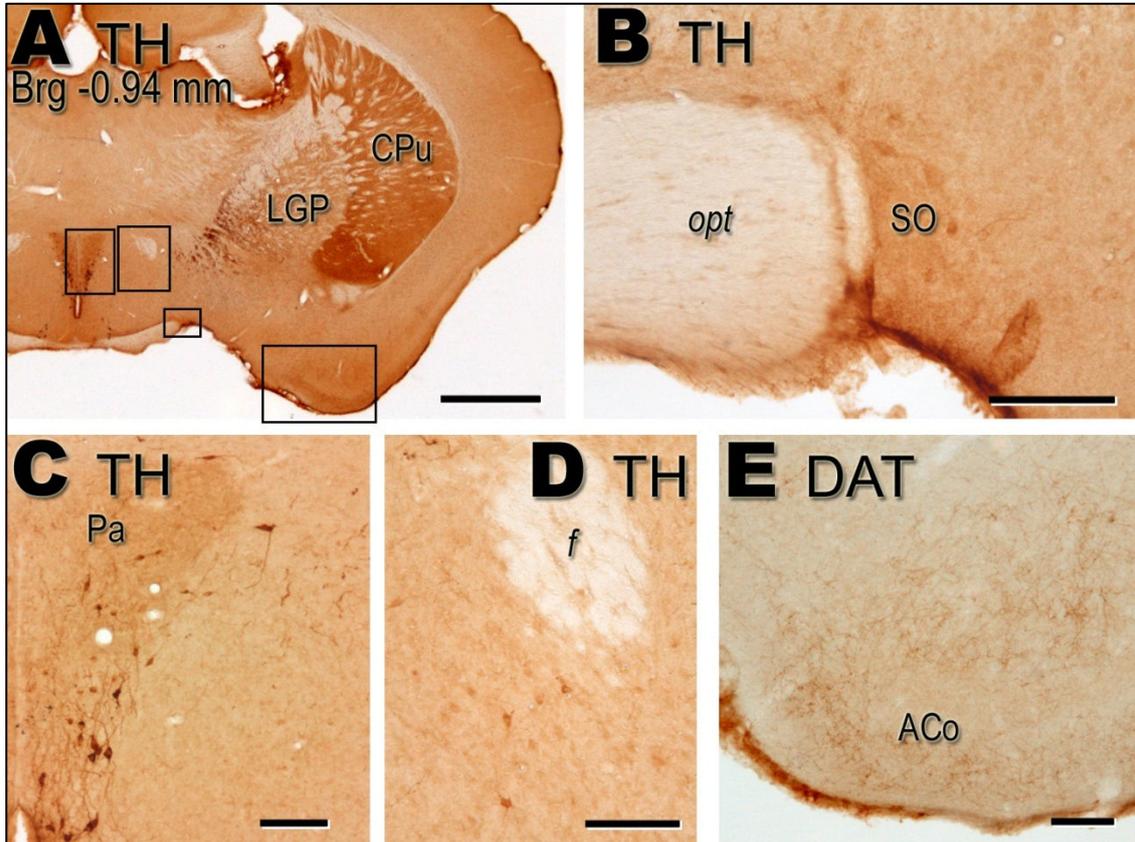


**Figura 1.9.** Fotomicrografías digitales de secciones transversales del cerebro de ratón a un nivel antero-posterior de -1.22 mm desde Bregma. **A** y **B** muestran la inmunohistoquímica para la tirosina hidroxilasa (TH). En **A** visión general. Nótese la fuerte inervación de la amígdala estriatal. En **B** vemos la presencia de neuronas TH-ir en el Pe, haciendo de nexo entre los grupos **A12** y **A13**. **A**: 1 mm. **B**: 100  $\mu$ m.

A esta descripción conviene añadir un grupo celular que no suele describirse con claridad en la literatura neuroanatómica, constituido por una población más bien dispersa de células tenuemente inmunorreactivas para la TH situadas mayoritariamente en el núcleo dorsomedial hipotalámico (DMH). Si bien este grupo puede parecer una extensión caudal de las células del grupo A14 o una extensión ventral del grupo A13, por su morfología (células relativamente pequeñas), localización en el compartimento medial y características tintoriales (menor intensidad de tinción con la inmunohistoquímica de TH) este grupo neuronal es claramente diferenciable de los grupos A13 y A14. Igualmente, otro grupo de células TH-ir no incluido en la clasificación tradicional es el situado en el núcleo supramamilar (SuM, Fig 1.5D). A pesar de su cercanía al grupo A10 (VTA), por su morfología celular y su localización características estas células se suelen considerar un grupo separado del A10 (Ruggiero *et al.*, 1984).

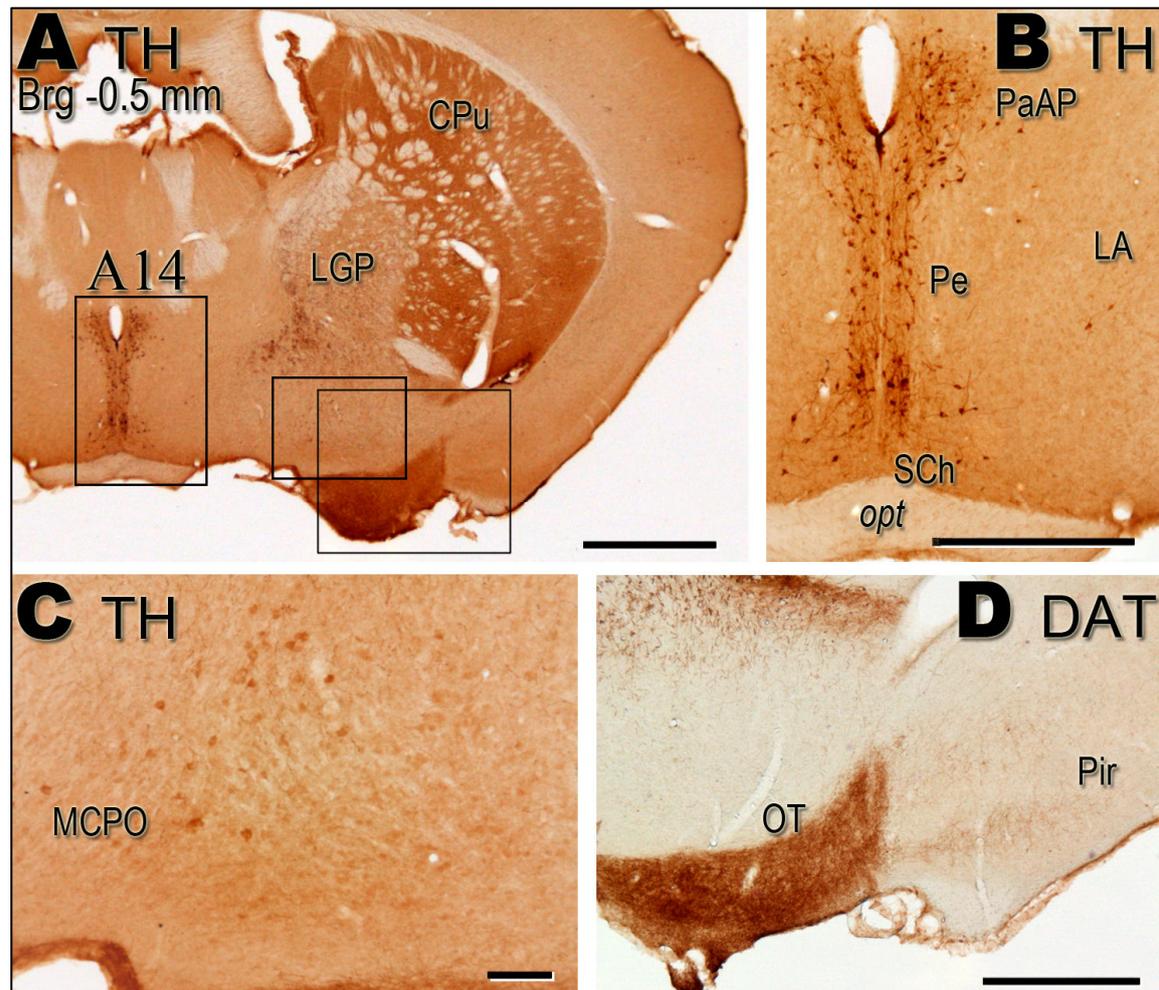
Ya en el límite con los hemisferios cerebrales telencefálicos, se observan neuronas tenuemente marcadas en el área preóptica lateral (LPO) y en el núcleo preóptico magnocelular (MCPO, Fig. 1.11A, C). Igualmente algunos centros del telencéfalo muestran poblaciones dispersas de células marcadas (TH-ir) como la división medial del núcleo de la *stria terminalis* (BSTM), en sus subdivisiones anterior, posterior y ventral. También observamos células TH-ir dispersas en otros lugares del telencéfalo como en la corteza piriforme (Pir) anterior (Fig 1.17D), en donde se sitúan mayoritariamente en la capa plexiforme externa junto al tracto olfativo lateral. Aun más rostralmente el núcleo

olfativo anterior muestra una población TH-ir de características similares a las del Pir. Además observamos algunas células inmunoteñidas dispersas en el tubérculo olfativo (OT) lateral anterior, en donde se encuentran inmersas en el denso entramado de fibras TH-ir (Fig 1.17C).



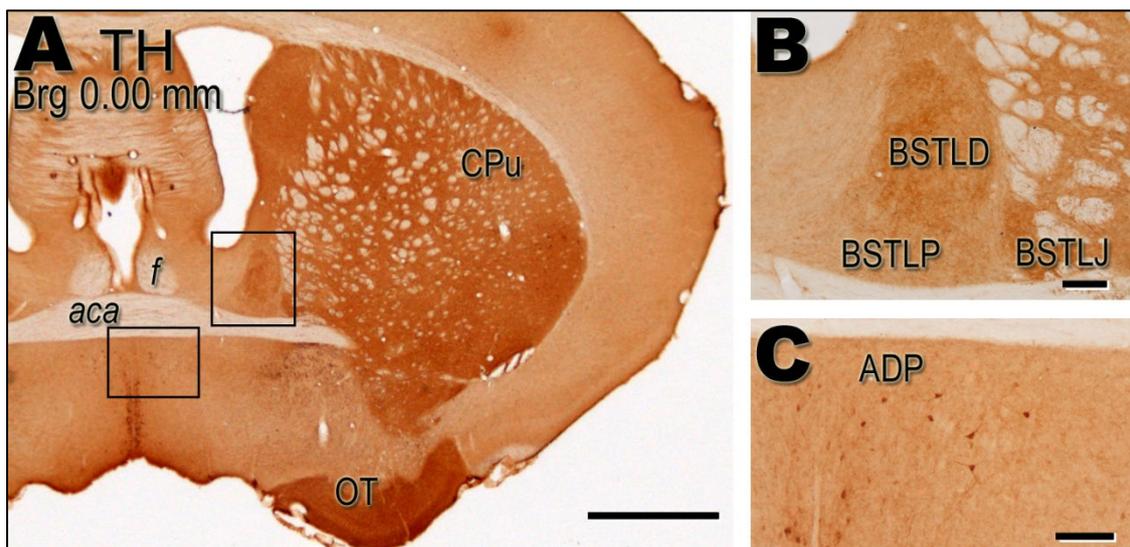
**Figura 1.10.** Fotomicrografías digitales de secciones transversales del cerebro de ratón a un nivel antero-posterior de -0.94 mm desde Bregma. **A, B, C** y **D** muestran la inmunohistoquímica para la tirosina hidroxilasa (TH). **E** muestran la inmunohistoquímica para el transportador de la dopamina (DAT). En **A** visión general. Barra de calibración (Bc) **A**: 1 mm. En **B** vemos la presencia de neuronas TH-ir débilmente marcadas en el SO. Bc: 100  $\mu$ m. En **C** y **D** vemos la presencia de neuronas TH-ir en el núcleo paraventricular hipotalámico (Pa) y en el hipotálamo lateral, bajo el fornix. Bc: 100  $\mu$ m. En **E** vemos los campos de terminación axonal dopaminérgicos en la amígdala cortical. Bc: 100  $\mu$ m.

Por último, numerosas células periglomerulares del bulbo olfativo son claramente TH-ir, y constituyen el grupo aminérgico 16 (A16). Además, encontramos unas pocas neuronas TH-ir en el bulbo olfativo accesorio (AOB), pero su número es muy bajo y no llegan a delimitar los glomerulos. Como las células TH-ir del hipotálamo, las células periglomerulares no muestran DAT o lo hacen a un nivel apenas detectable inmunohistoquímicamente. También encontramos alguna neurona TH-ir en la capa plexiforme externa o muy cercana a la capa de células mitrales, en donde tampoco aparecen células inmunorreactivas para el DAT (Fig. 1.18).



**Figura 1.11.** Fotomicrografías digitales de secciones transversales del cerebro de ratón a un nivel antero-posterior de -0.5 mm desde Bregma. **A**, **B** y **C** muestran la inmunohistoquímica para la tirosina hidroxilasa (TH). **D** muestran la inmunohistoquímica para el transportador de la dopamina (DAT). En **A** visión general. Barra de calibración (Bc) **A**: 1 mm. En **B** vemos la presencia de neuronas TH-ir alrededor del tercer ventrículo y en menor medida en el SCh y LH. Bc: 500  $\mu$ m. En **C** vemos la presencia de neuronas TH-ir débilmente marcadas en el MCPO. Bc: 100  $\mu$ m. En **D** vemos la inervación dopaminérgica densa del tubérculo olfatorio, junto a una inervación notablemente más débil en la corteza piriforme ventral. Bc: 500  $\mu$ m.

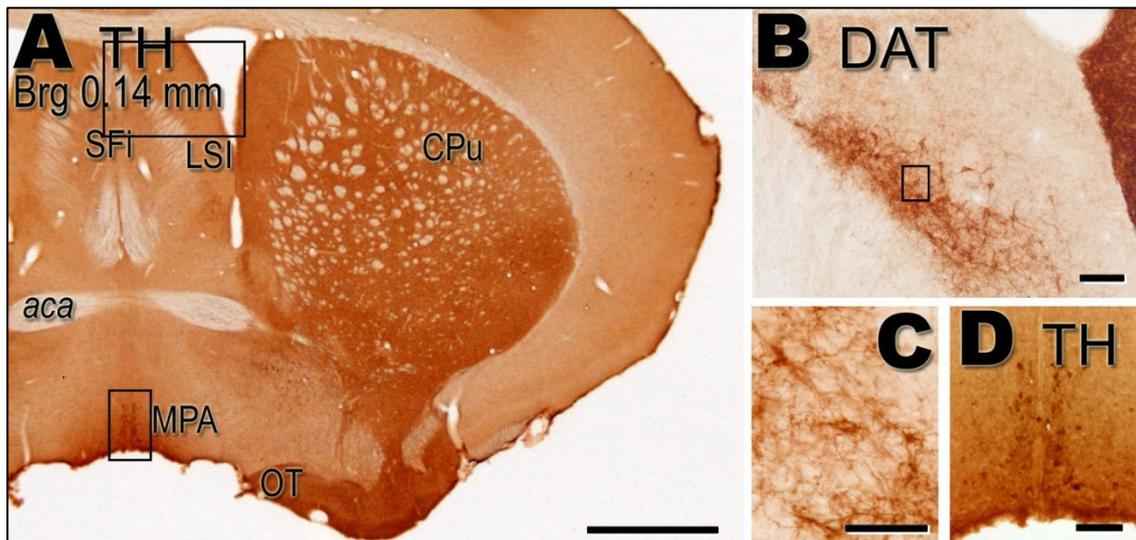
## 2. Distribución de fibras inmunoreactivas para TH y DAT en los hemisferios telencefálicos del ratón



**Figura 1.12.** Fotomicrografías digitales de secciones transversales del cerebro de ratón al nivel de Bregma. **A**, **B** y **C** muestran la inmunohistoquímica para la tirosina hidroxilasa (TH). En **A** visión general. Barra de calibración (Bc) **A**: 1 mm. En **B** vemos la presencia de fibras TH-ir en el BST, abundante en sus subdivisiones laterodorsal y lateral yuxtacapsular, y moderada en la división lateroposterior. Bc: 100  $\mu$ m. En **C** vemos la presencia de neuronas TH-ir marcadas en el ADP. Bc: 100  $\mu$ m.

En general, y contrariamente a lo que hemos visto con la inmunoreactividad en somas, las fibras inmunoreactivas para la TH y DAT presentan una distribución prácticamente idéntica en los hemisferios cerebrales del ratón. Para la descripción de las mismas comenzaremos por las fibras inmuno-reactivas en estructuras corticales (isocortex, cortex piriforme, hipocampo y bulbos olfativos), seguiremos con la innervación de centros subcorticales (septum, estriado y pálido) y finalmente describiremos la inmunoreactividad en la amígdala, de naturaleza mixta palio-subpalial, incluida la amígdala extendida.

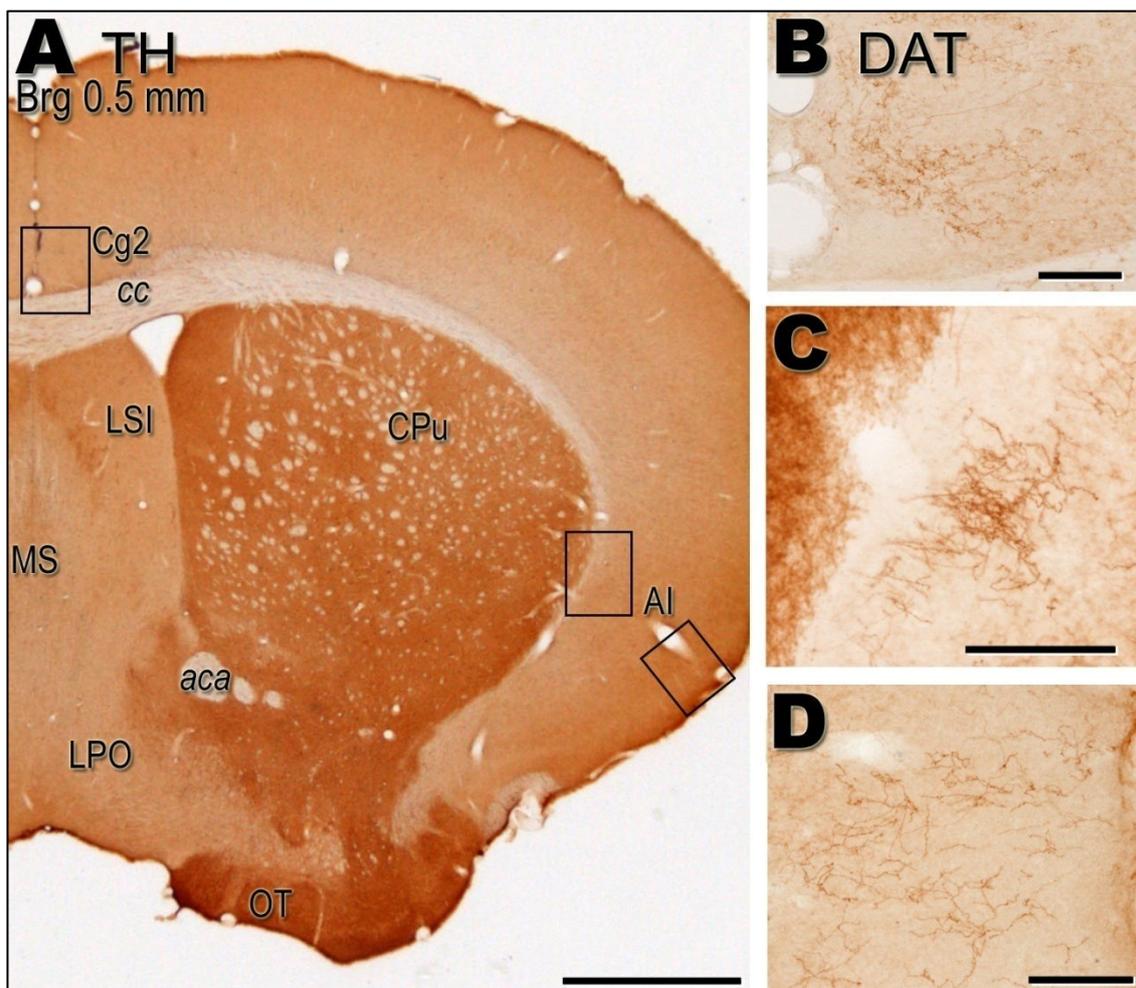
A nivel cortical, es el cortex medial del polo frontal el que mayor densidad de fibras inmunoreactivas presenta. Aparentemente, las fibras dopaminérgicas alcanzan el cortex medial ascendiendo desde el campo terminal del núcleo septo-hipocámpico por delante de la rodilla del cuerpo caloso. En relación con estas fibras, se observa un tracto fibrilar que recorre medialmente (superficialmente) la *taenia tecta* dorsal (DTT) entrando así en la capa 1 del cortex frontal, en donde inerva las capas superficiales (capa 1 y, en mucha menor medida la capa 2-3) de las áreas peduncular dorsal (DP), orbital medial (MO), infralímbica (IL), prelímbica (PrL) y cingular primaria (Cg1). Otro grupo de fibras reactivas ingresa en el cortex prefrontal medial a través de la DTT, pero lo hace a través de sus capas profundas y del cíngulo dando lugar a un campo terminal



**Figura 1.13.** Fotomicrografías digitales de secciones transversales del cerebro de ratón a un nivel antero-posterior de 0.26 mm desde Bregma. **A** y **D** muestran la inmunohistoquímica para la tirosina hidroxilasa (TH). **B** y **C** muestran la inmunohistoquímica para el transportador de la dopamina (DAT). En **A** visión general. Barra de calibración (Bc) **A**: 1 mm. En **B** vemos la presencia abundante de fibras TH-ir en el LSI. Bc: 100  $\mu$ m. En **C**, detalle de las fibras organizadas alrededor de una neurona inmunonegativa formando una terminación en cesto. Bc: 50  $\mu$ m. En **D** vemos la presencia de neuronas TH-ir marcadas en el hipotálamo más anterior. Bc: 100  $\mu$ m.

profundo en las áreas DP, IL, PrL y Cg1. Desde este campo terminal profundo algunas fibras ascienden hacia las capas superficiales, inervando las intermedias, en el IL, en el cortex motor secundario (M2) y en menor medida en Cg1 (Fig. 1.17A,B). Más caudalmente, se aprecian algunas fibras inmunoreactivas en la capa molecular del indusium griseum pregenual (IG) y, más dorsalmente, en las dos áreas del cortex cingular, sobre todo en Cg2 (Fig. 1.14A,B). A estos niveles, la inervación de Cg2 se localiza sobre todo en las capas 1 y 3, aunque las restantes capas también muestran fibras marcadas. Por su parte, M2 muestra una baja densidad de fibras localizadas sobre todo en las capas infragranulares y en la capa molecular.

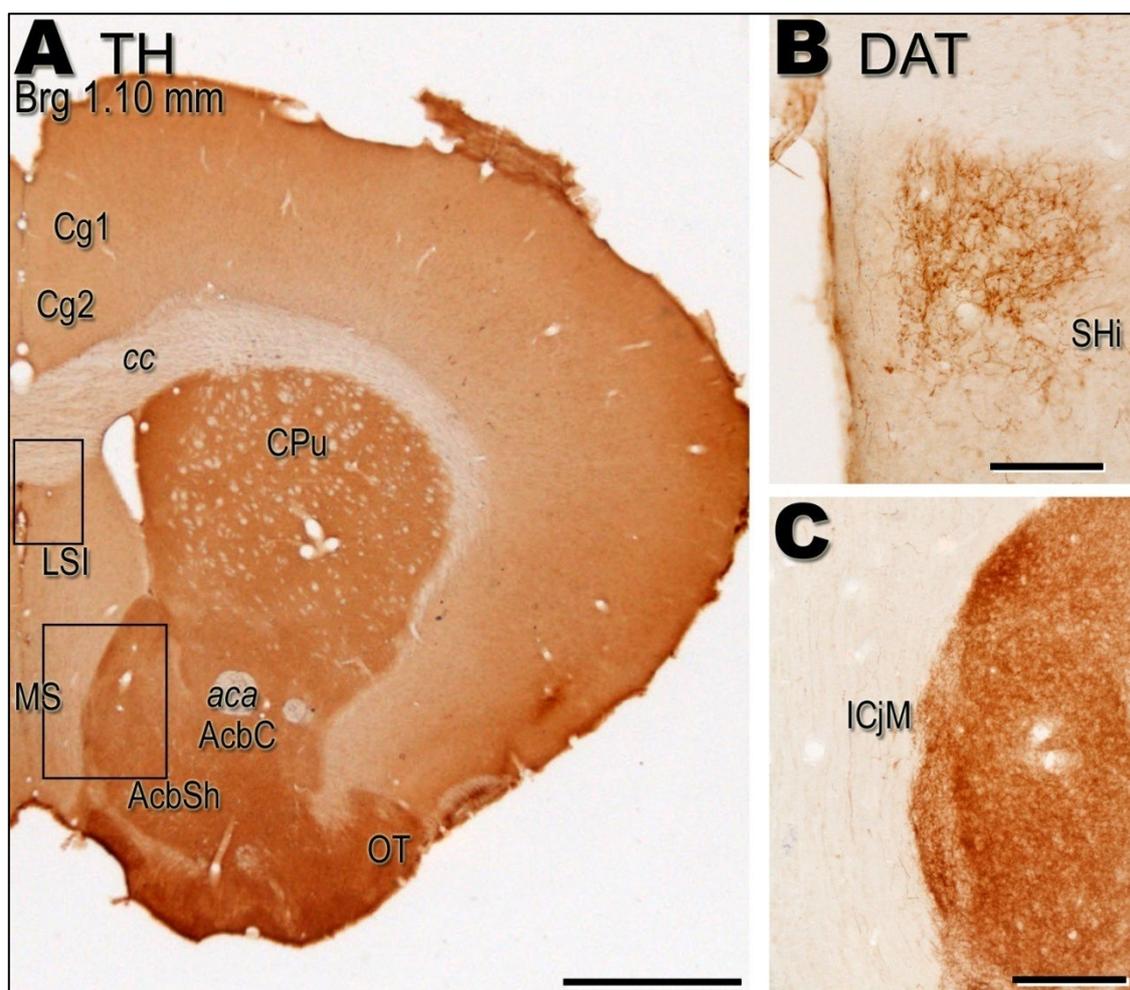
Igualmente, se observan campos terminales inmunoreactivos en áreas corticales temporo-parietales, a diversos niveles anteroposteriores. Así, en todos los niveles anteroposteriores del cortex insular se aprecian fibras inmunoreactivas, desde los niveles frontales (que según Paxinos y Franklin se corresponden con la corteza orbital dorsolateral, DLO) hasta los más caudales. Éstas se concentran en el área insular agranular (AIV y AID; incluyendo sus niveles posteriores, AIP) y, en menor medida, en la disgranular (DI). En ambas áreas, las fibras TH-ir y DAT-ir inervan preferentemente las capas más superficiales (incluidas la capa molecular y la capa celular 2-3) y la capa 6 (Fig. 1.14A,C,D). Es importante reseñar que el claustrum presenta una inervación más pobre en fibras inmunoreactivas. Por su parte, a niveles más caudales, encontramos fibras reactivas para TH y DAT las áreas corticales ectorrinal (Ect, Fig. 1.4H) y



**Figura 1.14.** Fotomicrografías digitales de secciones transversales del cerebro de ratón a un nivel antero-posterior de 0.5 mm desde Bregma. **A** muestran la inmunohistoquímica para la tirosina hidroxilasa (TH). **B**, **C** y **D** muestran la inmunohistoquímica para el transportador de la dopamina (DAT). En **A** visión general. Barra de calibración (Bc) **A**: 1 mm. En **B** vemos la presencia de fibras TH-ir en las capas superficiales de Cg2. Bc: 100  $\mu$ m. En **C** y **D** vemos la presencia de fibras TH-ir en las capas profundas y superficiales de AI. Bc: 100  $\mu$ m.

entorrinal medial (MEnt, Fig. 1.4G) y lateral (LEnt), y, en menor medida en la corteza perirrinal (PRh). En todas ellas, las fibras reactivas se concentran en las capas profundas.

En el paleocortex, encontramos fibras inmunoreactivas que parecen extenderse lateralmente desde el OT caudal hacia la amígdala cortical anterior y el cortex piriforme. En ambas estructuras se observa un campo terminal moderadamente denso en las capas I y III, con presencia de fibras también en la capa II. En la capa I del Pir la mayoría de fibras inmunoreactivas se sitúan en la subcapa Ib. A niveles más anteriores, el campo terminal de la Pir se restringe a su zona más ventral, adyacente al OT (Fig. 1.11D). Por su parte, las distintas divisiones del núcleo endopiriforme (DEn, VEn) presentan una baja densidad de fibras marcadas. A nivel del bulbo olfativo, encontramos fibras intensamente inmunoreactivas para la TH en el interior de glomérulos, en clara

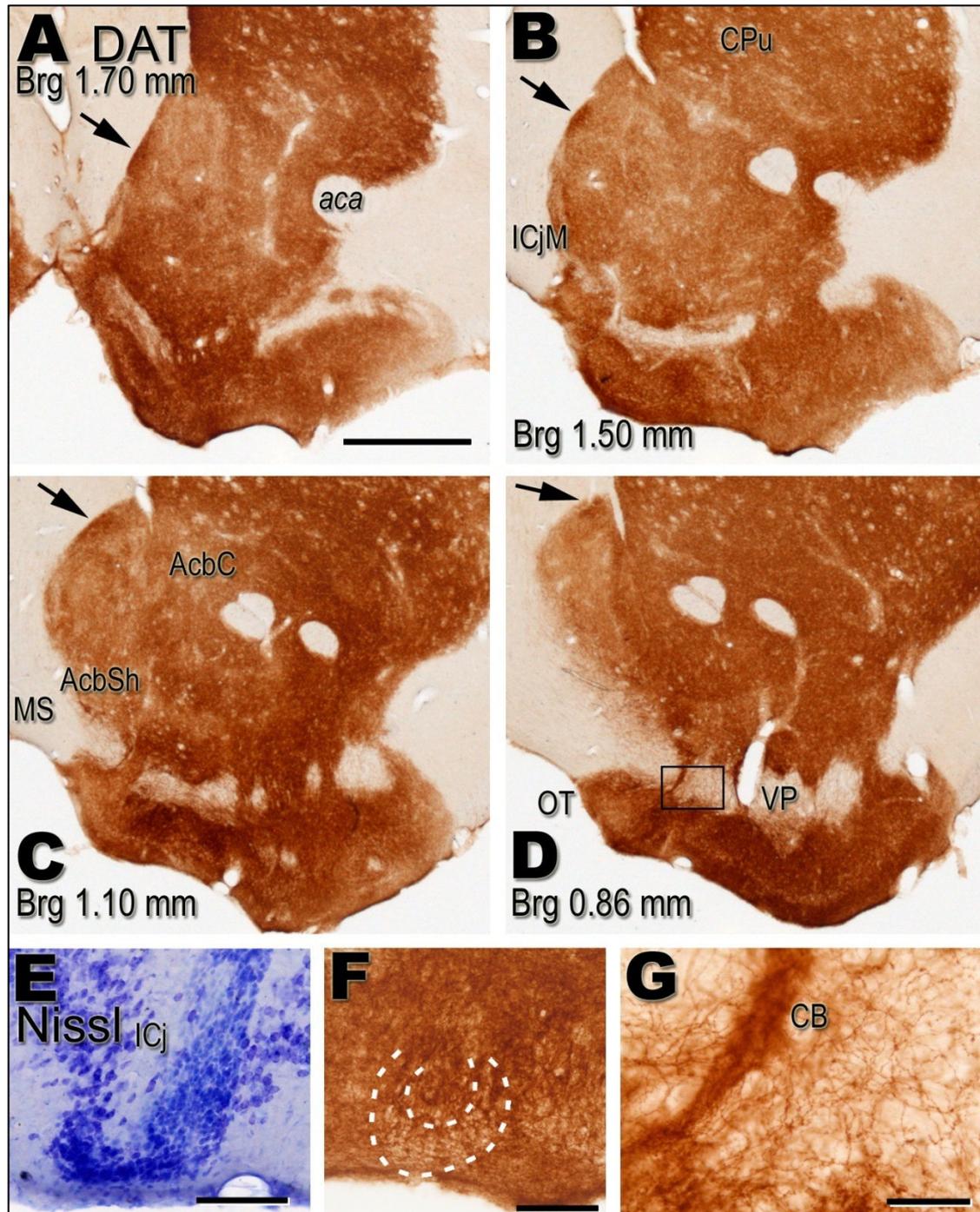


**Figura 1.15.** Fotomicrografías digitales de secciones transversales del cerebro de ratón a un nivel antero-posterior de 1.1 mm desde Bregma. **A** muestran la inmunohistoquímica para la tirosina hidroxilasa (TH). **B** y **C** muestran la inmunohistoquímica para el transportador de la dopamina (DAT). En **A** visión general. Barra de calibración (Bc) **A**: 1 mm. En **B** vemos la presencia de fibras TH-ir en el SHi. Bc: 100  $\mu$ m. En **C** vemos la invasión de fibras TH-ir en el ICjM y el AcbShM. Bc: 200  $\mu$ m.

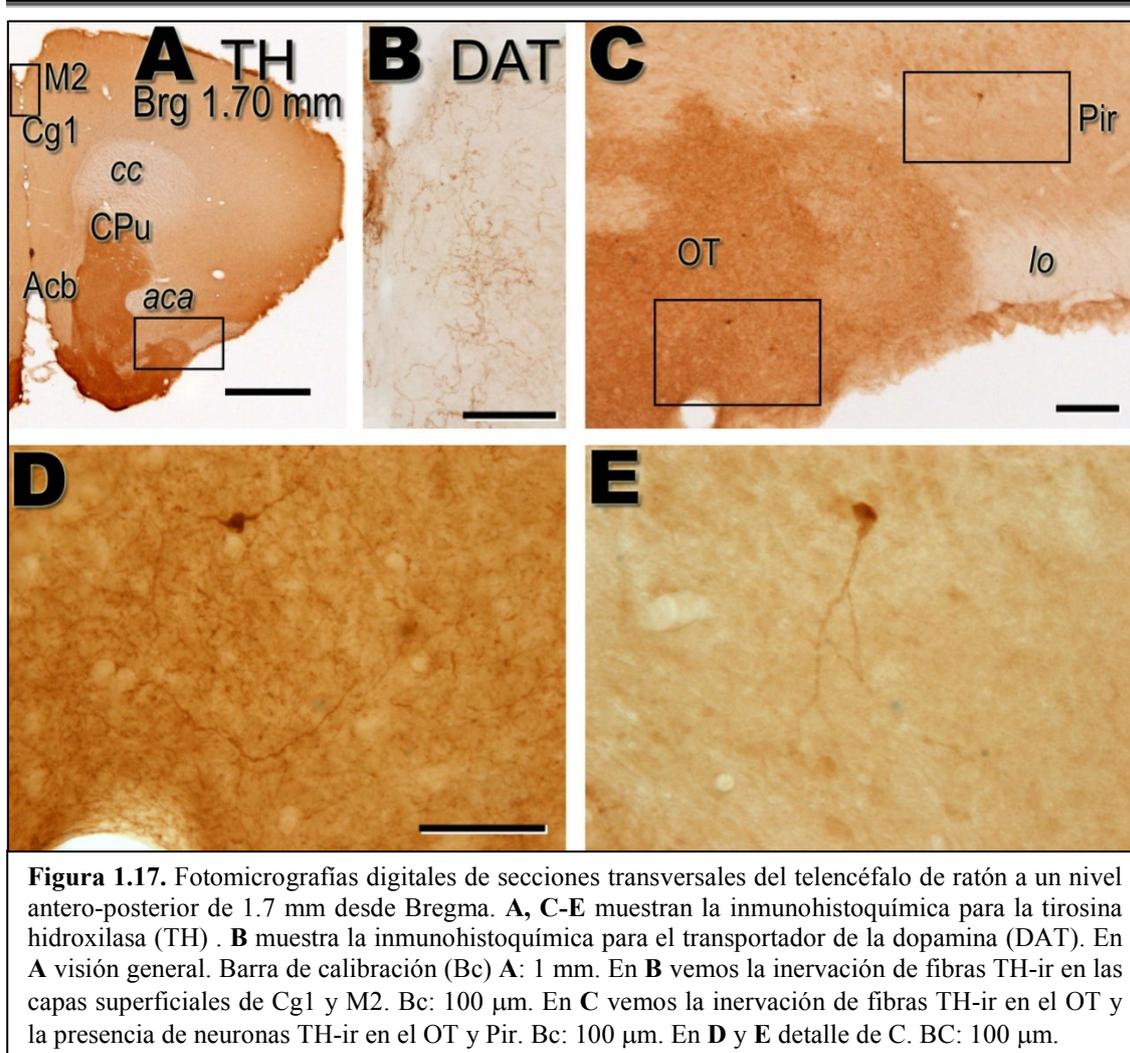
asociación con los somas inmunoreactivos periglomerulares (Fig. 1.18). Desde la capa glomerular, algunas fibras TH-ir se extienden a la capa plexiforme externa. Por el contrario, la inmunohistoquímica para DAT muestra una tinción de los glomérulos tenue, que sólo es apreciable cuando la reacción inmunohistoquímica se alarga bastante (Fig. 1.18B). Sorprendentemente, el hipocampo y las áreas parahipocampales apenas muestran fibras inmunoreactivas para TH y DAT.

La mayor concentración de fibras TH- y DAT-ir del telencéfalo se encuentra en los diversos territorios del estriado. Así, el *caudatus putamen* (CPu) muestra una elevada densidad, bastante homogénea, de fibras inmunoreactivas. Por su parte, el estriado ventral también muestra una invasión dopaminérgica destacable pero heterogénea. En el área central del Acb (*core* en inglés, AcbC) la densidad de fibras TH- y DAT-ir es bastante alta, similar a la del CPu, mientras que el área periférica del

Acb (*shell* en inglés, AcbSh) muestra zonas con gran densidad de fibras dopaminérgicas y otras de densidad claramente menor. En el límite entre el Acb y el septum destaca una 'mancha' (área de densa inmunoreactividad), que aparece ventralmente a niveles anteriores (ver flecha en Fig. 1.16 A-D) y se desplaza hacia zonas más dorsales a

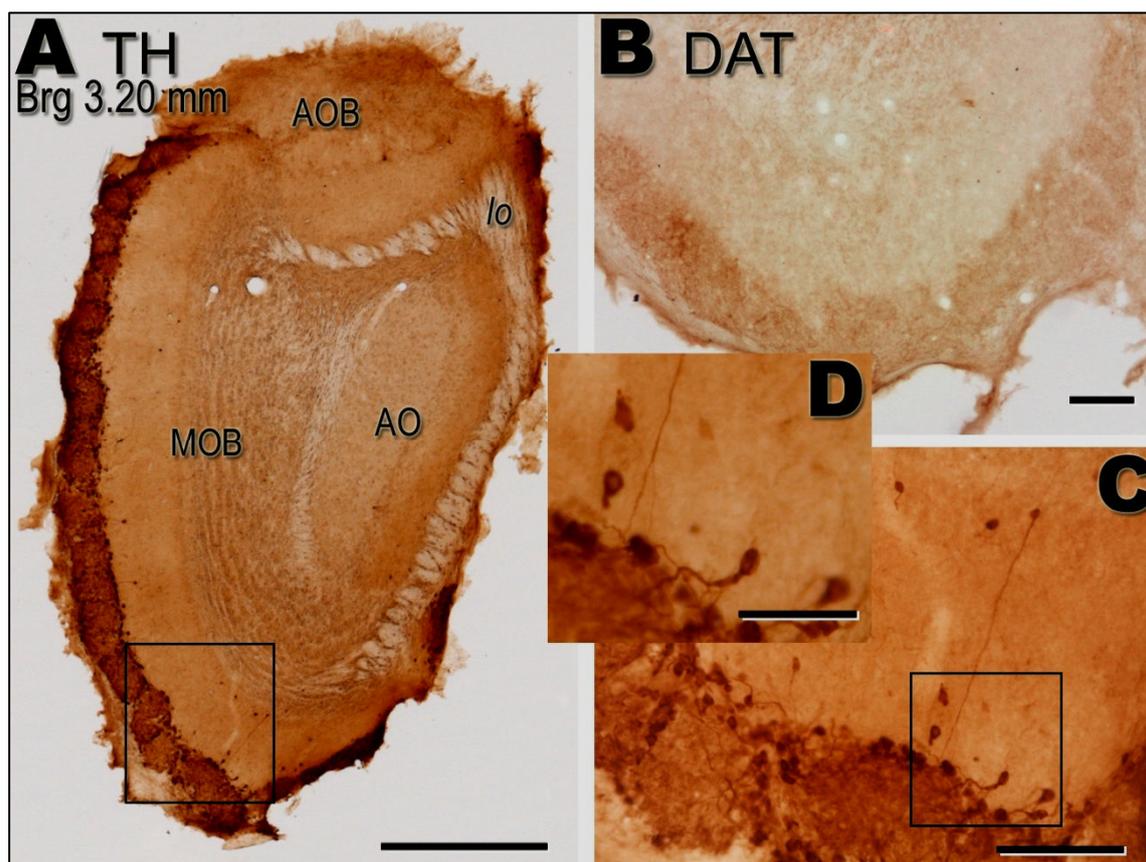


**Figura 1.16.** Fotomicrografías digitales de secciones transversales del Acb de ratón a diferentes niveles desde anterior a posterior. **A-D, F, G** muestran la inmunohistoquímica para el transportador de la dopamina (DAT). **E** muestra una tinción de Nissl. En **A-D** visión general del Acb, con las heterogeneidades del AcbSh, los ICj y los CB uniendo Acb y OT. Noté (indicado por una flecha) el aumento de densidad de fibras DAT-ir encima del ICjM. Barra de calibración (Bc) **A-D**: 1 mm. En **E** vemos la citoarquitectura de un ICj. Bc: 100  $\mu$ m. En **F** vemos la invasión de fibras DAT-ir en el ICj, señalado por líneas discontinuas el estrato granular. Bc: 100  $\mu$ m. En **G** vemos la invasión de fibras DAT-ir en el VP y los CB que unen el OT y AcbSh. Bc: 50  $\mu$ m.



**Figura 1.17.** Fotomicrografías digitales de secciones transversales del telencéfalo de ratón a un nivel antero-posterior de 1.7 mm desde Bregma. **A, C-E** muestran la inmunohistoquímica para la tirosina hidroxilasa (TH). **B** muestra la inmunohistoquímica para el transportador de la dopamina (DAT). En **A** visión general. Barra de calibración (Bc) **A**: 1 mm. En **B** vemos la inervación de fibras TH-ir en las capas superficiales de Cg1 y M2. Bc: 100  $\mu$ m. En **C** vemos la inervación de fibras TH-ir en el OT y la presencia de neuronas TH-ir en el OT y Pir. Bc: 100  $\mu$ m. En **D** y **E** detalle de C. BC: 100  $\mu$ m.

medida que se avanza en dirección posterior. Así, a niveles intermedios ocupa una posición inmediatamente dorsal al islote de Calleja magno o mayor (ICjM) (Fig. 1.16 B y C) y a niveles caudales alcanza, prácticamente, el sulco ventral del ventrículo lateral (Fig. 1.16 D). El AcbSh medial, en general, muestra una densidad relativamente reducida de fibras reactivas, sobre todo a niveles caudales, mientras que en las partes ventral y lateral del AcbSh la densidad es mayor y con ciertas heterogeneidades. Por el contrario, los puentes celulares del estriado ventral (*cell bridges* en inglés, CB) y el tubérculo olfativo (OT) muestran una inervación dopaminérgica muy densa que, en el caso del OT, se extiende en todos sus estratos (Fig. 1.16). Por último, los islotes de Calleja (ICj) muestran un patrón de inervación dopaminérgica peculiar, en el que el estrato granular aparece con densidad relativamente menor de fibras mientras que la cara externa y, sobre todo, la cavidad interna de los ICj (la cara medial del ICjM) parece presentar una inervación especialmente densa (Fig. 1.15C). No obstante, esto puede ser un efecto derivado de la elevada densidad celular del estrato granular (ver Fig. 1.16 F).



**Figura 1.18.** Fotomicrografías digitales de secciones transversales del bulbo olfativo de ratón a un nivel antero-posterior de 3.2 mm desde Bregma. **A, C-D** muestran la inmunohistoquímica para la tirosina hidroxilasa (TH). **B** muestra la inmunohistoquímica para el transportador de dopamina (DAT). En **A** se puede observar la gran cantidad de neuronas TH-ir en la capa glomerular del MOB. En contraste, en el AOB apenas se observan unas pocas. Barra de calibración (Bc) A: 1 mm. En **B** se observa la escasa marca obtenida con el anticuerpo anti-DAT en los glomérulos. Bc: 100  $\mu$ m. En **C**, detalle de la inmunoreactividad de neuronas periglomerulares, observándose también algunas neuronas granulares TH-ir. Bc: 100  $\mu$ m. En **D** detalle de C. BC: 50  $\mu$ m.

El septum constituye una estructura eminentemente subpalial que incluye territorios estriatales (el complejo septal lateral que constituye el estriado medial) y palidales (septum medial y núcleo de la banda diagonal; Swanson & Risold, 1999; Lanuza *et al.*, 2002; Lanuza & Martínez-García, 2009). En el septum lateral encontramos fibras TH-ir y DAT-ir dispersas y con una densidad mucho menor que en el estriado dorsal y ventral. Esta inervación está compuesta por fibras dispersas localizadas en las subdivisiones intermedia (LSI, y en menor medida la ventral, LSV) del núcleo septal lateral. En el LSI se observa una elevada densidad de terminaciones axónicas en cesto alrededor de determinados somas neuronales, que constituye la inervación más patente a niveles caudales, en los que las cestas bordean el núcleo septofimbrial (Fig. 1.13A-C). Además, también se observa una densidad alta o moderada de fibras reactivas marcadas, que no forman cestas, en el núcleo septohipocampal (SHi) (Fig. 1.15A-B). Desde el SHi algunas fibras parecen entrar en el

núcleo olfativo anterior, cuyas divisiones ventrales (AOV), medial (AOM) y dorsal (AOD) muestran una densidad baja de fibras marcadas en algunas preparaciones de TH.

A nivel palidal, la densidad de fibras inmunoreactivas es mucho menor que en el estriado. Así, el globo pálido lateral (LGP) muestra unas pocas fibras reactivas con algunos botones, mientras que en la porción medial del globo pálido (MGP) tan solo aparecen fibras de paso (sin botones). Por su parte, el pálido ventral (VP) si que muestra una baja densidad de fibras varicosas (Fig. 1.16G). A poco aumento, sin embargo, el VP parece desprovisto de marca por contraste con la grandísima densidad de la innervación de las estructuras estriatales circundantes, sin embargo, las fibras reactivas presentes muestran botones sinápticos que parecen coincidir en varias ocasiones con los grandes núcleos de las neuronas palidales. Por último, el septum medial (MS) y el núcleo de la banda diagonal (DB), que de acuerdo con Swanson y Risold (1999) constituyen el pálido medial, presentan una muy baja densidad de fibras DAT-ir, si bien la inmunohistoquímica para TH revela una densidad algo mayor de fibras reactivas.

En cuanto a la amígdala encontramos innervación DAT-ir y TH-ir tanto en sus porciones paleales (complejo basolateral y núcleos corticales) como en las subpaleales (amígdala central, medial y núcleo de la stria terminalis). En la amígdala paleal, la mayor densidad de fibras reactivas se encuentra en la subdivisión posterior del núcleo basolateral de la amígdala (BLP) (Fig. 1.6D-F), desde la que las fibras reactivas se extienden al área de transición amígdalo-piriforme (APir), en donde la innervación es más escasa. También presenta una innervación moderadamente densa la porción anterior del núcleo basolateral (BLA) y la división dorsolateral de la amígdala lateral (LaDL), mientras que las restantes divisiones de la amígdala lateral (LaVL y LaVM) muestran una innervación menor (Fig. 1.7D). En la división cortical de la amígdala paleal encontramos un denso campo terminal reactivo en la zona de transición cortico-amígdalina (CxA) que se extiende medialmente hacia el núcleo amígdalino cortical anterior (ACo, Fig. 1.10D), en donde la innervación es escasa, y al núcleo del tracto olfativo lateral (LOT), que muestra una densidad moderada de fibras reactivas. Como hemos descrito más arriba, desde la CxA las fibras ingresan en el Pir. En todos estos centros de naturaleza paleocortical, la innervación presenta un patrón similar, según el cual las fibras se concentran en la capa 1b y en la capa 3 (celular interna), siendo más escasas en la capa 2 (celular externa) y aun más escasa en la capa 1a.

La innervación de la amígdala también incluye una gran densidad de fibras TH-ir y DAT-ir sobre las distintas masas intercaladas, tanto de las inmersas en la cápsula

amigdalina, como de aquellas situadas en los territorios amigdalinos anteriores, junto al núcleo intersticial del fascículo posterior de la comisura anterior (IPAC). Además, la innervación dopaminérgica se extiende a territorios amigdalinos claramente subpaliales. Así, las fibras reactivas del CPu caudal parecen extenderse hacia al área de transición amigdaloesstriatal (AStr) y la amígdala central (Ce). En esta última, la innervación es claramente heterogénea: la subdivisión capsular (CeC) apenas muestra fibras TH- y DAT-ir, mientras que en la división lateral (CeL) se observa una densa innervación dopaminérgica (Fig. 1.7D). Por su parte, la división medial de la amígdala central (CeM) presenta una innervación moderada con excepción de su subdivisión anteroventral, en la que la densidad de fibras es mucho menor. Por su parte, la amígdala medial (Me) no presenta fibras inmunoreactivas. En el núcleo de la stria terminalis (BST) la inmunoreactividad también es heterogénea. Así, en su porción intraamigdalina (BSTIA) apenas se observan fibras reactivas, y en la porción supracapsular (BSTS) las fibras reactivas se localizan exclusivamente en su parte lateral. En el BST propiamente dicho, la innervación dopaminérgica abarca las divisiones lateral y medial anterior, siendo densa en los núcleos lateral dorsal (BSTLD) (Fig. 1.12B) y quizás en la yuxtacapsular (BSTLJ), moderada en el lateral posterior (BSTLP) y ventral (BSTLV) y escasa en toda la porción anterior del BST medial (BSTMA, BSTMV).

Respecto de la parte sublenticular de la amígdala extendida, el IPAC presenta una densidad muy alta de fibras inmunoreactivas en su división lateral (IPACL) y una densidad moderada en la medial (IPACM). Por su parte, la *substantia innominata* (SI), como otros territorios del pálido caudal, se halla atravesada por gruesas fibras inmunoreactivas que aparentemente no efectúan sinapsis, a la vista de su aspecto liso.

## **Discusión**

### **Distribución de somas dopaminérgicos en mamíferos**

Nuestros datos acerca de la distribución de somas TH-ir coinciden globalmente con los publicados en ratones (Ruggiero *et al.*, 1984) y ratas (Hokfelt *et al.*, 1984). Utilizando técnicas de autofluorescencia, Dahlström y Fuxe (1964) clasificaron los somas catecolaminérgicos en 17 grupos (A1-A17), de los cuales 10 se consideran dopaminérgicos (del A8 al A17). Sin embargo, en nuestro análisis anatómico hemos encontrado muy difícil seguir esta clasificación debido a: 1) que hay clara continuidad entre los diversos grupos aminérgicos; 2) hay células TH-ir cuya localización no coincide con ninguno de los grupos aminérgicos clásicos; 3) en algunos casos las células aminérgicas no parecen constituir un grupo compacto coincidente con los descritos por Dahlström y Fuxe (1964), por lo tanto, nuestros resultados cuestionan esta clasificación.

La continuidad entre los grupos aminérgicos clásicos se aprecia claramente a niveles mesencefálicos, en donde en secciones frontales y sagitales no hay límites claros entre los grupos A9 y A10, ni entre el A8 y A9 (Fig. 1.2). De la misma manera, las células TH-ir periacueductales muestran continuidad con los grupos aminérgicos adyacentes. Así, a nivel pontino, se continúan con el grupo A8 y a nivel periacueductal anterior (por delante de la comisura posterior), muestran continuidad con el grupo A10 (VTA) ventralmente (a través del RLi) y con el grupo A11 (SPF) rostralmente (Fig. 1.2). Del mismo modo, las secciones sagitales revelan una continuidad evidente entre las células del grupo A11 (SPF) y A13 (paraventricular posterior y ZI). Por el contrario, las células TH-ir del grupo A12 (Arc) parecen formar una población compacta y bien delimitada, claramente diferente de las neuronas TH-ir del núcleo dorsomedial hipotalámico (DMH), de morfología bien distinta, de las neuronas del A14 y de las del área supraquiasmática (Fig. 1.2). Por su parte el grupo periventricular del hipotálamo anterior (A14) muestra clara continuidad con el supuesto grupo A15, especialmente con su porción dorsal. Por el contrario, la porción ventral del grupo A15 no muestra continuidad con su porción dorsal, y sus neuronas, adyacentes al SO, presentan morfología y inmunotinción características, que las hacen fácilmente distinguibles de los grupos celulares cercanos (A14 y A15d).

Además, como ya hemos mencionado, nuestros resultados sugieren que el grupo A15 es un artificio, dado que está conformado por una población dorsal (A15d) y una ventral (A15v) que en realidad no tienen relación entre sí, ya que no son contiguas y muestran patrones de inmunoreactividad bien diferentes. Por su parte, el grupo A15d parece la parte anterodorsal del grupo A14, mientras que el grupo A15v constituye un grupo celular independiente sin relación aparente con el A14. Esta incongruencia del sistema de clasificación de las células dopaminérgicas explica que el grupo A15 sea ignorado por algunos autores que han estudiado las poblaciones dopaminérgicas hipotalámicas (Van Den Pol *et al.*, 1984). Como conclusión, nuestros resultados sugieren que la clasificación de Dahlström y Fuxe (1964), aun siendo cómoda en algunos aspectos, es artificiosa y debe ser considerada con reservas.

En segundo lugar, nuestros resultados indican que algunas somas TH-ir no se ubican en ninguno de los grupos clásicos. Es el caso de las somas catecolaminérgicas del SuM y del DMH, tal y como señalaron Ruggiero *et al.* (1984). Del mismo modo, hay somas tenuemente inmunoreactivas para la TH en otras ubicaciones no concordantes con los grupos clásicos tales como el del MCPO (tan sólo descritas en el estriado y cortex de primates, Dubach *et al.*, 1986, 1987; Gaspar *et al.*, 1987; Kuljis *et al.*, 1989; Gouras *et al.*, 1992), el BST (aunque podrían considerarse neuronas desplazadas desde el grupo A15d) y el área olfativa anterior, incluidos el Pir y OT anteriores y el AON. Estas últimas no han sido observadas previamente en roedores adultos intactos, si bien se ha descrito una población que expresa TH transitoriamente durante la segunda semana postnatal en el estriado ventrolateral de la rata (Specht *et al.*, 1981a; 1981b; Berger *et al.*, 1985; Voorn *et al.*, 1988), y en primates adultos (incluyendo humanos; Dubach, 1987, 1994; Porritt *et al.* 2000; Cossette *et al.*, 2005; Tande *et al.*, 2006). Además, se ha visto la aparición de neuronas TH positivas en el estriado de roedores tras lesiones con 6-hidroxidopamina (6-OHDA; Lopez-Real *et al.*, 2003; Jollivet *et al.*, 2004; Darmopil *et al.* 2008), lo que sugiere que el cambio en el entorno ha provocado un cambio en su metabolismo desencadenando un incremento en la expresión de TH como mecanismo compensatorio ante la falta local de DA (Meredith *et al.*, 1999). Parece que se trata de interneuronas locales GABAérgicas que tienen la potencialidad de expresar DA en determinadas circunstancias (Huot & Parent, 2007; Björklund & Dunnett, 2007). En contraposición a esta hipótesis, Darmopil *et al.* (2008) sugieren que se tratan de neuronas de proyección preexistentes, ya que en sus neuronas TH-ir en el estriado después las lesiones con 6-OHDA apenas encuentran colocalización

de marca TH con calretinina (marcador de interneuronas) ni incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU), y en cambio colocalizan con los neuropéptidos encefalina y dinorfina (marcadores de neuronas de proyección). En cualquier caso, nosotros hemos encontrado un remanente de células en el telencéfalo intacto de ratón adulto que expresan TH, como ocurre en otras especies y se suponen Daérgicas (primates y humanos, Dubach *et al.*, 1986; Cossette *et al.*, 2004) pero que no habían sido descritas con anterioridad en ratón y es necesario un estudio más completo para su caracterización.

### **¿Está la expresión de DAT restringida a los grupos A8-A10?**

A la vista de nuestros datos hemos de señalar que, aunque generalmente se utiliza el DAT como marcador de neuronas dopaminérgicas, parece que tan solo es un buen marcador en el caso de las neuronas mesencefálicas. Esto concuerda con lo descrito en rata por Ciliax *et al.* (1995) en la caracterización del anticuerpo contra el DAT. No hemos encontrado somas claramente DAT-ir fuera del mesencéfalo, con la excepción de las neuronas DAT-ir localizadas entre ambos fascículos retroflejos, que son una prolongación de la población dopaminérgica periacueductal. Pero ni a lo largo del hipotálamo, ni en el estriado ventral, ni en los bulbos olfativos encontramos somas neuronales claramente marcadas con DAT.

El grupo de Turiault *et al.* (2007), generó un ratón transgénico que produce  $\beta$ -Galactosidasa bajo el promotor del gen para el DAT. De esta manera marcaron en el cerebro del ratón todas las neuronas que alguna vez han expresado DAT. Lo que vieron fue una perfecta concordancia entre el número de neuronas mesencefálicas que expresan TH y las que expresan DAT, coincidencia que también ocurre en el bulbo olfativo. Sin embargo, la situación en el hipotálamo es mucho más heterogénea. En los grupos A11 y A12 (en su región dorsolateral), había una gran coincidencia entre el número de neuronas que expresan TH y estaban marcadas con  $\beta$ -Galactosidasa. Pero tanto a niveles ligeramente caudales como anteriores, en la PAG y A13, el número de neuronas marcadas se restringe a una minoría de neuronas TH-ir. En los grupos más rostrales, A14 y A15, no se encontró ninguna neurona marcada con  $\beta$ -Galactosidasa, por lo que en ningún momento expresaron el DAT.

Nuestros resultados indican la misma disparidad entre el número de neuronas periacueductales TH-ir y DAT-ir que la descrita por Turiault *et al.* (2007), siendo mayor

el número de neuronas que producen DA que el de las que la recaptan. Habría que hacer una doble inmunohistoquímica para comprobar qué número de neuronas son coincidentes y en que proporción no lo son. Además, Ciliax *et al.* (1995), describen en rata una disparidad más entre ambas inmunohistoquímicas en la parte medial del VTA que nosotros no percibimos en ratón.

Sin embargo, no hemos encontrado ninguna neurona claramente marcada para el DAT en el hipotálamo del ratón adulto, lo que nos lleva a pensar que en algunos grupos hipotalámicos el DAT se expresa a un nivel muy bajo o solo lo hace de manera transitoria durante el desarrollo cerebral. En este sentido llama la atención la alta reactividad anti-TH en la ME. Una posibilidad es que fuese una reacción de oxidación de la DAB debida a la gran cantidad de capilares que la irrigan, a pesar de haber inactivado previamente las peroxidases endógenas. Sin embargo, cuando realizamos la inmunohistoquímica sin el anticuerpo primario (datos no mostrados) no se obtuvo esta marca en la ME. Una posible explicación es que estos terminales axónicos provengan de neuronas mesencefálicas (Kizer *et al.*, 1976). Pero con tiempos de reacción largos se puede intuir algunos perfiles de neuronas reactivas para el DAT en el Arc, lo que sugiere que la concentración del DAT en el soma es muy baja. Una posible explicación es que el DAT, en las neuronas del hipotálamo que lo expresan, sería muy mayoritariamente transportado a terminales, en contraste con lo observado en el mesencéfalo. En este sentido, Revay *et al.* (1996) obtuvieron un marcaje similar al descrito en este trabajo en el cerebro de rata. Observaron una inmunoreactividad fuerte en la ME y, tras tiempos de incubación largos y con medios de amplificación de la señal, la aparición de algunos perfiles neuronales inmunopositivos en el Arc. Su interpretación se basa en una posible compartimentalización del DAT en estas neuronas, de manera que el DAT se concentraría en los terminales axónicos de la ME sin que difundiera por el resto de la neurona. Esto concuerda con lo descrito por varios autores (Meister & Elde, 1993; Cerruti *et al.*, 1993), que a pesar de no detectar la proteína encuentran mRNA de DAT en algunos grupos del hipotálamo, aunque a unas concentraciones menores que en las neuronas mesencefálicas.

Además, coincidiendo con Turiault *et al.* (2007), Revay *et al.* (1996) también observaron expresión de DAT en neuronas periglomerulares en bulbo olfativo (grupo A16) aunque para ello tuvieron que utilizar tiempos de incubación largos y amplificación de la señal (como en el caso del Arc). Esto sugiere que al igual que en determinados núcleos hipotalámicos, en el bulbo olfativo el DAT se expresa a niveles

bajos y se distribuye de forma peculiar en la célula, probablemente porque en estos centros el DAT y quizás la DA cumplen una función diferente a la que desempeñan en las neuronas mesencefálicas.

Las discrepancias entre marcadores de células dopaminérgicas no se restringen al DAT y la TH. Las células DAérgicas deben expresar también la descarboxilasa de L-aminoácidos aromáticos (AADC) que transforma la L-DOPA en dopamina. Ugruymov *et al.* (2002), sin embargo, encontraron en el Arc algunas neuronas que sólo expresaban TH o AADC. Para explicar este hecho los autores sugieren que para la síntesis de DA se necesita un transporte interneuronal de L-DOPA desde neuronas TH-ir a neuronas inmunoreactivas para la AADC (AADC-ir). A la vista de estos resultados parece que en la síntesis de DA puede intervenir más de una neurona y la pregunta que debemos hacernos es si esto ocurre también en otras partes del encéfalo y con qué frecuencia.

Por su parte Weihe *et al.* (2006) analizaron mediante microscopía confocal la colocalización de TH con AADC y VMAT2 (transportador vesicular de monoaminas, necesario para su almacenaje y exocitosis). Con esta tecnología describieron en diversos núcleos del cerebro de roedor poblaciones de neuronas TH-positivas, AADC-positivas y VMAT2-negativas, a las que denominaron neuronas catecolaminérgicas no-exocitóticas. También observaron neuronas TH-ir, AADC-negativas y VMAT2-negativas, a las que consideraron neuronas DOPAérgicas. Las neuronas catecolaminérgicas no-exocitóticas, liberarían DA (o epinefrina/norepinefrina) de manera no convencional y posiblemente de forma tónica o mantenida. Las neuronas DOPAérgicas, liberarían L-DOPA pero tampoco lo harían de manera convencional al ser VMAT2-negativas. Dado que no se conocen funciones sinápticas de la L-DOPA, la función más probable de estas células es la de colaborar con otras células vecinas en la síntesis de DA, tal y como sugieren Ugruymov *et al.* (2002) en el Arc. Otra posibilidad sería que estas neuronas TH-ir fueran en realidad células inmaduras, o un reservorio de células indiferenciadas con mayor potencialidad en caso de necesidad, y no tengan otra función en el cerebro adulto sano.

### **Significado funcional de la expresión de DAT en células dopaminérgicas**

La función del DAT es la recaptación de la DA de la hendidura sináptica o del espacio extracelular (Schenk, 2002), limitando así su acción postsináptica y sus posibles efectos tóxicos. Aunque el DAT se exprese durante el desarrollo o en el adulto en otros grupos de neuronas a concentraciones muy bajas, parece probable que su significado

funcional sea diferente al que desempeña en las neuronas mesencefálicas, donde recupera la DA del espacio extracelular. Se ha visto que esta función puede ser desempeñada también, aunque a un rendimiento menor, por otros transportadores de monoaminas, como el transportador de la serotonina (Gardier *et al.*, 2000; Miura *et al.*, 2005) o de la norepinefrina (Morón *et al.*, 2002).

Como hemos visto antes todo sugiere que algunas células del Arc, que expresan bajos niveles de mRNA de DAT, llegarían a producir DAT que sería transportado masivamente a sus terminales axónicos en la ME. De hecho algunos autores (Fuxe *et al.*, 1966; Cuello & Iversen, 1973; Demarest & Moore, 1979; Annunziato *et al.*, 1980; George & Van Loon, 1982) han señalado que las neuronas del hipotálamo tuberoinfundibular son capaces de recaptar dopamina tritiada, aunque con una afinidad por la DA mucho menor que las neuronas mesencefálicas (a una constante de afinidad dos o tres veces mayor que en el estriado).

Se ha propuesto que esta baja afinidad podría tener un significado funcional (Demarest & Moore, 1979; George & Van Loon, 1982). La DA escaparía de la hendidura sináptica y difundiría a la circulación portal de la ME, donde tendría importancia fisiológica al actuar como hormona. En este sentido, la detección de DAT en la ME resulta difícil de explicar, ya que la DA sería liberada a sangre donde tendría un efecto hormonal y no sería necesaria su recaptación. Sin embargo, DeMaria *et al.* (2000) han propuesto una explicación basada en la implicación del DAT en la regulación fisiológica de la prolactina. A pesar de no detectar DAT en las neuronas del Arc, si que encontraron reactividad para el DAT y colocalización con TH en la ME (como hemos mostrado nosotros también) y en los lóbulos intermedio y neural de la glándula pituitaria. Al tratar a animales ovariectomizados con estradiol aumenta la concentración de prolactina en el suero sanguíneo. Pero si además se les inyecta un bloqueante de la recaptación de la DA por el DAT (mazindol) se inhibe este aumento de la prolactina en sangre. De hecho, se observa un aumento en la concentración de DA y descenso de la de DOPAC (metabolito de la DA) en la ME y lóbulos intermedio y neural de la glándula pituitaria. Al haber mayor concentración de DA que llega a sangre, se produce una inhibición de la secreción de prolactina por el lóbulo anterior de la glándula pituitaria. Así, parece que el DAT (a pesar de tener una eficiencia menor que la forma de las neuronas mesencefálicas; Demarest & Moore., 1979; Annunziato *et al.*, 1980) tiene un papel de suma importancia en la regulación fisiológica de la prolactina, ya que niveles altos de DA en sangre inhiben la liberación de prolactina. Esto está

reforzado también por los datos del ratón *knock-out* para el DAT que padece (entre otras alteraciones) hipoplasia del lóbulo anterior de la glándula pituitaria, con un descenso de los niveles RNAm de la prolactina y de la propia prolactina (Bosse *et al.*, 1997).

En todo caso las diferencias en afinidad por la DA observadas en distintas células (mesencefálicas, con alta afinidad; tubero-infundibular, con baja afinidad) sugieren diferentes formas de DAT. No obstante, el DAT está codificado por un único gen (Vandenbergh *et al.*, 1992) aunque los análisis de la proteína muestran variaciones en el peso molecular atribuibles al procesamiento post-traducciona (Patel *et al.*, 1994). Se sabe que esta heterogeneidad se debe, al menos en parte, a la glicosilación del DAT (Lew *et al.*, 1991, 1992; Patel *et al.*, 1994), o a su estado de fosforilación (Copeland *et al.*, 1996; Foster *et al.*, 2002, 2003; Samuvel *et al.*, 2008). Ambos procesos participan en la señalización y tráfico de la proteína DAT dentro de la neurona (Melikian *et al.*, 1996; Copeland *et al.*, 1996; Melikian & Buckley, 1999; Lin *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Cruz-Muros *et al.*, 2007).

Es por tanto necesario conocer mejor como afecta la glicosilación y otras posibles modificaciones post-traduccionales a la afinidad del DAT por su sustrato. En este sentido, Cruz-Muros *et al.* (2007) estudiaron con diferentes anticuerpos las diferentes formas del DAT y la variación de las mismas observada con la edad en rata. Principalmente observaron dos formas de DAT, una de 50 kDa de peso molecular que corresponde a la forma sin glicosilar del DAT y otra de 75-80 kDa que corresponde a la forma glicosilada. Estas formas no se distribuyen por igual en las neuronas mesencefálicas. La primera parece ser una forma inmadura y se concentra en el soma y el retículo endoplásmico, mientras que la forma glicosilada se acumula en los terminales estriatales, y más específicamente en su membrana plasmática. No obstante, la forma no glicosilada también se encuentra en la membrana (Li *et al.*, 2004), pero parece ser más inestable e ineficiente que la glicosilada. Además, Cruz-Muros *et al.* (2007) observaron una disminución de ambas formas del DAT con la edad, aunque también se ponen en marcha mecanismos compensatorios para intentar que no disminuya la recaptación de la DA.

Independientemente de la regulación del DAT, en las neuronas que no expresan DAT la regulación de la transmisión sináptica ha de ser diferente a las mesencefálicas (donde se libera de manera tónica hasta que existe algún estímulo que provoca que su liberación fásica; Floresco, 2007). Es posible que en estas neuronas la diana de acción de la DA no sea un sitio postsináptico puntual sino que la DA difunda libremente

actuando sobre diversos elementos en la proximidad del axón DAérgico, lo que se conoce como transmisión volumétrica (Hoffman *et al.*, 1998; Pickel, 2000; Agnati *et al.*, 2000; Mundorf *et al.*, 2001; Fuxe *et al.*, 2007).

### **Patrón de innervación dopaminérgica del córtex de ratón**

Nuestros resultados muestran que no existen diferencias apreciables en la innervación telencefálica detectada por la inmunohistoquímica para el DAT y la TH, por lo que podemos concluir que la mayoría de la innervación dopaminérgica de los hemisferios telencefálicos proviene de los grupos del mesencéfalo.

Nuestros resultados relativos a la innervación DAérgica del cortex del ratón coinciden con las descripciones previas en la rata tanto a partir de la detección de TH (Björklund & Lindvall, 1984) como del DAT (Ciliax *et al.*, 1995). No obstante, nuestras observaciones sugieren pequeñas diferencias entre la rata (Fallon & Moore, 1978; Datiche & Cattarelli, 1996, Björklund & Lindvall, 1984) y el ratón en la innervación del cortex piriforme. Mientras en la rata la innervación DAérgica parece restringida a las capas II y III de los niveles caudales e intermedios, en el ratón ésta innervación se extiende a la capa Ib, sobre todo a niveles antero-posteriores intermedios, en donde las fibras parecen proceder del denso campo terminal del OT.

Durante muchos años se ha discutido sobre si el hipocampo recibía proyecciones dopaminérgicas desde el mesencéfalo o no (Costa *et al.*, 1972; Lindvall & Björklund, 1978; Verney *et al.*, 1985; Gasbarri *et al.*, 1994, 1997) ya que a pesar de las pruebas funcionales *in vitro* (Bischoff *et al.*, 1979; Stein *et al.*, 1993), y de la presencia de receptores de DA (Scatton *et al.*, 1980; Frey *et al.*, 1990, 1991; Otmakhova & Lisman, 1998; Manahan-Vaughan & Kulla, 2003) apenas si se observan fibras DAérgicas en el hipocampo. En 1982, Swanson, mediante inyecciones de trazador retrogrado en el hipocampo, en DG, CA1 y CA3, observó unas pocas neuronas marcadas en el VTA y SNC en su porción más rostral, y una población importante de células marcadas en SuM. Además Swanson (1982) mediante una doble inmunohistoquímica comprobó que el número total de neuronas mesencefálicas marcadas retrógradamente y TH-ir era muy reducido. Resultados similares obtuvieron Gasbarri *et al.* (1994) que realizaron el mismo procedimiento y observaron un porcentaje de colocalización que no superaba el 18%. Estos datos sugieren que unas pocas células darían lugar a las escasas fibras que observamos, un resultado que es coincidente con Björklund y Lindvall (1984) en que a pesar de las pruebas funcionales de la proyección mesohipocámpica, las bases

anatómicas de esta proyección son casi inexistentes. En todo caso, la falta de fibras reactivas para la TH o DAT en el hipocampo se hace difícil de entender puesto que la DA aplicada exógenamente *in vitro* tiene un efecto notable (Stein *et al.*, 1993; Stein *et al.*, 1994). Una posible explicación sería que los receptores para la DA expresados por las neuronas hipocámpicas (Stein *et al.*, 1994) están destinados a la membrana de los axones de estas neuronas en sus eferencias subcorticales (septum y estriado ventral). Allí, la densa o moderada inervación DAérgica tendría un efecto presináptico sobre los axones de origen hipocámpico (ya que se encuentran receptores DAérgicos en homogeneado de hipocampo, Bruinink & Bischoff, 1986). Esto, no obstante, algunos receptores en soma o dendritas podrían explicar el efecto de la DA *in vitro*, aún con la escasez de fibras DAérgicas. De ser así, los bien estudiados efectos de la DA en el hipocampo tendrían en realidad poca o nula relevancia funcional.

### **Patrón de inervación dopaminérgica de las áreas subcorticales del telencéfalo de ratón**

Es bien sabido que el estriado es el área que recibe la inervación dopaminérgica más importante del encéfalo, tanto en su división dorsal como en la ventral (Carlsson, 1959; Björklund & Lindvall, 1984; Ikemoto, 2007) y el origen de esta proyección es tegmental. No discutiremos aquí sobre la topografía de las proyecciones DAérgicas tegmento-estriatales (Björklund & Lindvall, 1984; Ikemoto, 2007) ya que en el capítulo II vamos a estudiar este aspecto con mayor detalle.

Mientras que en el CPu la inervación es muy densa y bastante homogénea, la inervación del estriado ventral es heterogénea, probablemente porque la DA cumpla diferentes funciones en sus subdivisiones y haya diferencias en la concentración de DA liberada de manera tónica en cada una de sus divisiones. De hecho, Jansson *et al.* (1999) ya habían descrito estas heterogeneidades en el AcbSh y describieron en él zonas con una perfecta colocalización de bajas concentraciones de TH, DAT y el receptor D2 (D2R) pero con una concentración elevada del receptor D1 (D1R), mientras que en el resto de AcbSh la relación era la inversa (elevadas TH, DAT y D2R, baja D1R). Esta disparidad entre receptores y neurotransmisor podría explicarse si en estas zonas con poca inervación DAérgica la DA actúa mediante transmisión volumétrica (Agnati *et al.*, 1995).

Se ha sugerido que algunas de estas heterogeneidades (por ejemplo, el incremento de densidad de fibras en el límite dorso-medial entre el AcbShM y el septum) pueden

ser específicas de la cepa de ratón C57, puesto que en la cepa DBA no solo no se observa este incremento, sino que existe una reducción en la densidad de terminales TH-ir en esta zona (D'Este *et al.*, 2007). Sin embargo, nuestros datos son similares a los obtenidos por D'Este *et al.* (2007) en la cepa C57, lo que sugiere que este patrón heterogéneo es más representativo de los roedores en general. Estas diferencias anatómicas entre cepas seguramente se traducen en cambios comportamentales relativos a las funciones de la DA en las diferentes cepas (véase, por ejemplo, Wanat *et al.*, 2009).

Además, hemos observado que existe continuidad entre la innervación DAérgica de las diferentes partes del AcbSh con los puentes celulares que unen esta estructura con el tubérculo olfativo. Es posible que todas estas estructuras, en las que se observa una misma densidad de marcaje DAT inmunopositivo, reciban la innervación de las mismas áreas mesencefálicas (véase Capítulo II) y constituyan unidades funcionales junto con el VP que queda en su interior. En estas unidades estriato-palidales habría que incluir los islotes de Calleja. En este sentido, nuestros resultados coinciden con descripciones previas en la rata, en la que se muestra una densa innervación DAérgica de la periferia y el interior de los islotes de Calleja, con una innervación menos densa en el estrato granular (Fallon *et al.*, 1978).

El septum es una estructura subcortical que está compuesta por dos grandes divisiones de origen heterogéneo, la división medial de naturaleza palidal y el septum lateral de origen estriatal, que a su vez se subdivide en una multitud de subnúcleos (Risold & Swanson, 1997; Lanuza & Martínez-García, 2009). Nuestros resultados coinciden con las descripciones existentes en ratas (Lindvall, 1975; Moore, 1978) de acuerdo con las cuales las fibras DAérgicas se encuentran casi exclusivamente en la división lateral, siendo muy escasas en la división medial. Dado que el complejo septal lateral corresponde al territorio de naturaleza estriatal más medial, la innervación dopaminérgica que recibe sería homóloga a la que recibe el resto del estriado. Así se establecería a nivel medial una circuitería paralela a la descrita para los ganglios basales, en la que el septum lateral recibiría simultáneamente un *input* dopaminérgico mesencefálico y un *input* glutamatérgico cortical desde el arquicortex, que es la parte más medial de la corteza. Al igual que pasa en los ganglios basales, donde los elementos estriatales originan una proyección descendente GABAérgica sobre los territorios palidales (VP, GP) y mesencefálicos, el LS da lugar a una proyección descendente

GABAérgica al MS, el cual constituiría el pálido más medial (Lanuza & Martínez-García, 2009).

Sin embargo, a diferencia del resto del estriado, en donde la inervación está presente en todo el territorio y donde apenas se producen contactos sinápticos entre terminales DAérgicos con el soma de las neuronas estriatales (Reiner, 1994) la inervación DAérgica del septum lateral está concentrada en una banda estrecha en la que la gran parte de las fibras DAérgicas forman cestas sobre somas de neuronas septales. Estos terminales “en cesto” han de tener un gran efecto sobre las neuronas sobre las que hacen sinapsis, lo que sugiere una función de la inervación DAérgica diferente en el septum y en el resto del estriado. Dado que la DA no tiene un efecto neto claro sobre la actividad eléctrica de la neurona postsináptica (Herve & Girault, 2005; Bandyopadhyay & Hablitz, 2007), cabe suponer que las cestas DAérgicas sobre los somas septales mediarían potentes efectos metabotrópicos que permitirían cambios de expresión génica relacionados con fenómenos de plasticidad sináptica.

De hecho, en el septum lateral se produce potenciación a largo plazo (*Long Term Potentiation*, LTP; García & Jaffard, 1992; García *et al.*, 1993) de algunas sinapsis mediante receptores glutamatérgicos metabotrópicos (Zheng *et al.*, 1996). Se conoce también que los terminales DAérgicos hacen sinapsis en el cuello de las espinas dendríticas de las neuronas estriatales, mientras que la cabeza de las espinas recibe *inputs* corticales o talámicos (Bouyer *et al.*, 1984; Freund *et al.*, 1984), y por tanto hay que añadir el efecto de la dopamina en estas sinapsis sobre el cuello de las espinas al gran efecto que puede tener sobre la neurona septal una activación de todo el soma en el caso de los terminales en “cestos”. Es posible que la sinapsis dopaminérgica haga posible la modulación de ésta proyección, afectando al patrón de expresión génica de la neurona, siendo suficiente para cambiarlo, y poder desencadenar procesos de plasticidad.

Se ha descrito que el septum lateral está subdividido en una multitud de regiones según los campos de terminación de diferentes neurotransmisores, como pasa con la DA (Risold & Swanson, 1997). Además, existen otros campos de terminación glutamatérgicos con una orientación diferente superpuestos provenientes del hipocampo (Swanson & Cowan, 1977) que es probable que provean información espacial (Bird & Burgess, 2008). Es posible que el cruce de ambas parcelaciones (Glu y otros neurotransmisores) provoque que la convergencia de ambas señales (Glu y DA por ejemplo) sobre unas mismas neuronas pongan en marcha estos procesos de plasticidad o



### Patrón de innervación dopaminérgica de la amígdala de ratón

La descripción de la innervación DAérgica de los diferentes núcleos amigdalinos, tanto paleales como subpaleales, coincide notablemente con lo descrito previamente en la rata (Björklund & Lindvall, 1984).

Así, en la amígdala paleal de la rata Brinley-Reed y McDonald (1999) ya observaron que la innervación TH-ir era importante en el núcleo basolateral, donde era mayor en el BLP que en el BLA. Además, encontraron terminaciones TH-ir en forma de cesta sobre neuronas de la amígdala basolateral. Al realizar una inmunohistoquímica contra la  $\beta$ -hidroxilasa de la dopamina (DBH), comprobaron que estas terminaciones en forma de cesta eran DBH negativas, por lo que han de ser terminaciones DAérgicas. La mayoría de estas cestas rodean somas pequeños y ovoides, aunque en la BL anteroventral también se encontraron alrededor de neuronas grandes y piramidales. Al realizar dobles inmunohistoquímicas se comprobó que la mayoría de estos pequeños somas que reciben una terminación en cesto son positivos para parvalbumina (PV). Dado que la PV es un marcador de neuronas GABAérgicas, es muy posible que esta proyección DAérgica tan potente sobre una interneurona inhibitoria de la BL, module la actividad sináptica inhibitoria global de la amígdala basolateral.

Además, se ha descrito (Busche *et al.*, 2004) que factores epigenéticos (como el aislamiento social o la administración de metanfetamina en estadíos tempranos) son capaces de modificar la densidad de innervación DAérgica de los distintos subnúcleos de la amígdala con distinta susceptibilidad, de manera que la innervación DAérgica aumentaba en la BLA con cualquiera de los factores mencionados anteriormente, mientras que en la La y Ce se necesitaba la concurrencia de ambos (aislamiento y metanfetaminas).

La innervación DAérgica de las masas intercaladas puede ser de suma importancia funcional. Se sabe que las masas intercaladas actúan como relevo de parte de la información de la amígdala La y basal hacia la Ce (Pare & Smith, 1993; Pare *et al.*, 2004; LeDoux, 2007). De hecho, las masas intercaladas podrían inhibir a las neuronas de salida de la Ce, que también son inhibitorias, obteniendo así una respuesta por desinhibición (LeDoux, 2007). Por lo que la modulación de esta señal en ambos núcleos (masas intercaladas y Ce) puede ser de suma importancia en los procesos de respuesta y aprendizaje emocional.

La innervación DAérgica descrita en las masas intercaladas e IPAC ha sido estudiada con relación al receptor D1 (Jacobsen *et al.*, 2006; Fuxe *et al.*, 2003).

Sorprendentemente en el IPAC los terminales TH-ir parecen evitar las zonas reactivas para D1, y algo similar ocurre en la masa intercalada principal, ya que las fibras TH-ir están más restringidas que los receptores D1 (Jacobsen *et al.*, 2006). Se ha postulado que estas discrepancias entre terminales TH-ir y receptores D1 podrían reflejar la existencia de dos mecanismos de transmisión sináptica (sinapsis clásica y volumétrica) que estarían relacionados con los mecanismos de aprendizaje (Montague *et al.*, 1996; Agnati *et al.*, 2006; Jacobsen *et al.*, 2006).

### Aspectos comparados

La densa inervación de la amígdala basolateral posterior y APir (y en menor medida de la anterior) constituye, por lo tanto, un rasgo fundamental en la organización de la amígdala que se observa en rata (Bjorklund & Lindvall, 1984), monos y humanos (Porrino & Goldman-Rakic, 1982; Gaspar *et al.*, 1992; Lynd-Balta & Haber, 1994) y ratones (este trabajo). El papel de ésta inervación en procesos clave para la supervivencia como la expresión del miedo condicionado (Ledoux *et al.*, 1984, 1985, 1986) explica el carácter general de este rasgo en los mamíferos.

Se ha observado, que alteraciones de los niveles de DA pueden influenciar directamente el aprendizaje asociado al miedo. Así, la inyección sistémica de *quinpirole* (un agonista de los receptores D2) provoca que no se pueda condicionar a ratas a un miedo condicionado de segundo orden (respuesta de miedo ante un estímulo neutro asociado a otro estímulo neutro que previamente se ha asociado con un estímulo aversivo) dependiente de la dosis (Nader & LeDoux, 1999). Este efecto se debería a los D2R presinápticos que provocarían un descenso en la liberación de DA en los campos terminales, incluyendo la amígdala. Se ha observado que la estimulación eléctrica o farmacológica en el VTA incrementa los comportamientos de miedo (Stevens *et al.*, 1974; Stevens & Livermore, 1978). Mientras que lesiones o inhibiciones del VTA provocan un descenso en los comportamientos emocionales y respuestas a miedo (Le Moal *et al.*, 1969; Borowski & Kokkinidis, 1996). De hecho, lesiones específicas con 6-OHDA en la amígdala, provocan una disminución en el miedo condicionado (Selden *et al.*, 1991). La inyección sistémica o intramigdalina de antagonistas de receptores D1 provoca un descenso de las respuestas ante el miedo (Davis *et al.*, 1993; Guarraci *et al.*, 1999). Así que se puede afirmar, que la DA tiene un papel importante en la modulación y expresión de un comportamiento tan conservado como es el miedo.

Tanto es así que esta inervación puede observarse también en no mamíferos, aunque la relevancia comparada de este hecho sólo se ha puesto en evidencia recientemente (Martinez-Garcia *et al.*, 2002, 2007, 2008).

Nuestra descripción de la inervación DAT-ir y TH-ir en la amígdala del ratón añade dos detalles muy relevantes pero poco conocidos, que podrían tener valor como elementos útiles en neuroanatomía comparada. Por un lado las masas intercaladas constituyen agrupaciones de células GABAérgicas (Paré *et al.*, 2004) que reciben una aferencia DAérgica especialmente densa (nuestros resultados), e intervienen como puentes entre la amígdala basolateral y la central (Paré *et al.*, 2004). A pesar de que el cerebro de reptiles y aves no se han descrito masas intercaladas (Martinez-Garcia *et al.*, 2007) estos criterios pueden ser suficientes para identificar estructuras equiparables en la amígdala de los no mamíferos.

Por último, la inervación DAérgica contribuye a clarificar la compartimentalización de la amígdala central extendida. Así, las fibras TH-ir y DAT-ir inervan fundamentalmente la división lateral de la amígdala central y una porción central del BST. Es en este territorio en donde se sitúan las células que expresan neurotensina (Moga *et al.*, 1989; Allen & Cechetto, 1995; Martinez-Garcia *et al.*, 2008) y el factor de liberación de corticotropinas (CRF, Sakanaka *et al.*, 1986; Moga *et al.*, 1989; Martinez-Garcia *et al.*, 2008). Por el contrario, la porción capsular de la Ce y las partes más laterales del BST muestran una densa inervación por fibras ricas en CGRP (Kruger *et al.*, 1988; Yasui *et al.*, 1991; Martinez-Garcia *et al.*, 2008) pero reciben una inervación DAérgica menor (nuestros resultados). Nuevamente, estas propiedades neuroquímicas pueden ser muy útiles para identificar la amígdala central extendida y sus subdivisiones en los cerebros de distintos vertebrados (Martinez-Garcia *et al.*, 2008).

## **Bibliografia**

- Agnati, L. F., Zoli, M., Stromberg, I. & Fuxe, K. (1995) Intercellular communication in the brain: Wiring versus volume transmission. *Neuroscience*, 69, 711-726.
- Agnati, L. F., Zoli, M., Ferrari, R., Di Paola, L., Torri, C., Fuxe, K. & Zini, I. (2000) Evidence for the existence of pulses of dopamine in the extracellular space of the rat striatum. *Prog. Brain Res.*, 125, 303-308.
- Agnati, L. F., Leo, G., Zanardi, A., Genedani, S., Rivera, A., Fuxe, K. & Guidolin, D. (2006) Volume transmission and wiring transmission from cellular to molecular networks: History and perspectives. *Acta Physiol. (Oxf)*, 187, 329-344.
- Alcaro, A., Huber, R. & Panksepp, J. (2007) Behavioral functions of the mesolimbic dopaminergic system: An affective neuroethological perspective. *Brain Res. Rev.*, 56, 283-321.
- Allen, G. V. & Cechetto, D.F. (1995) Neurotensin in the lateral hypothalamic area: Origin and function. *Neuroscience*, 69, 533-544.
- Annunziato, L., Leblanc, P., Kordon, C. & Weiner, R.I. (1980) Differences in the kinetics of dopamine uptake in synaptosome preparations of the median eminence relative to other dopaminergically innervated brain regions. *Neuroendocrinology*, 31, 316-320.
- Bandyopadhyay, S. & Hablitz, J.J. (2007) Dopaminergic modulation of local network activity in rat prefrontal cortex. *J. Neurophysiol.*, 97, 4120-4128.
- Benes, F. M. (2001) Carlsson and the discovery of dopamine. *Trends Pharmacol. Sci.*, 22, 46-47.
- Bentivoglio, M. & Morelli, M. (2005) The organization and circuits of mesencephalic dopaminergic neurons and the distribution of dopamine receptors in the brain. In Dunnett, S. B., Bentivoglio, A. R., Bjorklund, A. & Hokfelt, T. (eds), *Handbook of Chemical Neuroanatomy Vol 21: Dopamine*. Elsevier, Amsterdam.
- Berger, B., Verney, C., Gaspar, P. & Febvret, A. (1985) Transient expression of tyrosine hydroxylase immunoreactivity in some neurons of the rat neocortex during postnatal development. *Brain Res.*, 355, 141-144.
- Bird, C. M. & Burgess, N. (2008) The hippocampus and memory: Insights from spatial processing. *Nat. Rev. Neurosci.*, 9, 182-194.

- Bischoff, S., Scatton, B. & Korf, J. (1979) Dopamine metabolism, spiperone binding and adenylate cyclase activity in the adult rat hippocampus after ingrowth of dopaminergic neurones from embryonic implants. *Brain Res.*, 179, 77-84.
- Björklund, A. & Lindvall, O. (1984) Dopamine-containing systems in the CNS. In: *Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol. 2: Classical Transmitters in the CNS, Part I*, pp. 55-122. Elsevier, Amsterdam.
- Björklund, A. & Dunnett, S.B. (2007a) Dopamine neuron systems in the brain: An update. *Trends Neurosci.*, 30, 194-202.
- Björklund, A. & Dunnett, S.B. (2007b) Fifty years of dopamine research. *Trends Neurosci.*, 30, 185-187.
- Borowski, T. B. & Kokkinidis, L. (1996) Contribution of ventral tegmental area dopamine neurons to expression of conditional fear: Effects of electrical stimulation, excitotoxin lesions, and quinpirole infusion on potentiated startle in rats. *Behav. Neurosci.*, 110, 1349-1364.
- Bosse, R., Fumagalli, F., Jaber, M., Giros, B., Gainetdinov, R.R., Wetsel, W.C., Missale, C. & Caron, M.G. (1997) Anterior pituitary hypoplasia and dwarfism in mice lacking the dopamine transporter. *Neuron*, 19, 127-138.
- Bouyer, J. J., Joh, T.H. & Pickel, V.M. (1984) Ultrastructural localization of tyrosine hydroxylase in rat nucleus accumbens. *J. Comp. Neurol.*, 227, 92-103.
- Brinley-Reed, M. & McDonald, A.J. (1999) Evidence that dopaminergic axons provide a dense innervation of specific neuronal subpopulations in the rat basolateral amygdala. *Brain Res.*, 850, 127-135.
- Bruinink, A. & Bischoff, S. (1986) Detection of dopamine receptors in homogenates of rat hippocampus and other brain areas. *Brain Res.*, 386, 78-83.
- Busche, A., Polascheck, D., Lesting, J., Neddens, J. & Teuchert-Noodt, G. (2004) Developmentally induced imbalance of dopaminergic fibre densities in limbic brain regions of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *J. Neural Transm.*, 111, 451-463.
- Cannon, C. M. & Bseikri, M.R. (2004) Is dopamine required for natural reward? *Physiol. Behav.*, 81, 741-748.
- Cannon, C. M. & Palmiter, R.D. (2003) Reward without dopamine. *J. Neurosci.*, 23, 10827-10831.
- Carlsson, A. (1959a) The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol. Rev.*, 11, 490-493.

- Carlsson, A. (1959b) Detection and assay of dopamine. *Pharmacol. Rev.*, 11, 300-304.
- Cerruti, C., Walther, D.M., Kuhar, M.J. & Uhl, G.R. (1993) Dopamine transporter mRNA expression is intense in rat midbrain neurons and modest outside midbrain. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 18, 181-186.
- Chinta, S. J. & Andersen, J.K. (2006) Reversible inhibition of mitochondrial complex I activity following chronic dopaminergic glutathione depletion in vitro: Implications for parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 41, 1442-1448.
- Ciliax, B. J., Heilman, C., Demchyshyn, L.L., Pristupa, Z.B., Ince, E., Hersch, S.M., Niznik, H.B. & Levey, A.I. (1995) The dopamine transporter: Immunochemical characterization and localization in brain. *J. Neurosci.*, 15, 1714-1723.
- Copeland, B. J., Vogelsberg, V., Neff, N.H. & Hadjiconstantinou, M. (1996) Protein kinase C activators decrease dopamine uptake into striatal synaptosomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 277, 1527-1532.
- Cossette, M., Lecomte, F. & Parent, A. (2005) Morphology and distribution of dopaminergic neurons intrinsic to the human striatum. *J. Chem. Neuroanat.*, 29, 1-11.
- Costa, E., LeFevre, H., Meek, J., Revuelta, A., Spano, F., Strada, S. & Daly, J. (1972) Serotonin and catecholamine concentrations in brain of rats injected intracerebrally with 5,6-dihydroxytryptamine. *Brain Res.*, 44, 304-308.
- Cousins, M. S. & Salamone, J.D. (1996) Skilled motor deficits in rats induced by ventrolateral striatal dopamine depletions: Behavioral and pharmacological characterization. *Brain Res.*, 732, 186-194.
- Cruz-Muros, I., Afonso-Oramas, D., Abreu, P., Perez-Delgado, M.M., Rodriguez, M. & Gonzalez-Hernandez, T. (2007) Aging effects on the dopamine transporter expression and compensatory mechanisms. *Neurobiol. Aging.*, .
- Cuello, A. C. & Iversen, L.L. (1973) Localization of tritiated dopamine in the median eminence of the rat hypothalamus by electron microscope autoradiography. *Brain Res.*, 63, 474-478.
- Dahlstrom, A. & Fuxe, K. (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, 20, 398-399.
- Dailly, E., Chenu, F., Renard, C.E. & Bourin, M. (2004) Dopamine, depression and antidepressants. *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 18, 601-607.
- Darmopil, S., Muneton-Gomez, V.C., de Ceballos, M.L., Bernson, M. & Moratalla, R. (2008) Tyrosine hydroxylase cells appearing in the mouse striatum after dopamine denervation are likely to be projection neurones regulated by L-DOPA. *Eur. J. Neurosci.*, 27, 580-592.

- Datiche, F. & Cattarelli, M. (1996) Catecholamine innervation of the piriform cortex: A tracing and immunohistochemical study in the rat. *Brain Res.*, 710, 69-78.
- Davis, M. (1993) Pharmacological analysis of fear-potentiated startle. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 26, 235-260.
- Demarest, K. T. & Moore, K.E. (1979) Lack of a high affinity transport system for dopamine in the median eminence and posterior pituitary. *Brain Res.*, 171, 545-551.
- Demaria, J. E., Nagy, G.M., Lerant, A.A., Fekete, M.I., Levenson, C.W. & Freeman, M.E. (2000) Dopamine transporters participate in the physiological regulation of prolactin. *Endocrinology*, 141, 366-374.
- D'Este, L., Casini, A., Puglisi-Allegra, S., Cabib, S. & Renda, T.G. (2007) Comparative immunohistochemical study of the dopaminergic systems in two inbred mouse strains (C57BL/6J and DBA/2J). *J. Chem. Neuroanat.*, 33, 67-74.
- Di Chiara, G., Bassareo, V., Fenu, S., De Luca, M.A., Spina, L., Cadoni, C., Acquas, E., Carboni, E., Valentini, V. & Lecca, D. (2004) Dopamine and drug addiction: The nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology*, 47 Suppl 1, 227-241.
- Di Chiara, G. (2005) Dopamine, motivation and reward. In Dunnett, S. B., Bentivoglio, A. R., Bjorklund, A. & Hokfelt, T. (eds), *Dopamine*. Elsevier, 303-374.
- Dubach, M., Schmidt, R., Bowden, D.M., Kunkel, D., Martin, R., German, D. (1986) Neurons containing tyrosine hydroxylase-like immunoreactivity in the caudate and putamen of a nonhuman primate. *Society for Neuroscience Abstracts* 12:1327.
- Dubach, M., Schmidt, R., Kunkel, D., Bowden, D.M., Martin, R. & German, D.C. (1987) Primate neostriatal neurons containing tyrosine hydroxylase: Immunohistochemical evidence. *Neurosci. Lett.*, 75, 205-210.
- Dubach, M. (1994) Telencephalic dopamine cells in monkeys, humans, and rats. in In Smeets, W. J. A. J., Reiner, T. (ed), *Phylogeny and Development of Catecholamine Systems in the CNS of Vertebrates*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 273-292.
- Eranko, O. (1955) Histochemistry of noradrenaline in the adrenal medulla of rats and mice. *Endocrinology*, 57, 363-368.
- Espejo, E. F. (1997) Selective dopamine depletion within the medial prefrontal cortex induces anxiogenic-like effects in rats placed on the elevated plus maze. *Brain Res.*, 762, 281-284.
- Falck, B. & Torp, A. (1962) New evidence for the localization of noradrenalin in the adrenergic nerve terminals. *Med. Exp. Int. J. Exp. Med.*, 6, 169-172.

- Fallon, J. H. & Moore, R.Y. (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J. Comp. Neurol.*, 180, 545-580.
- Fallon, J. H., Riley, J.N., Sipe, J.C. & Moore, R.Y. (1978) The islands of Calleja: Organization and connections. *J. Comp. Neurol.*, 181, 375-395.
- Floresco, S. B. (2007) Dopaminergic regulation of limbic-striatal interplay. *J. Psychiatry Neurosci.*, 32, 400-411.
- Font C (1998) Estudio anatómico del complejo septal de telencefálico de reptiles squamata: Implicaciones funcionales y evolutivas. Tesis doctoral. Universitat de València.
- Foster, J. D., Pananusorn, B., Cervinski, M.A., Holden, H.E. & Vaughan, R.A. (2003) Dopamine transporters are dephosphorylated in striatal homogenates and in vitro by protein phosphatase 1. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 110, 100-108.
- Foster, J. D., Pananusorn, B. & Vaughan, R.A. (2002) Dopamine transporters are phosphorylated on N-terminal serines in rat striatum. *J. Biol. Chem.*, 277, 25178-25186.
- Freund, T. F., Powell, J.F. & Smith, A.D. (1984) Tyrosine hydroxylase-immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neuroscience*, 13, 1189-1215.
- Frey, U., Schroeder, H. & Matthies, H. (1990) Dopaminergic antagonists prevent long-term maintenance of posttetanic LTP in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Brain Res.*, 522, 69-75.
- Frey, U., Matthies, H., Reymann, K.G. & Matthies, H. (1991) The effect of dopaminergic D1 receptor blockade during tetanization on the expression of long-term potentiation in the rat CA1 region in vitro. *Neurosci. Lett.*, 129, 111-114.
- Fuxe, K., Hamberger, B. & Malmfores, T. (1966) Inhibition of amine uptake in tubero-infundibular dopamine neurones and in catecholamine cell bodies of the area postrema. *J. Pharm. Pharmacol.*, 18, 543-544.
- Fuxe, K., Jacobsen, K.X., Hoistad, M., Tinner, B., Jansson, A., Staines, W.A. & Agnati, L.F. (2003) The dopamine D1 receptor-rich main and paracapsular intercalated nerve cell groups of the rat amygdala: Relationship to the dopamine innervation. *Neuroscience*, 119, 733-746.
- Fuxe, K., Dahlstrom, A., Hoistad, M., Marcellino, D., Jansson, A., Rivera, A., Diaz-Cabiale, Z., Jacobsen, K., Tinner-Staines, B., Hagman, B., Leo, G., Staines, W., Guidolin, D., Kehr, J., Genedani, S., Belluardo, N. & Agnati, L.F. (2007) From the golgi-cajal mapping to the

- transmitter-based characterization of the neuronal networks leading to two modes of brain communication: Wiring and volume transmission. *Brain Res. Rev.*, 55, 17-54.
- Gainetdinov, R. R. (2008) Dopamine transporter mutant mice in experimental neuropharmacology. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 377, 301-313.
- Gardier, A. M., Moratalla, R., Cuellar, B., Sacerdote, M., Guibert, B., Lebecq, H. & Graybiel, A.M. (2000) Interaction between the serotonergic and dopaminergic systems in d-fenfluramine-induced activation of c-fos and jun B genes in rat striatal neurons. *J. Neurochem.*, 74, 1363-1373.
- Gasbarri, A., Packard, M.G., Campana, E. & Pacitti, C. (1994) Anterograde and retrograde tracing of projections from the ventral tegmental area to the hippocampal formation in the rat. *Brain Res. Bull.*, 33, 445-452.
- Gasbarri, A., Sulli, A. & Packard, M.G. (1997) The dopaminergic mesencephalic projections to the hippocampal formation in the rat. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 21, 1-22.
- Gaspar, P., Berger, B., Febvret, A., Vigny, A., Krieger-Poulet, M. & Borri-Voltattorni, C. (1987) Tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the human cerebral cortex: A novel catecholaminergic group? *Neurosci. Lett.*, 80, 257-262.
- Gaspar, P., Stepniewska, I. & Kaas, J.H. (1992) Topography and collateralization of the dopaminergic projections to motor and lateral prefrontal cortex in owl monkeys. *J. Comp. Neurol.*, 325, 1-21.
- George, S. R. & Van Loon, G.R. (1982) Characterization of high affinity dopamine uptake into the dopamine neurons of the hypothalamus. *Brain Res.*, 234, 339-355.
- Gouras, G. K., Rance, N.E., Young, W.S., 3rd & Koliatsos, V.E. (1992) Tyrosine-hydroxylase-containing neurons in the primate basal forebrain magnocellular complex. *Brain Res.*, 584, 287-293.
- Greenberg, N., Font, E. & Switzer, R.C., III (1988) The reptilian striatum revisited: Studies on anolis lizards. *The. Forebrain. of Reptiles.*, , 162-177.
- Guarraci, F. A., Frohardt, R.J. & Kapp, B.S. (1999) Amygdaloid D1 dopamine receptor involvement in pavlovian fear conditioning. *Brain Res.*, 827, 28-40.
- Harris, H. W. & Nestler, E.J. (1996) Immunohistochemical studies of mesolimbic dopaminergic neurons in fischer 344 and lewis rats. *Brain Res.*, 706, 1-12.
- Herve, D. & Girault, J. A. (2005) Signal transduction of dopamine receptors. In Dunnett, S. B., Bentivoglio, A. R., Bjorklund, A. & Hokfelt, T. (eds), *Dopamine*. Elsevier, 109-152.

- Hoffman, B. J., Hansson, S.R., Mezey, E. & Palkovits, M. (1998) Localization and dynamic regulation of biogenic amine transporters in the mammalian central nervous system. *Front. Neuroendocrinol.*, 19, 187-231.
- Hokfelt, T., Johansson, O. & Goldstein, M. (1984a) Chemical anatomy of the brain. *Science*, 225, 1326-1334.
- Hokfelt, T., Johansson, O. & Goldstein, M. (1984b) Chemical anatomy of the brain. *Science*, 225, 1326-1334.
- Horne MK, Drago J, Nunan J. (2005) The use of dopamine receptor knockout mice in understanding brain dopamine neurotransmission and sprouting in the nigrostriatal pathway. In Dunnett, S. B., Bentivoglio, A. R., Bjorklund, A. & Hokfelt, T. (eds), *Dopamine*. Elsevier, 153-197.
- Huot, P. & Parent, A. (2007) Dopaminergic neurons intrinsic to the striatum. *J. Neurochem.*, 101, 1441-1447.
- Hyman, S. E. (2005) Addiction: A disease of learning and memory. *Am. J. Psychiatry*, 162, 1414-1422.
- Ikemoto, S. (2007) Dopamine reward circuitry: Two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res. Rev.*, 56, 27-78.
- Iversen, S. D. & Iversen, L.L. (2007) Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci.*, 30, 188-193.
- Jacobsen, K. X., Hoistad, M., Staines, W.A. & Fuxe, K. (2006) The distribution of dopamine D1 receptor and mu-opioid receptor 1 receptor immunoreactivities in the amygdala and interstitial nucleus of the posterior limb of the anterior commissure: Relationships to tyrosine hydroxylase and opioid peptide terminal systems. *Neuroscience*, 141, 2007-2018.
- Jansson, A., Goldstein, M., Tinner, B., Zoli, M., Meador-Woodruff, J.H., Lew, J.Y., Levey, A.I., Watson, S., Agnati, L.F. & Fuxe, K. (1999) On the distribution patterns of D1, D2, tyrosine hydroxylase and dopamine transporter immunoreactivities in the ventral striatum of the rat. *Neuroscience*, 89, 473-489.
- Jollivet, C., Montero-Menei, C.N., Venier-Julienne, M.C., Sapin, A., Benoit, J.P. & Menei, P. (2004) Striatal tyrosine hydroxylase immunoreactive neurons are induced by L-dihydroxyphenylalanine and nerve growth factor treatment in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Neurosci. Lett.*, 362, 79-82.
- Kapur, S. & Mann, J.J. (1992) Role of the dopaminergic system in depression. *Biol. Psychiatry*, 32, 1-17.

- Kitahama, K., Geffard, M., Araneda, S., Arai, R., Ogawa, K., Nagatsu, I. & Pequignot, J.M. (2007) Localization of L-DOPA uptake and decarboxylating neuronal structures in the cat brain using dopamine immunohistochemistry. *Brain Res.*, 1167, 56-70.
- Kizer, J. S., Palkovits, M. & Brownstein, M.J. (1976) The projections of the A8, A9 and A10 dopaminergic cell bodies: Evidence for a nigral-hypothalamic-median eminence dopaminergic pathway. *Brain Res.*, 108, 363-370.
- Koh, P. O., Undie, A.S., Kabbani, N., Levenson, R., Goldman-Rakic, P.S. & Lidow, M.S. (2003) Up-regulation of neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) in the prefrontal cortex of schizophrenic and bipolar patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100, 313-317.
- Koob, G. F. & Le Moal, M. (1997) Drug abuse: Hedonic homeostatic dysregulation. *Science*, 278, 52-58.
- Koob, G. F. & Le Moal, M. (2008) Review. neurobiological mechanisms for opponent motivational processes in addiction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 363, 3113-3123.
- Kuljis, R. O., Martin-Vasallo, P. & Peress, N.S. (1989) Lewy bodies in tyrosine hydroxylase-synthesizing neurons of the human cerebral cortex. *Neurosci. Lett.*, 106, 49-54.
- Lanuza, E., Novejarque, A., Moncho-Bogani, J., Hernandez, A. & Martinez-Garcia, F. (2002) Understanding the basic circuitry of the cerebral hemispheres: The case of lizards and its implications in the evolution of the telencephalon. *Brain Res. Bull.*, 57, 471-473.
- Lanuza E, M. F. (2009) Evolution of septal nuclei. In Binder MD, Hirokawa N, Windhorst U (ed), *Encyclopedic Reference of Neuroscience*. Springer.
- Le Moal, M., Stinus, L. & Cardo, B. (1969) Ventral tegmental lesions in the rat: Effects on emotional behavior and variations in the alertness threshold. *J. Physiol. (Paris)*, 61 Suppl 1, 148.
- LeDoux, J. E., Sakaguchi, A. & Reis, D.J. (1984) Subcortical efferent projections of the medial geniculate nucleus mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. *J. Neurosci.*, 4, 683-698.
- Ledoux, J. E., Ruggiero, D.A. & Reis, D.J. (1985) Projections to the subcortical forebrain from anatomically defined regions of the medial geniculate body in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 242, 182-213.
- Ledoux, J. E., Iwata, J., Pearl, D. & Reis, D.J. (1986) Disruption of auditory but not visual learning by destruction of intrinsic neurons in the rat medial geniculate body. *Brain Res.*, 371, 395-399.

- LeDoux, J. (2007) The amygdala. *Curr. Biol.*, 17, R868-74.
- Li, L. B., Chen, N., Ramamoorthy, S., Chi, L., Cui, X.N., Wang, L.C. & Reith, M.E. (2004) The role of N-glycosylation in function and surface trafficking of the human dopamine transporter. *J. Biol. Chem.*, 279, 21012-21020.
- Lin, Z., Zhang, P.W., Zhu, X., Melgari, J.M., Huff, R., Spieldoch, R.L. & Uhl, G.R. (2003) Phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase C, and MEK1/2 kinase regulation of dopamine transporters (DAT) require N-terminal DAT phosphoacceptor sites. *J. Biol. Chem.*, 278, 20162-20170.
- Lindvall, O. & Bjorklund, A. (1974) The organization of the ascending catecholamine neuron systems in the rat brain as revealed by the glyoxylic acid fluorescence method. *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, 412, 1-48.
- Lindvall, O. (1975) Mesencephalic dopaminergic afferents to the lateral septal nucleus of the rat. *Brain Res.*, 87, 89-95.
- Lindvall, O. & Bjorklund, A. (1978) Anatomy of the dopaminergic neuron systems in the rat brain. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.*, 19, 1-23.
- Lindvall, O. & Bjorklund, A. (1979) Dopaminergic innervation of the globus pallidus by collaterals from the nigrostriatal pathway. *Brain Res.*, 172, 169-173.
- Lopez-Real, A., Rodriguez-Pallares, J., Guerra, M.J. & Labandeira-Garcia, J.L. (2003) Localization and functional significance of striatal neurons immunoreactive to aromatic L-amino acid decarboxylase or tyrosine hydroxylase in rat parkinsonian models. *Brain Res.*, 969, 135-146.
- Lorang, D., Amara, S.G. & Simerly, R.B. (1994) Cell-type-specific expression of catecholamine transporters in the rat brain. *J. Neurosci.*, 14, 4903-4914.
- Lynd-Balta, E. & Haber, S.N. (1994) The organization of midbrain projections to the ventral striatum in the primate. *Neuroscience*, 59, 609-623.
- Mallo, T., Alntoa, A., Koiv, K., Tonissaar, M., Eller, M. & Harro, J. (2007) Rats with persistently low or high exploratory activity: Behaviour in tests of anxiety and depression, and extracellular levels of dopamine. *Behav. Brain Res.*, 177, 269-281.
- Manahan-Vaughan, D. & Kulla, A. (2003) Regulation of depotentiation and long-term potentiation in the dentate gyrus of freely moving rats by dopamine D2-like receptors. *Cereb. Cortex*, 13, 123-135.
- Marsden, C. A. (2006) Dopamine: The rewarding years. *Br. J. Pharmacol.*, 147 Suppl 1, S136-44.

- Martinez-Garcia, F., Martinez-Marcos, A. & Lanuza, E. (2002) The pallial amygdala of amniote vertebrates: Evolution of the concept, evolution of the structure. *Brain Res. Bull.*, 57, 463-469.
- Martinez-Garcia, F., Novejarque, A. & Lanuza, E. (2007) Evolution of the amygdala in vertebrates. In Kaas, J. H. (ed), *Evolution of Nervous Systems. A Comprehensive Reference*. Elsevier Academic Press, Oxford, pp. 255–334.
- Martinez-Garcia, F., Novejarque, A. & Lanuza, E. (2008) Two interconnected functional systems in the amygdala of amniote vertebrates. *Brain Res. Bull.*, 75, 206-213.
- Meisenzahl, E. M., Schmitt, G.J., Scheuerecker, J. & Moller, H.J. (2007) The role of dopamine for the pathophysiology of schizophrenia. *Int. Rev. Psychiatry.*, 19, 337-345.
- Meister, B. & Elde, R. (1993) Dopamine transporter mRNA in neurons of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*, 58, 388-395.
- Melikian, H. E. & Buckley, K.M. (1999) Membrane trafficking regulates the activity of the human dopamine transporter. *J. Neurosci.*, 19, 7699-7710.
- Meredith, G. E., Farrell, T., Kellaghan, P., Tan, Y., Zahm, D.S. & Totterdell, S. (1999) Immunocytochemical characterization of catecholaminergic neurons in the rat striatum following dopamine-depleting lesions. *Eur. J. Neurosci.*, 11, 3585-3596.
- Mitsuma, T., Rhue, H., Hirooka, Y., Kayama, M., Wago, T., Takagi, J., Adachi, K., Ping, J., Ohtake, M., Nogimori, T. & Sakai, J. (1998) Distribution of dopamine transporter in the rat: An immunohistochemical study. *Endocr. Regul.*, 32, 71-75.
- Miura, H., Qiao, H., Kitagami, T., Ohta, T. & Ozaki, N. (2005) Fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, suppresses tetrahydrobiopterin levels and dopamine as well as serotonin turnover in the mesoprefrontal system of mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 177, 307-314.
- Moga, M. M., Saper, C.B. & Gray, T.S. (1989) Bed nucleus of the stria terminalis: Cytoarchitecture, immunohistochemistry, and projection to the parabrachial nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 283, 315-332.
- Montague, P. R., Dayan, P. & Sejnowski, T.J. (1996) A framework for mesencephalic dopamine systems based on predictive hebbian learning. *J. Neurosci.*, 16, 1936-1947.
- Moore, R. Y. (1978) Catecholamin innervation of the basal forebrain. I. the septal area. *J. Comp. Neurol.*, 177, 665-684.
- Moore, R. Y. & Bloom, F.E. (1978) Central catecholamine neuron systems: Anatomy and physiology of the dopamine systems. *Annu. Rev. Neurosci.*, 1, 129-169.

- Moron, J. A., Brockington, A., Wise, R.A., Rocha, B.A. & Hope, B.T. (2002) Dopamine uptake through the norepinephrine transporter in brain regions with low levels of the dopamine transporter: Evidence from knock-out mouse lines. *J. Neurosci.*, 22, 389-395.
- Mundorf, M. L., Joseph, J.D., Austin, C.M., Caron, M.G. & Wightman, R.M. (2001) Catecholamine release and uptake in the mouse prefrontal cortex. *J. Neurochem.*, 79, 130-142.
- Nader, K. & Ledoux, J.E. (1999) The dopaminergic modulation of fear: Quinpirole impairs the recall of emotional memories in rats. *Behav. Neurosci.*, 113, 152-165.
- Nauta, W. J. (1956) An experimental study of the fornix system in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 104, 247-271.
- Nauta, W. J. (1958) Hippocampal projections and related neural pathways to the midbrain in the cat. *Brain*, 81, 319-340.
- Nauta, W. J. (1960) Limbic system and hypothalamus: Anatomical aspects. *Physiol. Rev. Suppl.*, 4, 102-104.
- Nestler, E. J. & Carlezon, W.A., Jr (2006) The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol. Psychiatry*, 59, 1151-1159.
- Nobin, A. & Bjorklund, A. (1973) Topography of the monoamine neuron systems in the human brain as revealed in fetuses. *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, 388, 1-40.
- Oades, R. D. & Halliday, G.M. (1987) Ventral tegmental (A10) system: Neurobiology. 1. anatomy and connectivity. *Brain Res.*, 434, 117-165.
- Olinicy, A. & Stevens, K.E. (2007) Treating schizophrenia symptoms with an alpha7 nicotinic agonist, from mice to men. *Biochem. Pharmacol.*, 74, 1192-1201.
- Otmakhova, N. A. & Lisman, J.E. (1998) D1/D5 dopamine receptors inhibit depotentiation at CA1 synapses via cAMP-dependent mechanism. *J. Neurosci.*, 18, 1270-1279.
- Papez, J. W. (1932) The nucleus of the mammillary peduncle. *Anat. Rec.*
- Pare, D. & Smith, Y. (1994) GABAergic projection from the intercalated cell masses of the amygdala to the basal forebrain in cats. *J. Comp. Neurol.*, 344, 33-49.
- Pare, D., Quirk, G.J. & Ledoux, J.E. (2004) New vistas on amygdala networks in conditioned fear. *J. Neurophysiol.*, 92, 1-9.
- Parkinson, J. (1817) *An essay on the shaking palsy.* .
- Paxinos, G. & Franklin, K. B. J. (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, San Diego.

- Pearson, J., Goldstein, M., Markey, K. & Brandeis, L. (1983) Human brainstem catecholamine neuronal anatomy as indicated by immunocytochemistry with antibodies to tyrosine hydroxylase. *Neuroscience*, 8, 3-32.
- Pecina, S., Cagniard, B., Berridge, K.C., Aldridge, J.W. & Zhuang, X. (2003) Hyperdopaminergic mutant mice have higher "wanting" but not "liking" for sweet rewards. *J. Neurosci.*, 23, 9395-9402.
- Pickel, V. M. (2000) Extrasynaptic distribution of monoamine transporters and receptors. *Prog. Brain Res.*, 125, 267-276.
- Pickel, V. M., Specht, L.A., Sumal, K.K., Joh, T.H., Reis, D.J. & Hervonen, A. (1980) Immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in the human fetal nervous system. *J. Comp. Neurol.*, 194, 465-474.
- Porrino, L. J. & Goldman-Rakic, P.S. (1982) Brainstem innervation of prefrontal and anterior cingulate cortex in the rhesus monkey revealed by retrograde transport of HRP. *J. Comp. Neurol.*, 205, 63-76.
- Porritt, M. J., Batchelor, P.E., Hughes, A.J., Kalnins, R., Donnan, G.A. & Howells, D.W. (2000) New dopaminergic neurons in parkinson's disease striatum. *Lancet*, 356, 44-45.
- Reiner, A. (1994) Catecholaminergic innervation of the basal ganglia in mammals: Anatomy and function In Smeets, W. J. A. J. & Reiner, A. (eds), *Phylogeny and Development of Catecholamine Systems in the CNS of Vertebrates*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 247-272.
- Revay, R., Vaughan, R., Grant, S. & Kuhar, M.J. (1996) Dopamine transporter immunohistochemistry in median eminence, amygdala, and other areas of the rat brain. *Synapse*, 22, 93-99.
- Risold, P. Y. & Swanson, L.W. (1997) Chemoarchitecture of the rat lateral septal nucleus. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 19;24, 91-113.
- Robbins, T. W. (2005) Role of cortical and striatal dopamine in cognitive function. In Dunnett, S. B., Bentivoglio, A. R., Bjorklund, A. & Hokfelt, T. (eds), *Dopamine*. Elsevier, .
- Rodrigo, J., Fernandez, P., Bentura, M.L., de Velasco, J.M., Serrano, J., Uttenthal, O. & Martinez-Murillo, R. (1998) Distribution of catecholaminergic afferent fibres in the rat globus pallidus and their relations with cholinergic neurons. *J. Chem. Neuroanat.*, 15, 1-20.
- Ross, R. A., Judd, A.B., Pickel, V.M., Joh, T.H. & Reis, D.J. (1976) Strain-dependent variations in number of midbrain dopaminergic neurones. *Nature*, 264, 654-656.

- Ruggiero, D. A., Baker, H., Joh, T.H. & Reis, D.J. (1984) Distribution of catecholamine neurons in the hypothalamus and preoptic region of mouse. *J. Comp. Neurol.*, 223, 556-582.
- Sakanaka, M., Shibasaki, T. & Lederis, K. (1986) Distribution and efferent projections of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in the rat amygdaloid complex. *Brain Res.*, 382, 213-238.
- Samuvel, D. J., Jayanthi, L.D., Manohar, S., Kaliyaperumal, K., See, R.E. & Ramamoorthy, S. (2008) Dysregulation of dopamine transporter trafficking and function after abstinence from cocaine self-administration in rats: Evidence for differential regulation in caudate putamen and nucleus accumbens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 325, 293-301.
- Scatton, B., Zivkovic, B. & Dedek, J. (1980) Antidopaminergic properties of yohimbine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 215, 494-499.
- Schenk, J. O. (2002) The functioning neuronal transporter for dopamine: Kinetic mechanisms and effects of amphetamines, cocaine and methylphenidate. *Prog. Drug Res.*, 59, 111-131.
- Selden, N. R., Everitt, B.J., Jarrard, L.E. & Robbins, T.W. (1991) Complementary roles for the amygdala and hippocampus in aversive conditioning to explicit and contextual cues. *Neuroscience*, 42, 335-350.
- Simon, H., Taghzouti, K. & Le Moal, M. (1986) Deficits in spatial-memory tasks following lesions of septal dopaminergic terminals in the rat. *Behav. Brain Res.*, 19, 7-16.
- Smeets, W. J. & Gonzalez, A. (1990) Are putative dopamine-accumulating cell bodies in the hypothalamic periventricular organ a primitive brain character of non-mammalian vertebrates? *Neurosci. Lett.*, 114, 248-252.
- Smeets, W. J. & Steinbusch, H.W. (1990) New insights into the reptilian catecholaminergic systems as revealed by antibodies against the neurotransmitters and their synthetic enzymes. *J. Chem. Neuroanat.*, 3, 25-43.
- Smeets, W. J. A. J. & Reiner, A. (1994) *Phylogeny and Development of Catecholamine Systems in the CNS of Vertebrates*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Specht, L. A., Pickel, V.M., Joh, T.H. & Reis, D.J. (1981a) Fine structure of the nigrostriatal anlage in fetal rat brain by immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase. *Brain Res.*, 218, 49-65.
- Specht, L. A., Pickel, V.M., Joh, T.H. & Reis, D.J. (1981b) Light-microscopic immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase in prenatal rat brain. II. late ontogeny. *J. Comp. Neurol.*, 199, 255-276.

- Stein, L., Xue, B.G. & Belluzzi, J.D. (1993) A cellular analogue of operant conditioning. *J. Exp. Anal. Behav.*, 60, 41-53.
- Stein, L., Xue, B.G. & Belluzzi, J.D. (1994) In vitro reinforcement of hippocampal bursting: A search for skinner's atoms of behavior. *J. Exp. Anal. Behav.*, 61, 155-168.
- Stevens, J., Wilson, K. & Foote, W. (1974) GABA blockade, dopamine and schizophrenia: Experimental studies in the cat. *Psychopharmacologia*, 39, 105-119.
- Stevens, J. R. & Livermore, A., Jr (1978) Kindling of the mesolimbic dopamine system: Animal model of psychosis. *Neurology*, 28, 36-46.
- Swanson, L. W. & Cowan, W.M. (1977) An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 172, 49-84.
- Swanson, L. W. (1982) The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: A combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res. Bull.*, 9, 321-353.
- Swanson, L. W. & Risold, P. Y. (1999) On the basic architecture of the septal region. In Numan, R. (ed), *The Behavioral Neuroscience of the Septal Region*. Springer, New York, pp. 1-14.
- Swerdlow, N. R. & Geyer, M.A. (1998) Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia. *Schizophr. Bull.*, 24, 285-301.
- Takao, K., Yamasaki, N. & Miyakawa, T. (2007) Impact of brain-behavior phenotyping of genetically-engineered mice on research of neuropsychiatric disorders. *Neurosci. Res.*, 58, 124-132.
- Tande, D., Hoglinger, G., Debeir, T., Freundlieb, N., Hirsch, E.C. & Francois, C. (2006) Nucleus accumbens dopamine neurons in MPTP-treated macaques result from a phenotypic shift and not neurogenesis. *Brain*, 129, 1194-1200.
- Tarnok, Z., Ronai, Z., Gervai, J., Kereszturi, E., Gadoros, J., Sasvari-Szekely, M. & Nemoda, Z. (2007) Dopaminergic candidate genes in tourette syndrome: Association between tic severity and 3' UTR polymorphism of the dopamine transporter gene. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.*, 144B, 900-905.
- Tillet, Y. (1994) Catecholaminergic neuronal systems in the diencephalon of mammals. In Smeets W. J. A. J & Reiner, A. (eds), *Phylogeny and Development of Catecholamine Systems in the CNS of Vertebrates*. Cambridge University Press, Cambridge, .

- Toda, M. & Abi-Dargham, A. (2007) Dopamine hypothesis of schizophrenia: Making sense of it all. *Curr. Psychiatry Rep.*, 9, 329-336.
- Tsai C. (1925) The optic tract and centers of the opossum, *didelphis virginiana*. *J. Comp. Neurol*, 39, 173-216.
- Turiault, M., Parnaudeau, S., Milet, A., Parlato, R., Rouzeau, J.D., Lazar, M. & Tronche, F. (2007) Analysis of dopamine transporter gene expression pattern -- generation of DAT-iCre transgenic mice. *FEBS J.*, 274, 3568-3577.
- Ugrumov, M., Melnikova, V., Ershov, P., Balan, I. & Calas, A. (2002) Tyrosine hydroxylase- and/or aromatic L-amino acid decarboxylase-expressing neurons in the rat arcuate nucleus: Ontogenesis and functional significance. *Psychoneuroendocrinology*, 27, 533-548.
- van den Pol, A. N., Herbst, R.S. & Powell, J.F. (1984) Tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons of the hypothalamus: A light and electron microscopic study. *Neuroscience*, 13, 1117-1156.
- van Vulpén, E. H., Yang, C.R., Nissen, R. & Renaud, L.P. (1999) Hypothalamic A14 and A15 catecholamine cells provide the dopaminergic innervation to the supraoptic nucleus in rat: A combined retrograde tracer and immunohistochemical study. *Neuroscience*, 93, 675-680.
- Vandenbergh, D. J., Persico, A.M., Hawkins, A.L., Griffin, C.A., Li, X., Jabs, E.W. & Uhl, G.R. (1992) Human dopamine transporter gene (DAT1) maps to chromosome 5p15.3 and displays a VNTR. *Genomics*, 14, 1104-1106.
- Verney, C., Baulac, M., Berger, B., Alvarez, C., Vigny, A. & Helle, K.B. (1985) Morphological evidence for a dopaminergic terminal field in the hippocampal formation of young and adult rat. *Neuroscience*, 14, 1039-1052.
- Voorn, P., Kalsbeek, A., Jorritsma-Byham, B. & Groenewegen, H.J. (1988) The pre- and postnatal development of the dopaminergic cell groups in the ventral mesencephalon and the dopaminergic innervation of the striatum of the rat. *Neuroscience*, 25, 857-887.
- Weihe, E., Depboylu, C., Schutz, B., Schafer, M.K. & Eiden, L.E. (2006) Three types of tyrosine hydroxylase-positive CNS neurons distinguished by dopa decarboxylase and VMAT2 co-expression. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 26, 659-678.
- Yeh, C. B., Lee, C.H., Chou, Y.H., Chang, C.J., Ma, K.H. & Huang, W.S. (2006) Evaluating dopamine transporter activity with <sup>99m</sup>Tc-TRODAT-1 SPECT in drug-naïve tourette's adults. *Nucl. Med. Commun.*, 27, 779-784.
- Yoon, D. Y., Gause, C.D., Leckman, J.F. & Singer, H.S. (2007) Frontal dopaminergic abnormality in tourette syndrome: A postmortem analysis. *J. Neurol. Sci.*, 255, 50-56.

- Zaborszky, L. & Vadasz, C. (2001) The midbrain dopaminergic system: Anatomy and genetic variation in dopamine neuron number of inbred mouse strains. *Behav. Genet.*, 31, 47-59.
- Zeiss, C. J. (2005) Neuroanatomical phenotyping in the mouse: The dopaminergic system. *Vet. Pathol.*, 42, 753-773.
- Zheng, F., Gallagher, J.P. & Connor, J.A. (1996) Activation of a metabotropic excitatory amino acid receptor potentiates spike-driven calcium increases in neurons of the dorsolateral septum. *J. Neurosci.*, 16, 6079-6088.



**Capítulo II:**

**La vía meso-cortico-límbica del ratón:  
organización y aferencias.**



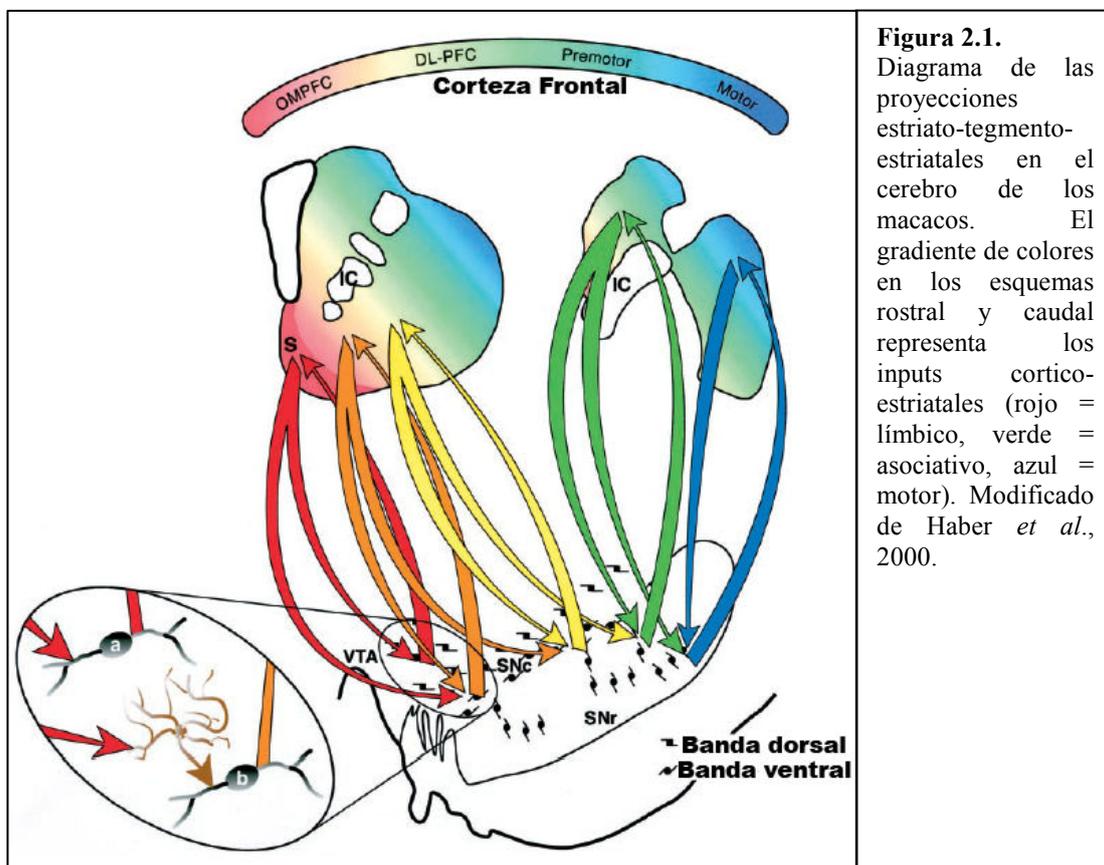
## **Introducción**

Numerosas evidencias indican que la vía meso-cortico-límbica juega un papel crucial en la respuesta a estímulos reforzantes, así como en el aprendizaje relativo a los estímulos predictores de refuerzos (Schultz, 1998). Esta vía se origina en las células dopaminérgicas del VTA, que por tanto deben recibir información sobre los estímulos reforzantes. En nuestro trabajo hemos optado por utilizar estímulos reforzantes quimiosensoriales de dos tipos: gustativos (el sabor dulce de una solución de sacarosa) y vomeronasales (feromonas sexuales). Sin embargo la información disponible en la literatura científica no nos permite postular una hipótesis sobre cómo llega la información quimiosensorial a la vía meso-cortico-límbica, en particular al VTA. El VTA ha de integrar una gran variedad de *inputs* con información multimodal que permita una respuesta a los estímulos de relevancia biológica. La integración de toda esta información es capaz de provocar cambios sincrónicos en la actividad eléctrica del VTA y la liberación de DA en sus áreas diana, como el Acb y la corteza prefrontal (Rebec *et al.*, 1997; Schultz *et al.*, 1997).

Pese a ser una proyección tan relevante desde el punto de vista funcional, es destacable que nuestros conocimientos sobre la organización de la vía meso-cortico-límbica y sus aferencias (así como de sus eferencias) se basan fundamentalmente en estudios en ratas relativamente antiguos de las aferencias (Phillipson, 1979) y eferencias (Swanson, 1982, aunque estudios posteriores las han confirmado; Ikemoto, 2007) del VTA. Recientemente, Geisler y Zahm (2005) reestudiaron las aferencias del VTA de la rata con técnicas más modernas y descubrieron que diferentes grupos de neuronas estriato-palidales proyectan a las porciones medial y lateral del VTA. Las aferencias del VTA utilizan una variedad de neurotransmisores y neuromoduladores, incluyendo el glutamato, GABA, serotonina, acetilcolina, noradrenalina y neuropéptidos, tales como la sustancia P, la dinorfina, la encefalina, la orexina y neurotensina (Kalivas, 1993; Fadel & Deutch, 2002; Zahm *et al.*, 2001; Philpot *et al.*, 2005) ya que recibe de una gran variedad de grupos neuronales multimodales.

Por otro lado, el refuerzo como se entiende hoy en día también se ha dividido en numerosos componentes (Berridge & Robinson, 2003). Numerosos estudios de autoadministración intracraneal de drogas han ayudado a dibujar un mapa de las distintas áreas responsables de diferentes componentes del refuerzo dentro del VTA y el estriado ventral (Ikemoto & Wise, 2004). De esta manera, se observó que aunque las

ratas eran capaces de autoadministrarse anfetaminas en el *shell* medial del núcleo accumbens (AcbShM) no eran capaces de aprender si la autoadministración ocurría en el *shell* lateral (Ikemoto *et al.*, 2005). Sin embargo, sí que eran capaces de aprender la autoadministración de cocaína o anfetaminas en la parte medial del tubérculo olfativo (OT; Ikemoto *et al.*, 2005). De la misma manera, la lesión de los terminales dopaminérgicos en el OT medial impedía la formación de preferencia condicionada de lugar mediante la inyección intravenosa de estimulantes psicomotores (Sellings *et al.*, 2006). Así, parece que existe una relación funcional más estrecha entre las partes mediales del *shell* del Acb y el OT, que entre el *shell* y el área central del propio Acb. Desde el punto de vista anatómico, esta heterogeneidad medio-lateral también se había descrito previamente entre el tegmento del mesencéfalo y el estriado ventral (Fallon & Moore, 1978; Nauta *et al.*, 1978; Beckstead *et al.*, 1979; Newman & Winans, 1980; Phillipson & Griffiths, 1985; Brog *et al.*, 1993; Hasue & Shammah-Lagnado, 2002). Recientemente, un detallado estudio de la organización de las conexiones tegmento-estriatales demostró en macacos que la relación medio-lateral entre el tegmento y el estriado era de subida y bajada, ya que formaba lo que denominaron vías estriato-nigro-estriatales (Haber *et al.*, 2000). En este esquema, las partes mediales del estriado reciben



de la VTA medial y proyectan de vuelta a un nivel dorsal de neuronas del VTA (retroalimentación) y a una banda ventral situada lateralmente respecto al origen de la proyección anterior. A su vez este grupo de neuronas tegmentales proyectan a un área más lateral del estriado, formándose así una espiral (Fig 2.1).

Por tanto, en este estudio nos hemos planteado describir las aferencias del VTA, con especial énfasis en las vías por las que puede recibir información quimiosensorial, así como analizar en detalle la vía meso-cortico-límbica en el ratón, a fin de comprobar si existe esta organización medio-lateral en espiral descrita en primates. Para ello, nos proponemos estudiar la vía tegmento-estriatal inyectando trazadores neuronales (dextranaminas) en el VTA y zonas adyacentes, así como en los núcleos diana (Acb, corteza prefrontal, septum...). Las dextranaminas son carbohidratos de origen bacteriano que son endocitados por las neuronas sin alterar la funcionalidad de las mismas y pueden marcarse con moléculas fácilmente detectables, como la biotina o diversos fluorocromos. Hemos decidido utilizar las dextranaminas de peso molecular 10000 ya que se transportan tanto anterógrada como retrógradamente (Reiner *et al.*, 2000), obteniendo así tanto somas neuronales que proyectan al lugar de inyección como axones que parten del lugar de inyección. Esto nos ha permitido estudiar, en las mismas inyecciones, las aferencias y eferencias de diferentes porciones específicas del VTA, siempre teniendo en cuenta la limitación que supone el posible marcaje anterógrado debido a colaterales axónicas. Las inyecciones fueron realizadas en diferentes subáreas del VTA (Fig. 2.2), para intentar discriminar posibles heterogeneidades en la conectividad del VTA. Además, para discernir la marca que aparece al tocar áreas vecinas o fibras “de paso” en el VTA, hicimos algunas inyecciones control en áreas vecinas (substancia *nigra*, núcleo supramamilar, fascículo retroflejo...). Y lo complementamos con inyecciones en los sitios diana (núcleo accumbens, corteza prefrontal...) para confirmar mediante trazado retrógrado las conexiones descritas mediante el transporte anterógrado.

Con los datos obtenidos, pudimos observar un patrón de aferencias y eferencias común a todo el VTA, así como conexiones con el estriado ventral y la amígdala, donde existen heterogeneidades. Además, los datos muestran que en el ratón las conexiones tegmento-estriato-tegmentales forman (como en primates) una espiral entre ambos que sobrepasa el VTA y Acb, de manera que la información es procesada a un nivel diferente con cada vuelta de la espiral (ver más adelante). Además, parece que la espiral tiene un origen más medial de lo que se había propuesto hasta ahora.

Para describir el marcaje anterógrado y retrógrado en el telencéfalo distinguimos las áreas corticales (isocortex, paleocortex y arquicortex) y las áreas subcorticales, que describimos como complejos estriado-palidales compartimentalizados medio-lateralmente. Así, consideramos el septum lateral como la división más medial del estriado (Risold & Swanson, 1997; Lanuza *et al*, 2002; Lanuza & Martinez-Garcia, 2009) y el septum medial/banda diagonal como el pálido medial correspondiente. El estriado ventral lo consideramos compuesto por el Acb y OT. Finalmente, describiremos aparte la amígdala puesto que es una estructura de origen mixto, palio-subpalial.

## **Material y métodos**

### **Animales de experimentación**

El presente estudio se realizó utilizando hembras de ratón de las cepas CD-1 y C57/BL (Harlan, Barcelona, España) que fueron tratadas de acuerdo con las directrices EEC de las Directivas del Consejo de la Comunidad Europea del 24 de Noviembre de 1986 (86/609/EEC).

### **Trazado neuroanatómico**

Para estudiar la conectividad del VTA utilizamos dos trazadores distintos: dextranamina biotinilada (BDA, peso molecular 10.000; Molecular Probes, Eugene, OR) y dextranamina marcada con tetrametil rodamina (RDA, peso molecular 10,000, lysine fixable; Fluoro-Ruby; Molecular Probes). Para minimizar el número de animales utilizado, en la mayoría de los casos cada animal recibió una inyección de uno de los trazadores en el lado izquierdo del encéfalo y del otro trazador en el derecho. Por ello, cada inyección se denomina con el código del animal (M, más los dos últimos dígitos del año, más el número ordinal) seguido de una letra B, cuando el trazador era BDA, o R cuando era RDA.

Las inyecciones se dirigieron a diversas porciones del VTA (n = 14, Fig 2.2) para analizar la presencia de heterogeneidades en las conexiones del VTA. Además realizamos algunas inyecciones de control en las áreas vecinas (sustancia nigra, n = 1; núcleo supramamillar, n = 2; área prerrubra, n = 1; núcleo interpeduncular, n = 2; núcleo reticulopontino, n = 1; fascículo retroflejo, n = 1) para poder comprobar si parte del marcaje encontrado tras inyecciones en el VTA era debido a la difusión del trazador a áreas vecinas. Por último, complementamos nuestros experimentos con inyecciones en los centros diana de las proyecciones del VTA y en sus centros aferentes (núcleo accumbens, n = 6; corteza prefrontal, n = 4; septum, n = 2; amígdala, n = 2; caudatus putamen, n = 3), para comprobar las conexiones demostradas por transporte de trazadores desde inyecciones en el VTA y descartar los problemas de captación por fibras de paso o el marcaje a través de colaterales axónicas desde centros aferentes.

Los trazadores se inyectaron estereotáxicamente mientras los animales estaban profundamente anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg i.p.). También se inyectó sulfato de atropina (0.4 mg/kg) para evitar una depresión respiratoria excesiva. Una vez anestesiados, los ratones fueron colocados en un marco estereotáxico y se trepanó el cráneo en las coordenadas apropiadas, según el atlas de Paxinos y Franklin

(2001) para los ratones de C57BL (para los ratones CD-1 las coordenadas fueron modificadas levemente cuando fue necesario).

Las dextranaminas se inyectaron por ionoforesis desde una solución al 5-10% en tampón fosfato 10 mM (pH 7.4) a través de micropipetas cuya punta tenía un diámetro interno de 10  $\mu\text{m}$ , usando un corriente continua positiva de 3  $\mu\text{A}$  administrada en pulsos cuadrados (7 segundos on/off.) durante 10 min. Se aplicó una corriente de retención durante la entrada y la salida de la micropipeta, para evitar la difusión del trazador. Después de 7-8 días de supervivencia, los ratones fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital sódico (140 mg/kg) y se perfundieron a través del ventrículo cardíaco izquierdo con tampón fosfato salino al 0.9% (PBS) durante 3 minutos a 5.5 ml/min, seguido por el PBS con formaldehído al 4% (pH 7.4) durante 15 min al mismo flujo. Tras extraerlos con sumo cuidado, los cerebros se postfijaron durante 4 horas en el mismo fijador a 4°C y se crioprotegieron en sacarosa al 30% hasta que se hundieron. Usando un microtomo de congelación obtuvimos secciones coronales de 40  $\mu\text{m}$  de los encéfalos con las que confeccionamos cinco series paralelas.

Para la detección histoquímica de los trazadores las secciones se mantuvieron en agitación suave en un rotor horizontal. Tras la inhibición de las peroxidasas endógena con una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 1% durante 30 minutos, para la detección de la BDA incubamos las secciones flotantes en el complejo peroxidasa-avidina-biotina en TBS con un 0.3% Tritón X-100 (TBS-Tx), durante la noche a 4°C o por 2 horas a temperatura ambiente. La marca de la peroxidasa fue revelada con el DAB-Ni como se describe anteriormente en el capítulo I. La RDA fue detectada mediante inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo primario específico contra la tetrametil rodamina (obtenido en conejo, Molecular Probes), diluido 1:4000 en TBS-Tx, seguido del procedimiento estándar de PAP (secundario contra IgG de conejo en cabra, 1:100 (Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, The Netherlands); PAP de conejo 1:800 (Nordic Immunological Labs.), y de la detección de la actividad peroxidasa con DAB, intensificada en ocasiones con sales de níquel.

La series, se montaron en portaobjetos sobre una solución de gelatina al 0.2% en tampón TRIS a pH 7.6 y tras secarse se contrastaron con azul de toluidina (2%).

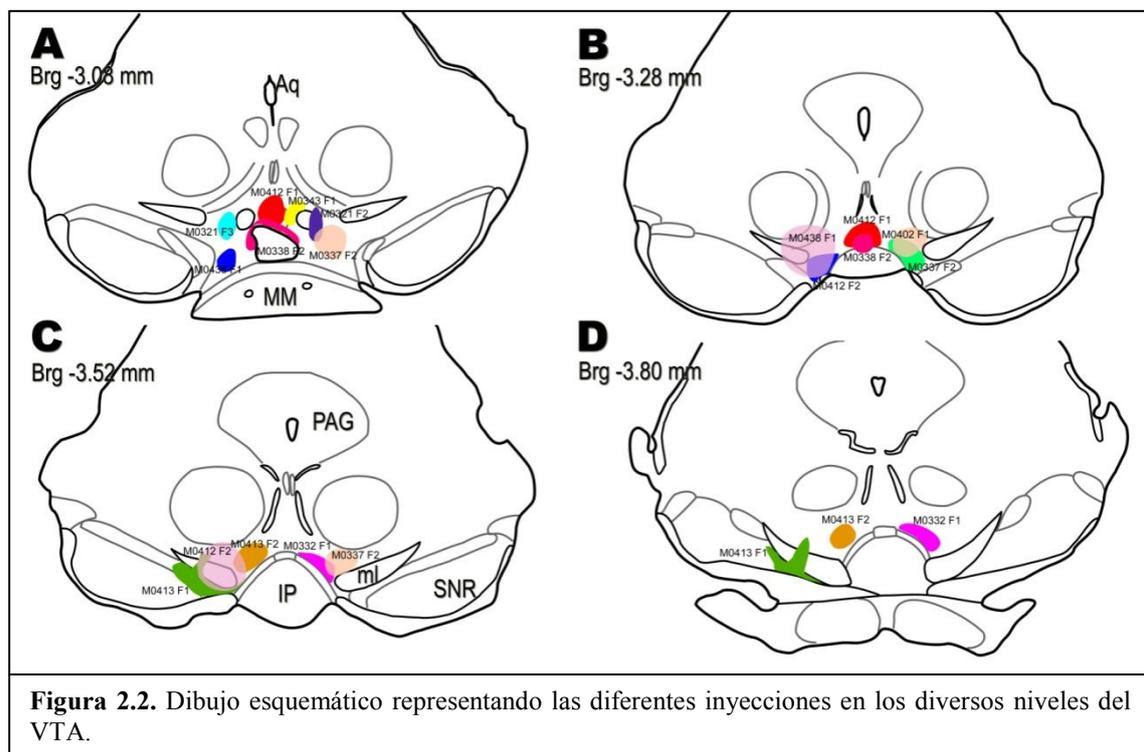
### **Análisis de los resultados**

De las preparaciones se obtuvieron fotografías digitales con una cámara Leica DC 300 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) acoplada a un microscopio Leitz DMRB

utilizando el software apropiado. Para la confección de láminas con aspecto homogéneo, se ajustó el brillo y el contraste de las imágenes originales con Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, Mountain View, CA). También se utilizó Adobe Photoshop para confeccionar mapas del marcaje, dibujando esquemáticamente en capas transparentes sucesivas el perfil de los cortes, los límites citoarquitectónicos, el marcaje retrógrado y el anterógrado, sobre las imágenes fotográficas originales a bajo aumento.

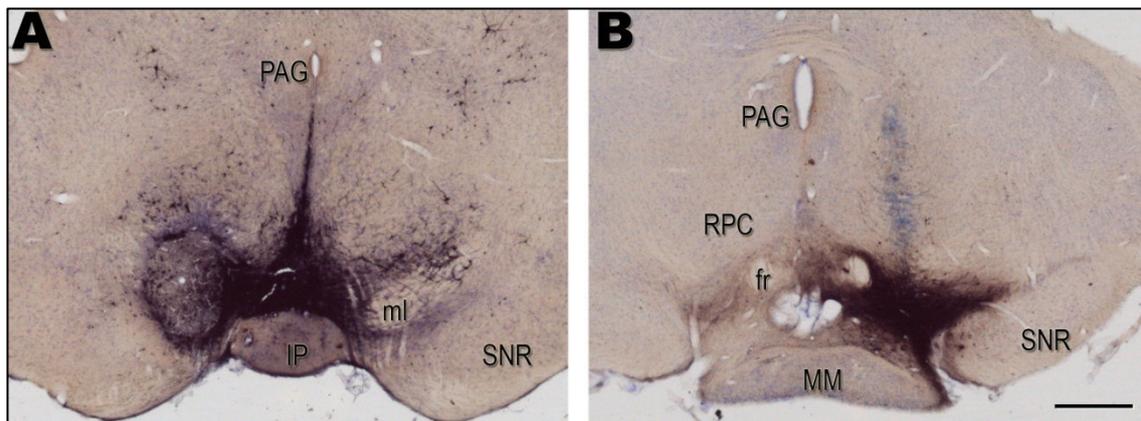
## Resultados

Todas las inyecciones en el VTA (Fig. 2.2) dieron lugar a abundante marcaje retrógrado en distintos centros rombencefálicos, mesencefálicos y prosencefálicos, incluyendo abundante marcaje anterógrado en el cortex y subcórtez del hemisferio cerebral ipsilateral, y en mucha menor medida, en el contralateral. Dada la organización topográfica medio-lateral de las proyecciones del VTA descritas en la rata por Geisler y Zahm (2005), hemos clasificado nuestras inyecciones en mediales y laterales, y las describimos por separado. Para cada grupo de inyecciones describiremos en primer lugar el marcaje retrógrado y después el marcaje fibrilar encontrado en el telencéfalo. En esta descripción, consideramos también inyecciones en centros vecinos al VTA, para descartar aquel marcaje que pudiera deberse a la difusión del trazador fuera de la VTA. Por último, analizamos algunas inyecciones en los sitios diana del telencéfalo para comprobar, mediante el transporte anterógrado, los resultados de transporte retrógrado tras inyecciones en la VTA y viceversa.



### 1. Inyecciones de trazador en el VTA medial

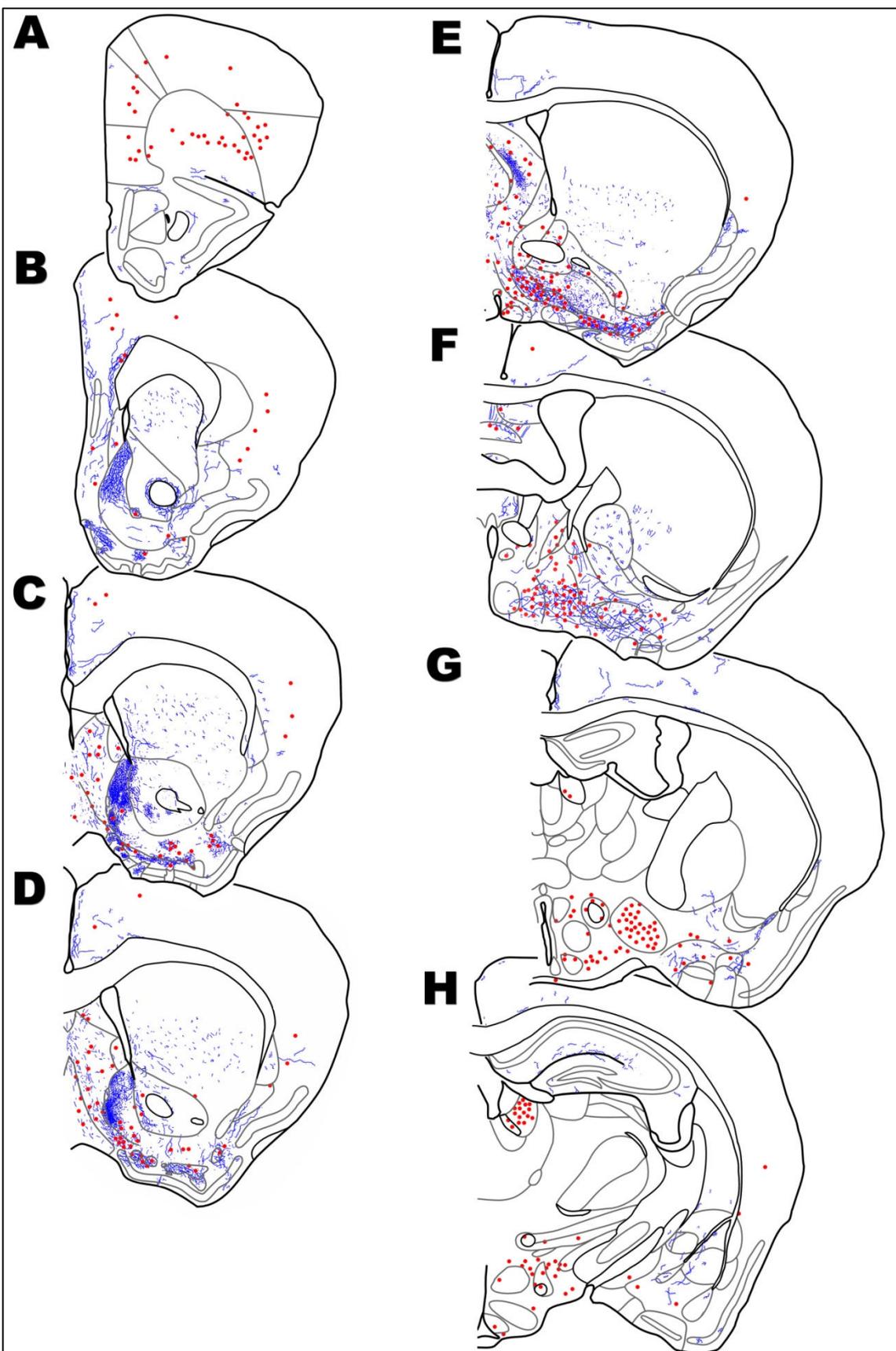
En nuestros experimentos conseguimos dos inyecciones centradas en la línea media del VTA y localizadas en niveles anteriores (M0412-B, restringida al VTA; M0333-R, afecta a una pequeña porción del IP), y una situada también medialmente en niveles anteriores, pero localizada ligeramente más lateral, (M0343-B; que afecta al fascículo retroflejo) (ver Fig. 2.3A). Para la descripción de los resultados de este tipo de inyecciones nos basamos en la inyección M0412-B (Fig. 2.4), si bien los resultados de las otras dos inyecciones son consistentes con los encontrados en ésta.



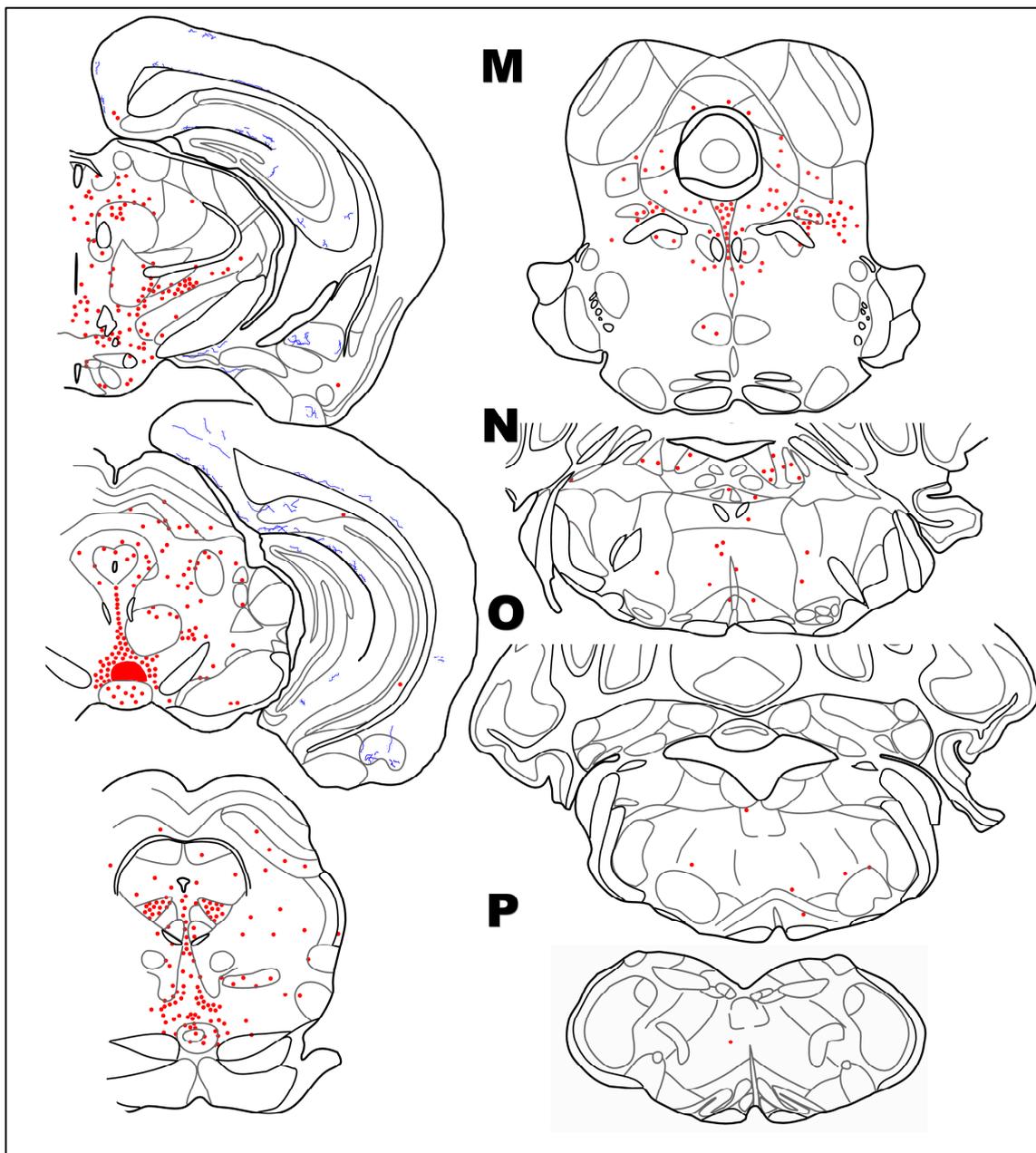
**Figura 2.3.** Fotomicrografías digitales de secciones transversales del mesencéfalo de ratón donde se han realizado dos inyecciones de BDA. Fig **A** muestra una inyección en la línea media del VTA (inyección M0412-B). Fig **B** muestra una inyección en la parte lateral del VTA (inyección M0338-B). BC: 500  $\mu$ m.

#### 1.a. Marcaje retrógrado (Fig. 2.3A-P)

El marcaje retrógrado en inyecciones mediales y laterales mostraba un patrón común característico de los niveles meso-pontinos, y un patrón bien diferente a nivel prosencefálico. A nivel meso-pontino, las neuronas marcadas retrógradamente conformaban tres columnas poco definidas en ambos lados del encéfalo (marcaje bilateral, por tanto) que recorrían este territorio caudo-rostralmente. La columna más medial la ocupaba la línea media (núcleo del rafe). La segunda columna estaba formada por células ventrolaterales de ubicación mayoritariamente periventricular, con algunas células dispersas en centros más distales. La tercera era una columna dorsolateral formada por células dispersas.



**Figura 2.4.** Dibujo esquemático de 15 secciones frontales del encéfalo del ratón M0412, en las que se ilustra el marcaje resultante de la una inyección de BDA en la línea media de la VTA (M0412-B) (mancha roja en J). En cada sección se han delimitando en gris los límites citoarquitectonicos y se representan como círculos rojos los somas marcados, y como líneas azules las fibras positivas para la BDA (marcaje anterógrado) en el prosencéfalo. Las secciones están ordenadas de anterior (A) a posterior (P).



A nivel pontino caudal, la columna medial estaba representada por neuronas marcadas en el núcleo pontino del rafe (PnR), en las diferentes divisiones del rafe dorsal (DR) y en el núcleo O, ó también llamado *nucleus incertus* (Fig 2.4M-N). La columna ventrolateral la conformaba una población relativamente densa de células marcadas en el área gris central pontina (CGPn) y en las agrupaciones celulares incluidas en la misma, entre ellas el núcleo laterodorsal tegmental (LDTg), el núcleo de Barrington (Bar) y el *locus coeruleus* (LC). A estas células hay que añadir células marcadas más dispersas en los núcleos parvocelular (PCRtA) e intermedio (IRT) de la formación reticular y, más rostralmente, en el núcleo dorsomedial tegmental (DMTg) y el núcleo *subcoeruleo* dorsal (SuCD). A niveles pontinos rostrales aparecía la columna dorsolateral representada por una población de células marcadas en el área parabraquial

(medial, MPB; lateral, LPB) y unas pocas neuronas dispersas en el núcleo supratrigeminal (Su5) (Fig. 2.4K).

En los niveles mesencefálicos caudales, la columna medial estaba compuesta por células marcadas en las divisiones rostrales del rafe dorsal (interfascicular, DRI; ventral DRV; dorsal, DRD) y en el rafe mediano (MnR) y paramediano (PMnR). La columna ventrolateral estaba compuesta por una población dispersa de células situadas en el LDTg anterior y, más rostralmente en la sustancia gris periacueductal ventrolateral (VLPAG). Por su parte, la columna dorsolateral la formaban las células marcadas del núcleo cuneiforme (CnF) y algunas neuronas neuronas intercaladas entre los fascículos del lemnisco lateral (probablemente en el núcleo del lemnisco lateral, LL).

En niveles ligeramente más rostrales, coincidentes con el colículo superior, el patrón de marcaje en columnas cambiaba gradualmente. Se mantenía la columna medial en forma de neuronas marcadas en el MnR y el núcleo linear caudal del rafe (CLi), y la ventrolateral representada por las células de la VLPAG y el núcleo supraoculomotor (Su3). La columna dorsolateral aparecía representada a esos niveles por células dispersas en el núcleo profundo del mesencéfalo (DpMe). Además empezaban a aparecer neuronas marcadas dispersas en la PAG dorsal y en las capas grises profunda e intermedia del colículo superior, que no se ajustaban a ninguna de las tres columnas Fig. 2.4K). A niveles aún más rostrales las neuronas marcadas en la PAG ocupaban las divisiones dorsal (DMPAG, DLPAG) y lateral (LPAG).

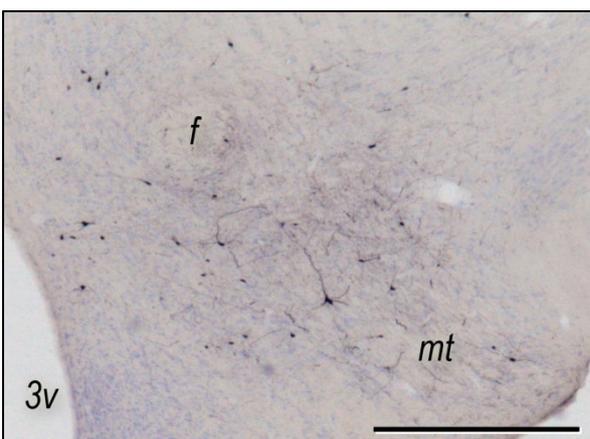
En las cercanías de la inyección, aparecían abundantes neuronas marcadas en núcleos adyacentes al VTA (Fig.2.4J) como en el núcleo interpeduncular (IP), la división compacta de la substantia nigra (SNC), el núcleo linear rostral del rafe (RLi) y más rostralmente, en el núcleo mamilar medial (MM) y lateral (ML), en los que la marca predominaba claramente en el lado de la inyección, y en el núcleo supramamilar (SuM) en donde la marca parecía bilateral. Igualmente, se observó un grupo denso de células intensamente marcadas en el área posterior hipotalámica (PH) cercana al lugar de inyección, que aparentemente presentaba continuidad con la población de células marcadas periacueductales (Fig.2.4I).

Este grupo de neuronas se continuaba anteriormente en el área periventricular del talámo, en donde el marcaje era bilateral (Fig.2.4I). A este nivel, el fascículo retroflejo (*fr*) presentaba abundantes fibras marcadas. En aquellas inyecciones que afectaron al *fr* a su paso por el VTA (M0343-B) las fibras marcadas ocupaban todo el *fr* ipsilateral a la inyección (y en mucha menor medida también el contralateral). Por el contrario, las

inyecciones más mediales que no afectaban directamente al fascículo, presentaban marcaje fibrilar restringido a la periferia del *fr*. En ambos casos, este marcaje anterógrado estaba acompañado de neuronas retrógradamente marcadas en el interior del *fr* y en las parte dorsal y medial del núcleo parafascicular (PF). Asociado al marcaje del *fr* se observa una densa población de neuronas retrógradamente marcadas en la habénula. Las inyecciones que afectaron al *fr* presentaban abundante marcaje bilateral en los dos núcleos de la habénula (medial MHb, y lateral LHb), mientras que en las inyecciones que no afectaban al *fr* el marcaje en la MHb era muy escaso.

A nivel diencefálico caudal, se observaron neuronas retrógradamente marcadas en la zona *incerta* (ZI) y núcleo *subincerto* (SubI; Fig.2.4H).

El hipotálamo, además del marcaje descrito en los núcleos mamilares, mostraba una importante población de neuronas marcadas en todas las inyecciones, bilateralmente pero con predominancia ipsilateral. La mayor parte de las neuronas marcadas se localizaban dispersas en toda el área hipotalámica lateral (LH) desde niveles tuberales a los preópticos (LPO; Fig.2.4F-G). En la LH llamaba la atención un grupo tuberal caudal situado entre el *fornix* y el tracto mamilotalámico cuyos arboles dendríticos mostraban una orientación muy clara en diagonal (Fig. 2.5). Además el hipotálamo presentaba una población menor de pequeñas neuronas marcadas en el compartimento medial, no circunscritas a núcleos específicos sino dispersas en el núcleo dorsomedial (DMH) y áreas colindantes dorsales al mismo y en el núcleo paraventricular, mayoritariamente en su división posterior (PaPo). Las inyecciones más grandes (p.e. M0412-B) también



**Figura 2.5.** Fotomicrografía digital de una sección transversal del hipotálamo tras una inyección en el VTA medial. Podemos observar varias neuronas marcadas entre el *fornix* y el tracto mamilotalámico. Bc: 500  $\mu$ m.

presentaban neuronas marcadas en otros núcleos del compartimento medial, como el ventromedial (VMH) y en la división posterior del núcleo anterior hipotalámico (AHP). A niveles del hipotálamo anterior-retroquiasmático, se observó bilateralmente otro grupo de células intensamente marcadas ventromediales al LH y ventrales al núcleo anterior hipotalámico (Fig. 2.4G).

La división preóptica del

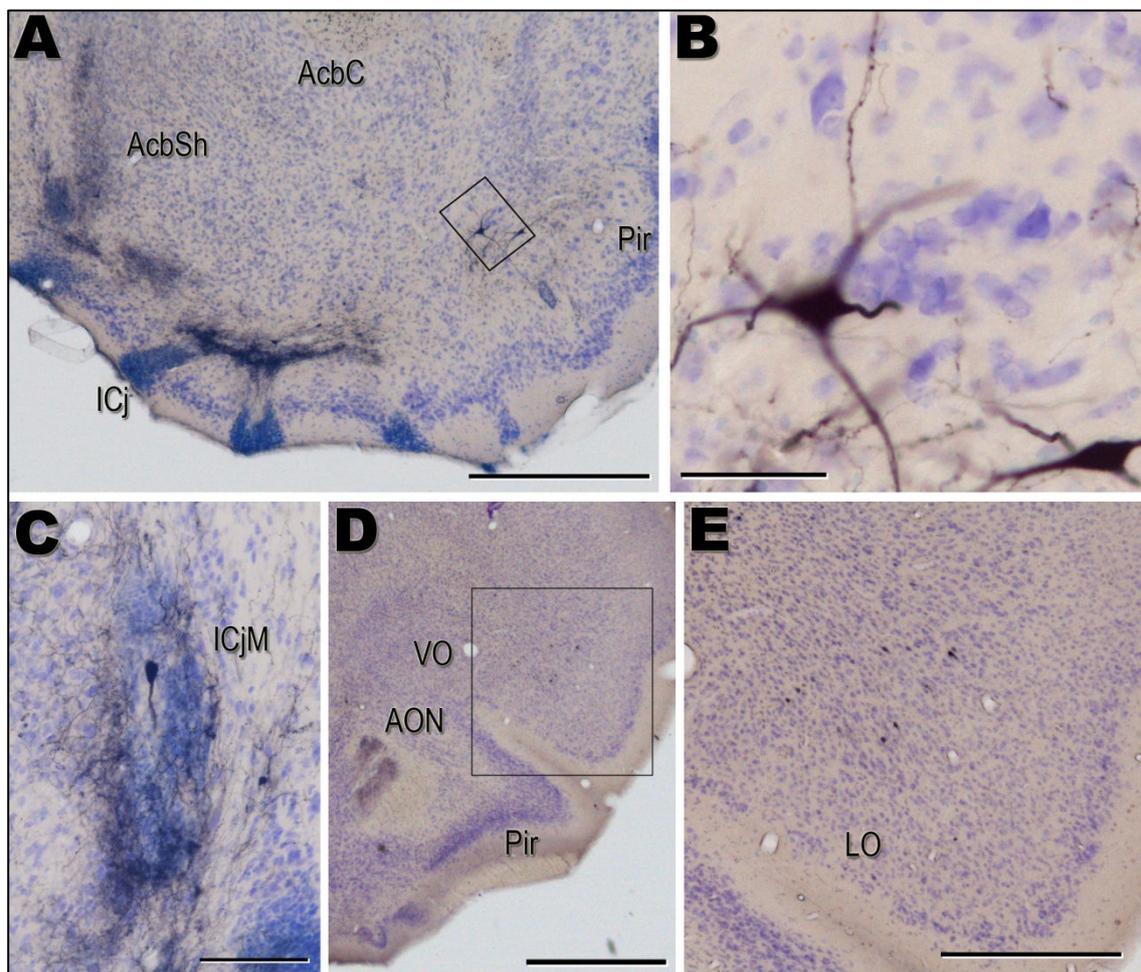
hipotálamo mostraba un densa población lateral (LPO) que incluía el núcleo magnocelular preóptico (MCPO), que parecía continuación rostral de la ya descrita en la LH (Fig.2.4F). Además, a diferencia de las otras divisiones antero-posteriores del hipotálamo, el área preóptica presenta una densa población medial que ocupaba el núcleo (MPO) y el área (MPA) preópticos mediales, y se extendía a las regiones más anteriores del hipotálamo, en donde ocupaba el núcleo periventricular antero-ventral (AVPe) y ventromedial preóptico (VMPO), la porción subcomisural del núcleo preóptico mediano (MnPO) y el núcleo preóptico anterodorsal (ADP).

Las inyecciones en el VTA medial mostraron marcaje retrógrado en todas las divisiones del telencéfalo, *pallium*, estriado y pálido. El telencéfalo cortical sólo mostraba neuronas marcadas en el isocórtex, en donde se localizaban fundamentalmente en las áreas frontales (medial e insular) aunque también se extendían en las áreas mediales más posteriores (Fig.2.4A-J).

Así, observamos algunas neuronas piramidales grandes de la capa 5 del cortex orbitofrontal medial (MO), ventral (VO) y lateral (LO), así como en el cortex insular (AI) adyacente (Fig. 2.4A-B y 2.6D-E). Las áreas prelímbica (PrL) e infralímbica (IL), el cortex cingular primario (Cg1) y el área motora secundaria (M2) también mostraban unas pocas células marcadas dispersas. Por último, observamos alguna neurona solitaria marcada retrógradamente en las capas intermedias del cortex cingular secundario (Cg2) y retrosplenial, granular (RSG) y agranular (RSA) (Fig. 2.4C-H).

El complejo estriado-palidal presentaba una gran concentración de neuronas marcadas retrógradamente. Así, el estriado-pálido medial, el septum, muestra abundantes neuronas marcadas en la división intermedia del septum lateral (LSI) y, en menor medida, en la ventral (LSV) (Fig. 2.4C-D). La parte palidal del septum aún mostraba mayor número de neuronas marcadas, localizadas en el septum medial (MS) y la porción vertical del núcleo de la banda diagonal (VDB), de donde se extendían rostralmente al núcleo semilunar (SL) (Fig. 2.4D-E). En la parte ventral del complejo estriado-palidal, también se apreciaban abundantes somas marcados. En el núcleo accumbens apenas se observaban neuronas marcadas en la parte anterior y en el *core* del Acb (AcbC). Por el contrario la corteza o *shell* del Acb (AcbSh) presentaba abundantes neuronas marcadas (Fig. 2.4D-E) (asociadas a campos terminales, como discutiremos más adelante) cuya localización dependía de la ubicación de la inyección en el VTA. Las inyecciones en la línea media del VTA (M0412-B) daban marcaje en el AcbSh medial (y en menor medida en el ventral), mientras que las de localización ligeramente

más lateral (junto al *fr*) tendían a mostrar neuronas marcadas en el AcbSh en posición más ventral. Es importante destacar que las neuronas marcadas del AcbSh ventral parecen estar localizadas en el límite con los puentes celulares del estriado ventral (CB) (Fig. 2.6A). Las neuronas del Acb y de los CB son de tamaño mediano y, cuando su árbol dendrítico está bien marcado, muestran morfología típicamente estriatal (estrelladas y espinosas). Por su parte, también observamos grandes neuronas retrógradamente marcadas en el pálido ventral (VP), en las que en ocasiones el marcaje permitió comprobar la organización típicamente palidal de su árbol dendrítico (gruesas dendritas lineales y poco ramificadas; Fig. 2.6B). En el OT no observamos ninguna célula marcada, pero si en algún islote de Calleja (ICj), en los que las neuronas

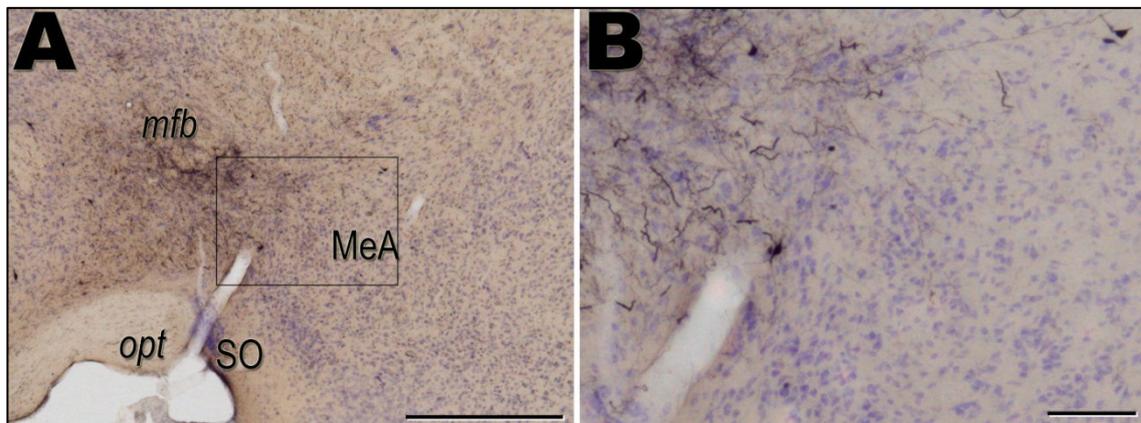


**Figura 2.6.** Fotomicrografías digitales de una sección transversal del estriado ventral tras una inyección en el VTA medial. En **A** observamos que los islotes de Calleja y el AcbShM reciben los axones marcados desde el VTA medial. Además observamos neuronas retrógradamente marcadas en el pálido ventral. Bc: 500  $\mu$ m. En **B** observamos un detalle de **A**, como un axón marcado va paralelo a una dendrita de la neurona marcada. Bc: 50  $\mu$ m. En **C** observamos una neurona marcada retrógradamente en el ICjM y una gran cantidad de axones marcados inervando el ICjM. Bc:100  $\mu$ m. En **D** observamos el marcaje retrógrado en el cortex orbitofrontal. Bc: 1 mm. En **E** observamos con mayor detalle el marcaje de **D**. Bc: 500  $\mu$ m.

marcadas siempre corresponden a las de tamaño intermedio o grande (Fig. 2.6C; Fallon, 1983).

En ninguna de estas inyecciones se observó marcaje retrógrado en el estriado dorsal ni en el pálido lateral. Sin embargo, en un caso (M0412-B) apareció denso marcaje retrógrado en la división medial del globo pálido (núcleo intrapeduncular).

Respecto a la amígdala, encontramos marca retrograda tanto en su división palial como subpalial (Martinez-Garcia et al., 2007). En ambas divisiones la marca era bilateral. En la amígdala palial, las inyecciones mediales en el VTA dieron escaso marcaje retrógrado formado por neuronas aisladas en el núcleo basomedial anterior (BMA), en el núcleo amigdalino cortical anterior (ACo), en ocasiones también en el núcleo del tracto olfativo lateral (LOT) adyacente y en la zona de transición cortico-amigdalina (CxA; Fig.2.4F-G). Ocasionalmente, algunos ejemplares también mostraban neuronas retrógradamente marcadas en las divisiones posterior (BLP) y anterior (BLA) el núcleo basolateral, y en la transición amigdalopiroforme (APir). Si bien su naturaleza palial o subpalial es una incógnita (Martínez-García *et al.*, 2007) el área anterior amigdalina mostraba un número moderado de neuronas marcadas tanto en su división dorsal (AAD), como en la ventral (AAV; Fig.2.4G). A estos niveles anteriores, algunas neuronas marcadas parecen estar asociadas a las masas intercaladas (I) más rostrales. En cuanto a la amígdala subpalial, el marcaje retrógrado era observable en la amígdala medial anterior (divisiones ventral, MeAV y dorsal, MeAD; Fig.2.4H). Es pertinente señalar que las neuronas marcadas en la MeA y en la AAV eran adyacentes al gran contingente de neuronas marcadas en la LH del hipotálamo anterior. De hecho, los



**Figura 2.7.** Fotomicrografías digitales de una sección transversal de la transición hipotálamo amígdala. En **A** observamos cómo se encuentran numerosos axones marcados en el tracto prosencefálico medial. Bc: 500  $\mu$ m. En **B** observamos un detalle de **A**, unos pocos somas de neuronas marcadas en la amígdala medial anterior y como los axones que penetran en ella parecen provenir del *mfb*. Bc: 100  $\mu$ m.

axones marcados de las neuronas de la amígdala anterior parecían cursar por el *mf* hacia la VTA (Fig. 2.7).

Pero sin duda, la principal fuente de aferencias amigdalinas a la VTA se encuentra en la amígdala extendida. Dentro de la amígdala extendida, se observaron unas pocas neuronas aisladas en la porción intraamigdalina del núcleo de la *stria terminalis* (BSTIA) en todas las inyecciones, mientras que la parte supracapsular del BST no presentaba marcaje. En el BST propiamente dicho, observamos marcaje retrógrado en su parte medial posterior (BSTMP; Fig.2.4F), medial ventral (BSTMV) y medial anterior (BSTMA). Igualmente la división lateral del BST mostró pequeñas neuronas marcadas retrógradamente, en sus subdivisiones ventral (BSTLV) y posterior (BSTLP). Por último, la parte sublenticular de la amígdala extendida (SLEA) presentaba una densa población de neuronas marcadas dispersas en la sustancia innominada sublenticular, con límites poco claros con estructuras adyacentes como el VP, LPO y MCPO.

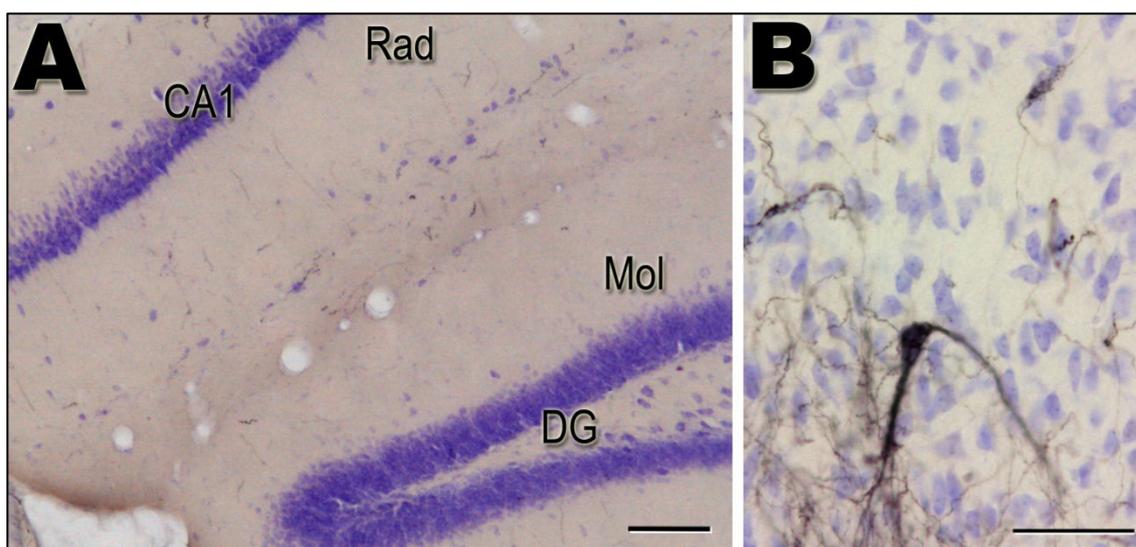
### **1.b. Marcaje anterógrado en el telencéfalo (Fig. 2.4A-I)**

Tras las inyecciones en la VTA medial, en el isocortex observamos fibras gruesas y lisas marcadas anterógradamente entrando en el cortex frontal a través de la taenia tecta dorsal (DTT) tanto por su capa 1 como por la capa 3 (Fig.2.4B). Estas fibras daban lugar a campos terminales en ambos hemisferios, que en general eran simétricos. Las fibras superficiales daban lugar a un plexo terminal conspicuo formado por finas fibras varicosas en la capa 1 (que se adentraba algo en capa 2) de las áreas corticales mediales. Este plexo fibrilar era más denso en las áreas DP, IL, PrL, Cg1 y Cg2, menos denso en el cortex motor secundario (M2) y en el cortex orbitario medial (MO) y escaso en el cortex motor primario (M1), en donde el marcaje aparecía sólo ipsilateral a la inyección (Fig.2.4A-F). A su vez, las fibras marcadas que ingresaban por la capa 3 de la DTT daban lugar a un plexo terminal que se extendía en las capas profundas de las mismas áreas corticales. Por el contrario, las capas intermedias de las áreas frontales mediales presentaban pocas fibras aisladas. Algunas fibras marcadas parecían ingresar directamente en la sustancia blanca del cortex frontal por la que corrían lateralmente hasta alcanzar el cortex insular agranular y el claustró, en los que aparecían fibras marcadas dispersas con aspecto terminal (Fig.2.4B-E). Las fibras gruesas que discurren por la capa 1 del cortex medial, parecían recorrerlo en dirección caudal hasta alcanzar el cortex retrosplenial, en donde daban lugar a pequeñas arborizaciones terminales. A

estos niveles, también se observaban fibras marcadas en la capa 1 de áreas corticales más laterales que incluían el cortex motor y somatosensorial.

En el paleocórtex apenas si observamos marcaje anterógrado. Éste quedaba restringido a unas pocas fibras en la capa 2 del Pir a niveles del OT más caudal, y a fibras en el núcleo endopiriforme ventral (VEn; Fig.2.4F-G). Probablemente en relación con estas fibras, pero a niveles mucho más caudales, aparecen unas pocas fibras marcadas dispersas en las capas profundas (5-6) y superficiales (1-2) de la corteza ectorhinal del lado hacia el que se dirigió la inyección (aun cuando ésta ocupaba la línea media).

Por último, la formación hipocámpica mostraba marcaje anterógrado escaso con una distribución laminar. En el giro dentado se observó fibras varicosas dispersas en el hilus, mientras que en el asta de Ammón había fibras dispersas en el estrato oriens de CA1 y CA3, y un campo terminal conspicuo en el límite entre los estratos *radiatum* y *lacunosum-moleculare* de CA1 (Fig.2.4H-J). Ocasionalmente, estas fibras parecían establecer contacto sobre somas de interneuronas de este estrato (Fig. 2.8A). Además, observamos fibras lisas y gruesas en la fimbria del hipocampo.

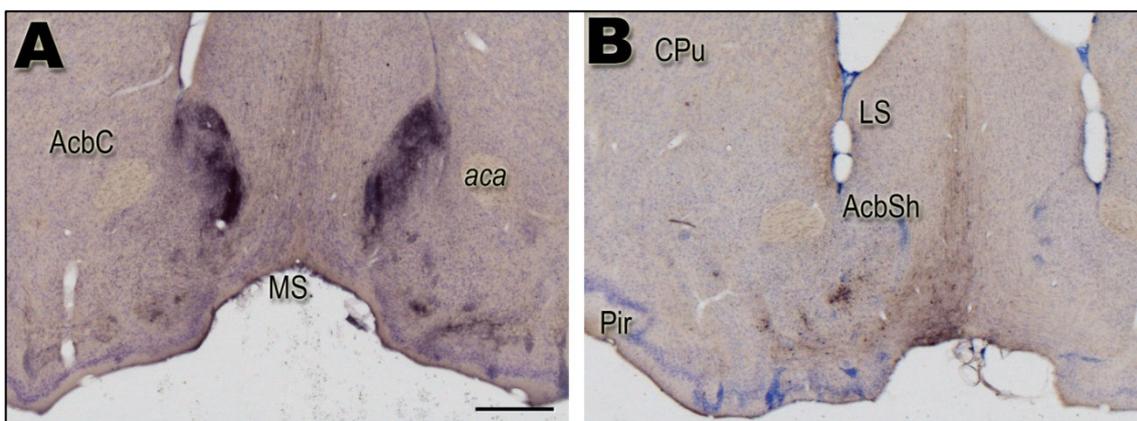


**Figura 2.8.** Fotomicrografías digitales de dos detalles del marcaje anterógrado en el hipocampo y septum respectivamente. En **A** observamos cómo los axones marcados se sitúan entre los estratos *radiatum* y *lacunosum-moleculare*. Bc: 100  $\mu$ m. En **B** observamos una neurona marcada retrógradamente del septum, que es rodeada por una terminación en “cesto” marcada anterogradamente. Bc: 50  $\mu$ m.

La mayor proporción de axones marcados del telencéfalo se encontraba en el estriado ventral, en donde las inyecciones mediales en el VTA daban lugar a un denso marcaje en el AcbSh medial y estructuras adyacentes (CB e ICj) y un marcaje mucho menos denso en el AcbC (Fig.2.4B-D y Fig. 2.9A). En el AcbSh, la densidad de marcaje

era tal que apenas deja ver la contratincción. Las inyecciones centradas en la línea media, daban lugar a densa marca anterógrada bilateral en el AcbSh medial dorsal a lo largo de todo el eje antero-posterior del Acb. Además, aparecían campos terminales densos o moderados en porciones discretas de la parte ventromedial del estriado-pálido ventral, que incluían territorios del AcbSh, algunos “puentes celulares” del estriado ventral y en el pálido ventral (VP) en el que la marca se extendía hasta su límite lateral y siempre era bilateral. Desde estos territorios del estriado y pálido ventrales las fibras marcadas se extendían a los islotes de Calleja (ICj) más mediales (y al ICjM), en donde dan lugar a una inervación muy densa que atraviesa los "puentes celulares" y abarca la totalidad de la capa granular del ICj (Fig. 2.6C). Estas fibras marcadas a veces parecían estar presentes en el OT adyacente a los ICj, aunque probablemente no invasen a éste sino a las capas más externas de los islotes. En el ICjM la inervación procedente del VTA medial ocupaba toda la estructura, pero era especialmente densa en el exterior lateral del ICjM, colindante al AcbShM (Fig.2.9A). Por su parte, las inyecciones en el VTA ligeramente desplazadas respecto de la línea media (M0343B), mostraban un patrón de marcaje diferente. En el AcbSh mediodorsal había muy poca marca anterógrada, excepto a niveles muy anteriores (rostrales al ICjM) y el ICjM apenas si presenta marcaje anterógrado. Por su parte, el estriado-pálido ventromedial presenta un marcaje similar a las inyecciones en la línea media del VTA.

Respecto del AcbC, se observaba escasas fibras dispersas que se concentraban en campos terminales discretos, cuya localización dependía del lugar de inyección. Así, las inyecciones en la línea media (M0412B, M0333R) marcaban bilateralmente un campo terminal en el AcbC medial caudal que rodeaba a la comisura anterior medial y



**Figura 2.9.** Fotomicrografías digitales de dos secciones del estriado ventral de las inyecciones M0412B y M0338B. En **A** observamos el marcaje resultante tras inyecciones en el VTA medial. Bc: 500  $\mu$ m. En **B** observamos el marcaje resultante tras inyecciones en el VTA lateral.

caudoventralmente. Por su parte, las inyecciones que invadían territorios de la VTA ligeramente más laterales (M0343B, y en menor medida el M0412B al ser una inyección grande) mostraban un campo terminal marcado en el AcbC medial anterior, desde el que algunas fibras marcadas parecían ingresar en el CPu dando lugar a pequeños campos terminales en el mismo. La localización de estos campos terminales del CPu estaba relacionada con el lugar de inyección en la VTA (cuanto más lateral la inyección, más lateral el marcaje). Además, estas inyecciones relativamente laterales presentaban otros campos terminales marcados discretos en porciones ventrolaterales del AcbC caudal.

Hay que recordar que en el Acb, en los CB, en los ICj y en el VP se encontraron neuronas retrógradamente marcadas. En este sentido, parece haber una clara co-distribución de marcaje anterógrado y retrógrado. Así, las neuronas retrógradamente marcadas en el Acb, ICj, CB y VP siempre aparecían rodeadas de fibras marcadas anterógradamente, si bien lo contrario no es cierto (hay zonas en que sólo aparece marca anterógrada). Cuando el marcaje retrógrado era muy denso y llenaba parte del árbol dendrítico de las neuronas del VP parecía haber contacto directo entre los axones marcados anterógradamente y las dendritas de las neuronas marcadas retrógradamente (Fig. 2.6B). Por otra parte, esta co-distribución de la marca retrógrada con la anterógrada ocurre también en aquellas inyecciones en las que el marcaje retrógrado era tenue y queda restringido al soma neuronal. Esto excluye que el marcaje fibrilar fuese debido a colaterales locales de las neuronas marcadas retrógradamente y sugiere una organización topográfica y una precisa reciprocidad en las interconexiones entre el estriado-pálido ventral y el VTA.

En el estriado-pálido medial (septum), no encontramos una concentración de fibras marcadas tan alta como en el estriado ventral (Fig.2.4B-F). El septum lateral presentaba axones marcados, finos y gruesos, dispersos en la subdivisión intermedia del núcleo septal lateral (LSI) y en menor medida la subdivisión ventral (LSV). En el LSI se observa una elevada densidad de terminaciones axónicas en cesto alrededor de algunos somas neuronales (Fig.2.8B), que era aun mayor a niveles caudales en el límite con el núcleo septofimbrial. En cuanto al pálido medial, observamos una densidad moderada de fibras varicosas gruesas marcadas anterógradamente tanto en el septum medial (MS) y el núcleo de la banda diagonal (VDB y HDB). Contrariamente a lo que hemos descrito para el estriado-pálido ventral, en el complejo septal no parecía haber co-distribución del marcaje retrógrado con el anterógrado.

En general, los restantes territorios palidales presentaban poca marca anterógrada, con excepción de las regiones adyacentes al VP caudal (Fig.2.4C-F), de naturaleza supuestamente palidal (al menos en parte), como la *substantia innominata* y las áreas de transición hacia el hipotálamo preóptico (LPO, MCPO), que presentan densidades moderadas de marca anterógrada y retrógrada.

La innervación amigdalina que observamos después de inyecciones mediales en el VTA era más bien escasa y dispersa, pero los axones marcados se encontraban tanto en la amígdala palial como subpalial. En la amígdala palial, observamos (M0333-R) una trama de axones marcados anterógradamente junto al ventrículo lateral en la subdivisión posterior del núcleo basolateral de la amígdala (BLP) (Fig 2.4I), desde donde unas pocas fibras marcadas se extendían ventralmente hacia el área de transición amigdalopiriforme (APir) (Fig. 2.4J) y, en menor medida, el núcleo amigdalino cortical posterolateral (PLCo). Medialmente, también observamos fibras marcadas que se extienden en el área amigdalohipocámpica (AHi). Siguiendo la división basolateral de la amígdala, encontramos algunas fibras dispersas marcadas anterógradamente, tanto en su subdivisión anterior del núcleo basolateral (BLA) (Fig. 2.4H), como en el núcleo basomedial de la amígdala, en su porción posterior (BMP) y algo más densas en su porción anterior (BMA). Desde la BLA, algunos axones finos parecían adentrarse en el subnúcleo dorsolateral del núcleo lateral de la amígdala (LaDL) (Fig. 2.4H). Por último, en los niveles más anteriores, se observaban axones marcados anterógradamente en las capas más profundas de la zona de transición cortico-amigdalina (CxA) y el núcleo amigdalino cortical anterior (ACo) (Fig. 2.4G). En el área anterior amigdalina observamos una densidad de axones marcados con botones mayor que ninguna otra porción de la amígdala palial, tanto en su división dorsal (AAD), como en la ventral (AAV), pero parecían concentrarse ligeramente en la AAD por encima del LOT (Fig. 2.4G).

En general, la amígdala subpalial presentaba menos marca que la palial. Ésta estaba formada por axones dispersos marcados en el área de transición amigdalostriatal (AStr), la amígdala central (Ce, especialmente en sus divisiones capsular y medial), y en la porción intraamigdalina del BST (BSTIA) que presentaba una densidad moderada de fibras marcadas (Fig. 2.4H).

En la amígdala extendida, en el núcleo de la stria terminalis (BST) apenas se observaban algunos axones marcados anterógradamente dispersos por toda la estructura, incluyendo las divisiones medial anterior (BSTMA, BSTMV), lateral (BSTLD, BSTLP,

BSTLV) y (BSTMPL; BSTMPI) (Fig. 2.4F). La porción supracapsular del BST (BSTS), también presentaba unas pocas fibras marcadas, de grueso calibre y sin apenas engrosamientos que suponemos relacionadas con el marcaje retrógrado y/o anterógrado del BSTIA y el resto de la amígdala posterior. Por su parte, en la amígdala extendida sublenticular el IPAC mostraba una baja densidad de finos axones marcados anterógradamente, que contrasta con la densidad relativamente elevada de marcaje anterógrado (y retrógrado) de la SI y VP adyacentes que conjuntamente constituyen la SLEA (Fig. 2.4E-F).

### **1.c. Marcaje atribuible a fibras de paso (no ilustrado)**

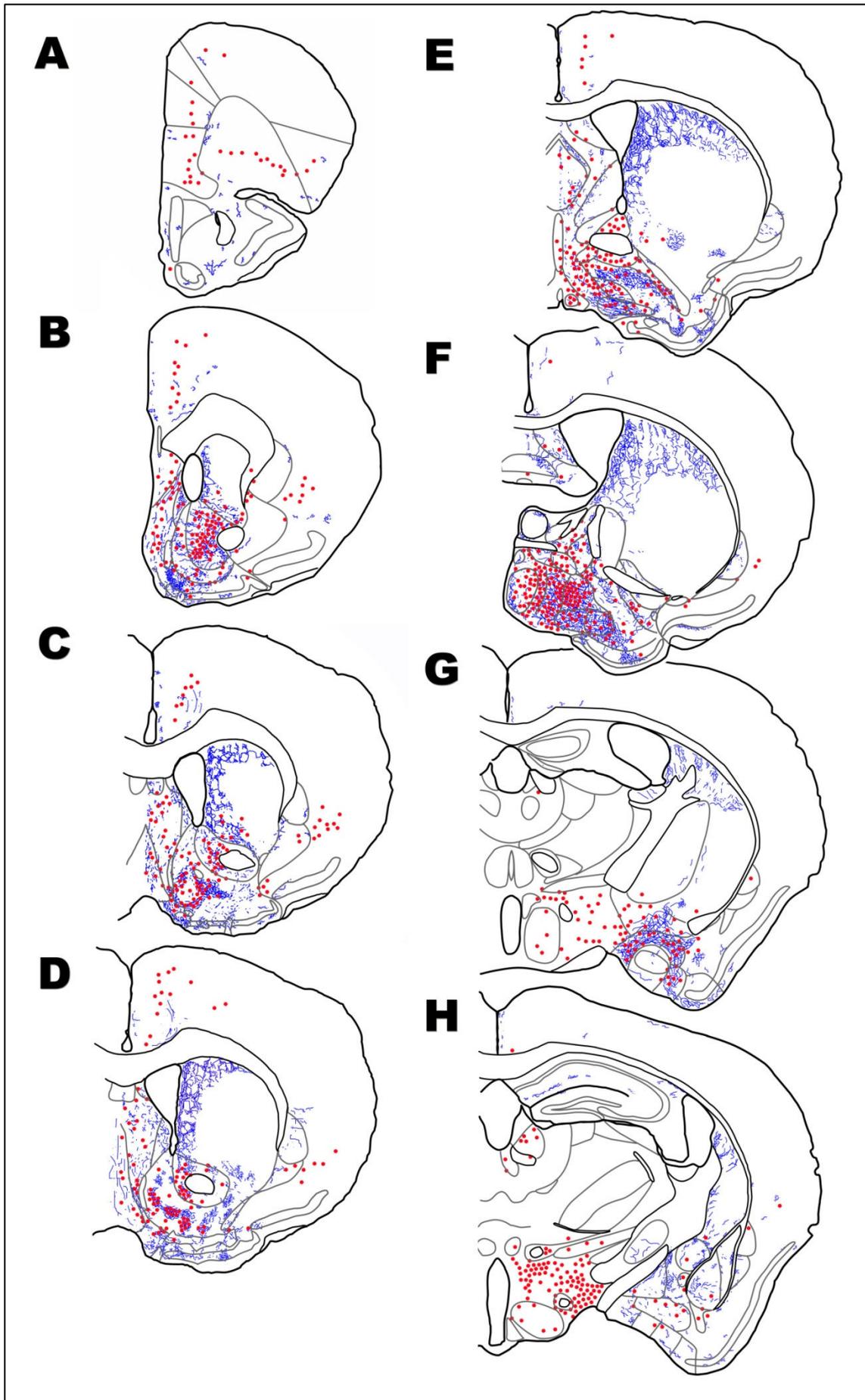
Algunas de las inyecciones en la VTA afectaron a tractos que la atraviesan. Así, las inyecciones M0412-B y M0413-B afectaron ligeramente al lemnisco medial (*ml*). En relación con este hecho se observó abundante marcaje retrógrado en núcleos sensoriales del trigémino contralaterales (núcleo principal y núcleo espinal del trigémino, Feldman & Kruger, 1980). Estas inyecciones también parecían afectar ligeramente a porciones del complejo del núcleo rojo, como lo atestigua el marcaje retrógrado contralateral observado en los núcleos profundos del cerebelo, lateral e interpuesto (Teune et al., 1998; Teune et al., 2000). Posiblemente en relación con la afectación del complejo del núcleo rojo, aparece un marcaje retrógrado abundante en el área pretectal ipsilateral a la inyección (Cadusseau & Roger, 1988; Martínez-Marcos et al., 1999). Otras estructuras que muestran densa marca retrógrada en estas inyecciones son el núcleo y campo de Forel así como el área pre-rubra.

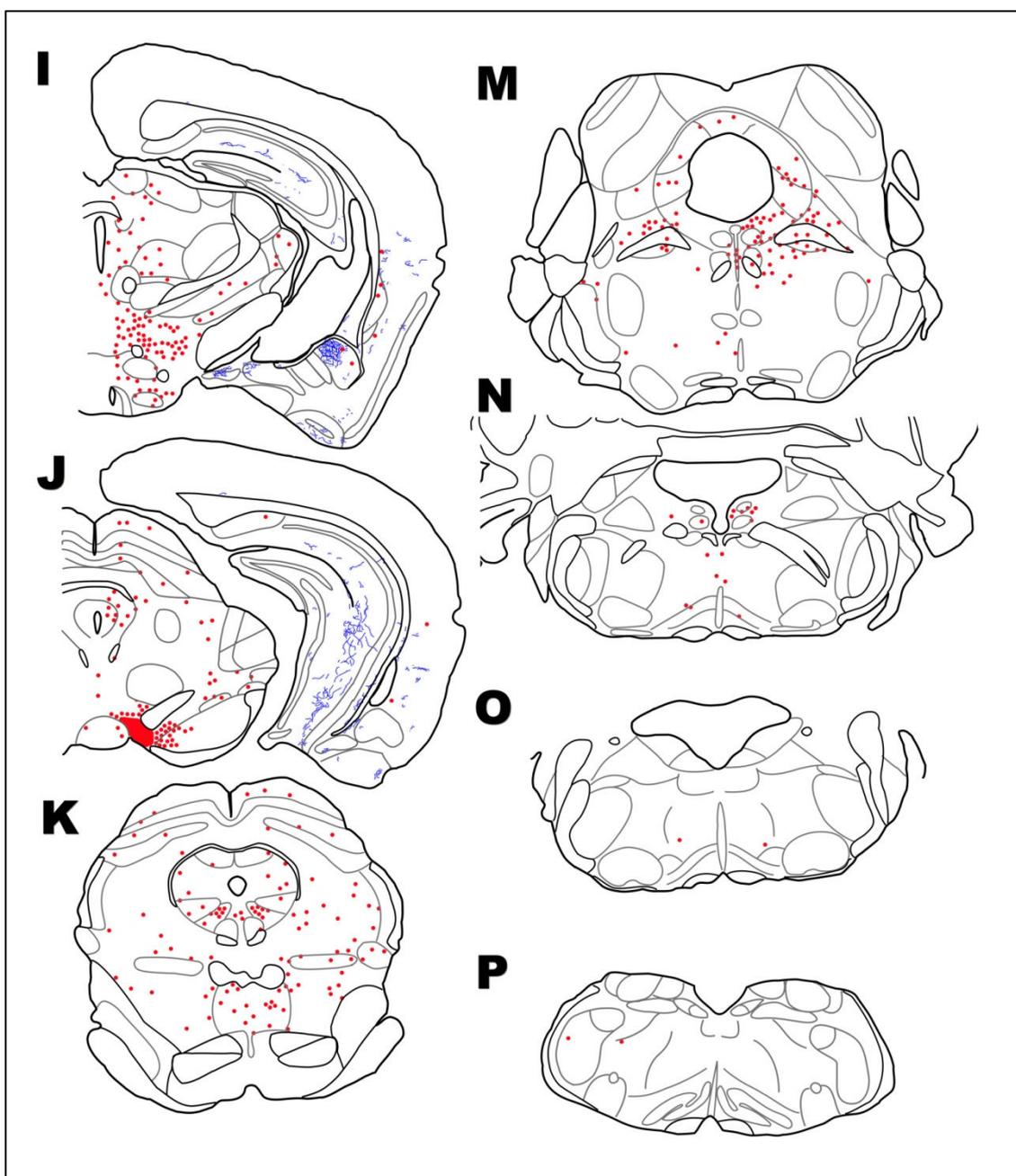
## **2. Inyecciones de trazador en el VTA lateral**

En nuestras inyecciones obtuvimos tres restringidas al área lateral del VTA localizadas en niveles antero-posteriores intermedios (M0338-B, M0402-B, M0412-R) de las cuales una afectaba al fascículo retroflejo (M0402-B) y otra al lemnisco medial (M0412-R). Una cuarta inyección en la VTA lateral se extendía hasta la SNC (M0413-B; ver Fig. 2.2). Para la descripción de los resultados de este tipo de inyecciones nos basamos en la inyección M0338-B (Fig. 2.3B), si bien los resultados de las otras inyecciones son totalmente congruentes con esta descripción. A menos que se indique lo contrario, los resultados se refieren al lado ipsilateral.

### **2.a. Marcaje retrógrado (Fig. 2.10A-P)**

Las inyecciones laterales en el VTA mostraban un marcaje retrógrado muy similar al de las inyecciones mediales (descritas anteriormente) en el puente, mesencéfalo y diencéfalo. Por el contrario, el patrón de marcaje retrógrado en el telencéfalo tras las inyecciones laterales en el VTA mostraba diferencias claras con las inyecciones mediales que como veremos más adelante, se debe sobre todo a la aparición de neuronas marcadas en el paleocórtex en las inyecciones laterales (no así en las mediales, ver arriba) y a diferencias en la distribución de marcaje retrógrado en el estriado-pálido y la amígdala.





**Figura 2.10.** Dibujo esquemático de 15 secciones frontales del encéfalo del ratón M0338, en las que se ilustra el marcaje resultante de la una inyección de BDA en el VTA lateral (M0338-B) (mancha roja en J). En cada sección se han delimitando en gris los límites citoarquitectónicos y se representan como círculos rojos los somas marcados, y como líneas azules las fibras positivas para la BDA (marcaje anterógrado) en el prosencéfalo. Las secciones están ordenadas de anterior (A) a posterior (P).

En niveles meso-pontinos, el marcaje obtenido tras inyecciones laterales en el VTA no difería sustancialmente del marcaje obtenido tras inyecciones mediales, al mostrar una distribución en tres columnas antero-posteriores bilaterales (Fig. 2.10M-N). Así, como ocurría con las inyecciones mediales, observamos un grupo de neuronas marcadas retrógradamente en una columna medial, distribuidas en diferentes

subdivisiones del rafe meso-pontino. La segunda columna estaba formada por neuronas marcadas en el compartimento periventricular ventrolateral, que se extendía hacia la sustancia gris periacueductal ventrolateral (Fig. 2.10J-M). Y la tercera columna, de localización dorsolateral, la conformaban neuronas marcadas retrógradamente dispersas en el área parabraquial y DpMe (Fig. 2.10K-M). Como en las inyecciones mediales, esta organización columnar se perdía gradualmente al avanzar hacia niveles mesencefálicos rostrales, al tiempo que empezaba a observarse una predominancia de marcaje en el lado de la inyección. Este cambio gradual era similar al de las inyecciones mediales pero con algunas pequeñas diferencias. Así, las inyecciones laterales parecían mostrar una densidad de neuronas marcadas relativamente mayor que las mediales en la PAG ventrolateral y en el Su3. Esta diferencia era más patente en la porción dorsal de la PAG dorsal y en las capas grises intermedia y profunda del colículo superior. Además aparecían unas pocas neuronas marcadas en la capa superficial del colículo, cosa que no se observaba en las inyecciones mediales (Fig. 2.10J-K).

En las inyecciones del VTA, el marcaje también era similar al de las inyecciones mediales salvo porque tiende a ser ipsilateral a la inyección, en lugar de ser bilateral (Fig. 2.10J). Así encontramos también numerosas neuronas marcadas retrógradamente en el IP, en el RLi, en la SNC (bilateral, aunque con predominio ipsilateral) y SN lateral. También presenta neuronas marcadas el SuM y, en menor medida, los núcleos mamilares medial y lateral (MM y ML). Rostralmente a la PAG, cuando el acueducto comunica con el tercer ventrículo ventral, aparecían neuronas marcadas junto al mismo en los territorios pertenecientes al núcleo precomisural (PrC), el PF y el área posterior hipotalámica (PH; Fig. 2.10I).

Estas inyecciones presentaban, además, marcaje retrógrado abundante en la LHb (Fig. 2.10H). En relación con el mismo, el *fr* presentaba fibras marcadas, restringidas a su porción periférica, bilateralmente con un claro predominio ipsilateral. Tan solo, la inyección M0402-B, que afectó muy ligeramente al *fr*, mostró fibras marcadas en su interior y algunas neuronas marcadas retrógradamente en la MHb. Este patrón de marcaje es similar al que muestran las inyecciones en la VTA medial.

A niveles diencefálicos caudales se observan neuronas marcadas retrógradamente marcadas en la ZI, en posición más lateral que las observadas en inyecciones mediales, por debajo del lemnisco medial (*ml*) y alrededor del tracto mamilotalámico (*mt*; Fig. 2.10H).

Sin embargo, como ya hemos descrito tras inyecciones mediales en la VTA, es en el hipotálamo en donde se concentraba la mayor parte de las neuronas marcadas del diencefalo. La densidad de neuronas marcadas retrógradamente era especialmente alta en el compartimento lateral del hipotálamo, incluyendo todos los niveles del LH, y se extendía al área preóptica lateral (LPO; Fig. 2.10F-H). En este continuo, se observaban grupos especialmente densos de neuronas marcadas alrededor del fornix (*f*) a niveles tuberales (Fig. 2.10I), incluido el núcleo perifornical (PeF). Muchas de estas neuronas poseían árboles dendríticos orientados dorsolateralmente hacia el *mt*, alrededor del cual también se disponían algunas neuronas marcadas retrógradamente. A este nivel se observaba igualmente una notoria población de neuronas marcadas en el DMH, toda el área del hipotálamo medial que lo envuelve y los núcleos colindantes como el núcleo hipotalámico periventricular (Pe), el núcleo subincierto (SubI) y el ya descrito PeF, así como alguna neurona solitaria en el núcleo ventromedial hipotalámico (VMH) y, más rostralmente, en el AHP y en el *tuber cinereum* (TC). Aparte de estas neuronas, el compartimento medial del hipotálamo mostraba poco marcaje retrógrado, como ocurría con las inyecciones mediales.

En el compartimento periventricular el marcaje observado era escaso. Así, a niveles tuberales observamos una agrupación de pequeñas neuronas marcadas junto al tercer ventrículo, posiblemente circunscritas al núcleo tuberomamilar dorsal (DTM) y más rostralmente en distintas divisiones del núcleo paraventricular (PaPo y PaLM) y en el área retroquiasmática (RCh).

Por su parte, como en las inyecciones más mediales en la VTA, el hipotálamo preóptico muestra neuronas marcadas prácticamente en todas sus divisiones (LPO, MPO, MPA, ADP, MCPO), aunque la densidad de neuronas marcadas parece superior a la observada tras inyecciones mediales (Fig 2.10F).

Como las inyecciones mediales, las inyecciones laterales en la VTA dieron marcaje retrógrado en todas las divisiones del telencéfalo (palio, estriado, pálido, amígdala y amígdala extendida), aunque apreciamos diferencias que describiremos en detalle a continuación (Fig. 2.10A-J). En el telencéfalo cortical, de nuevo el isocórtex presentaba abundante marcaje retrógrado en el polo frontal, en donde las neuronas marcadas se situaban mayoritariamente en la capa 5 del MO, VO y LO (bilateral con predominancia ipsilateral; Fig. 2.10A). En la corteza medial, observamos abundantes neuronas marcadas retrógradamente formando un continuo en las capas intermedias y profundas de las áreas peduncular dorsal (DP), IL, PrL y, con menor densidad, en las

capas intermedias del Cg1 y M2 (Fig. 2.10B-F). Más caudalmente, la densidad en estas áreas disminuye notablemente, y observamos unas pocas neuronas de capas intermedias marcadas retrógradamente en Cg2, RSG y RSA (Fig. 2.10G-H). Por último, la corteza frontal también presentaba marcaje en el área insular agranular (AI) en donde la densidad de marcaje decrecía progresivamente en dirección caudal (Fig. 2.10B-J).

A diferencia de lo observado en las inyecciones mediales, en el paleocórtex observamos unas pocas neuronas marcadas retrógradamente de tamaño intermedio en la capa 3 del córtex piriforme y en toda la extensión anteroposterior del núcleo endopiriforme (En; Fig. 2.10B-I). En el Pir, estas neuronas marcadas se sitúan cerca del límite del Pir con el OT, la banda lateral del estriado (LSS) y la amígdala anterior (Fig. 2.10B-G).

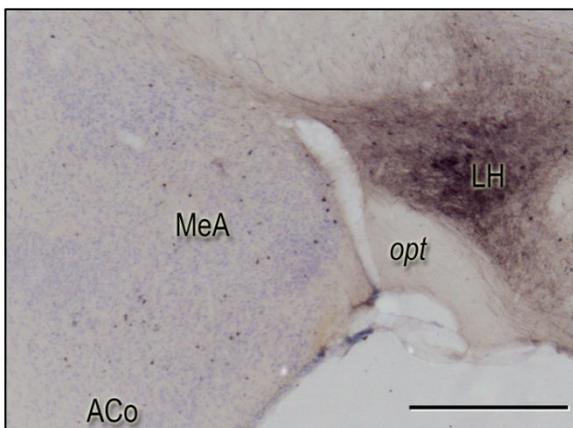
Como tras inyecciones mediales, en las inyecciones laterales en el VTA el complejo estriado-palidal muestra la mayor concentración de neuronas marcadas retrógradamente de todo el telencéfalo. Así, el septum muestra abundantes neuronas marcadas retrógradamente, principalmente en el hemisferio ipsilateral a la inyección. Como tras inyecciones mediales, las neuronas marcadas se sitúan mayoritariamente en el LSI y, en menor medida en la LSV (Fig. 2.10C-D). Además, las inyecciones laterales también mostraban neuronas marcadas retrógradamente en la división dorsal del septum lateral (LSD). Respecto a la parte páldal del septum, también encontramos numerosas neuronas ipsilaterales marcadas retrógradamente en el MS y en el núcleo de la banda diagonal incluyendo la porción vertical (VDB), que también mostraba marcaje en inyecciones mediales, y la horizontal (HDB) (Fig. 2.10C-D). El marcaje en la VDB se extiende rostralmente en el SL y en las capas profundas de la *taenia tecta* dorsal (DTT; Fig. 2.10B).

Las mayores diferencias con las inyecciones mediales se encuentran en el estriado-pálido ventral. Así, el Acb rostral y el AcbC que apenas mostraba marcaje retrógrado en inyecciones mediales, presentan abundantes neuronas marcadas tras las inyecciones laterales (Fig. 2.10B-D y Fig. 2.9B). Las neuronas marcadas son de tamaño mediano y se distribuyen por todo el AcbC, pero con una densidad algo mayor en la parte ventral y medial de las áreas del AcbC adyacentes a la rama anterior de la comisura anterior (*aca*). En la inyección M0413-B, que está situada en la VTA lateral e invade la SNC, vemos que las neuronas marcadas retrógradamente continúan estando distribuidas en todo el AcbC, pero la predominancia pasa a ser en la parte dorsal al *aca*, además de aparecer neuronas marcadas en las partes más ventrales del CPu. Por su parte, las

inyecciones laterales en el VTA, como las más mediales, mostraban grupos de neuronas marcadas retrógradamente en el AcbSh restringidas a su porción ventral o ventromedial y a los CB vecinos. En la inyección M0413-B, que invade la SNC, también observamos estas agrupaciones, aunque tanto su número como su densidad son menores. En todas las inyecciones laterales, y tanto en el AcbC como en el AcbSh los grupos de neuronas marcadas retrógradamente se solapan con campos terminales de axones marcados anterógradamente (ver más adelante). Por otra parte, las inyecciones laterales en el VTA coincidían con las mediales en que mostraban unas pocas neuronas marcadas en el VP bilateramente, de morfología inequívocamente palidal, de gran tamaño y con dendritas lisas, lineales y poco ramificadas. Los islotes de Calleja mostraban neuronas marcadas retrógradamente en todas las inyecciones en el VTA lateral. En general, las neuronas marcadas se localizaban en la periferia del ICj, si bien en un caso (M0402-B), observamos una neurona marcada en el interior del ICjM. Esporádicamente también observamos alguna neurona marcada retrógradamente en el estrato granular del OT caudal (Fig. 2.10F).

En el estriado dorsal no observamos ninguna neurona marcada retrógradamente con excepción de la inyección M0413-B, ya comentada, que afectaba a la SNC. En esta misma inyección, el pálido lateral (*globus pallidus*) mostraba unas pocas neuronas marcadas retrógradamente localizadas en el *globus pallidus* (Fig. 2.10G).

En cuanto a la amígdala, las inyecciones laterales dan una densidad de marca retrógrada mayor que las inyecciones mediales. En ambas divisiones de la amígdala, palial y subpalial, la marca era principalmente ipsilateral, aunque en algunos núcleos aparece alguna neurona marcada en el lado contralateral. Por otra parte, tanto en la amígdala palial como en la subpalial la densidad de marca es mayor en los niveles anteriores que en los posteriores. En la amígdala palial profunda, las inyecciones laterales en el VTA mostraban neuronas marcadas dispersas en el área amígdalo-hipocámpica (AHi) y en los núcleos basolateral (divisiones posterior BLP y anterior BLA) y basomedial (BMP y BMA; Fig. 2.10H-I). Aparentemente, las inyecciones laterales daban una mayor cantidad de neuronas marcadas en el BMA que las inyecciones mediales. La amígdala cortical (palial superficial) mostraba una notable densidad de neuronas marcadas en la ACo y la CxA (Fig. 2.10G-H). Por su parte, la amígdala anterior (cuya naturaleza palial o subpalial es incierta) presentaba una densa población de células marcadas tanto en sus porciones ventral (AAV) como dorsal (AAD), que continuaba con la población de neuronas marcadas en el LH (Fig. 2.10G).



**Figura 2.11.** Fotomicrografía digital de una sección transversal de la amígdala medial anterior tras una inyección en el VTA lateral. Bc: 500  $\mu$ m.

Cabe resaltar que en este continuo de abundantes neuronas marcadas, no encontramos ni una sola neurona marcada dentro del LOT, que aparecía sin marca rodeado de centros marcados.

En cuanto a la amígdala subpalial, el polo posterior apenas si presentaba unas pocas neuronas marcadas dispersas en el núcleo medial posterior (MeP) y en la amígdala central (principalmente, aunque no sólo, en su división lateral,

CeL). También aparecían algunas neuronas marcadas junto a las masas intercaladas, sobre todo las anteriores. Pero la mayor densidad de neuronas marcadas se encontraba en la MeA. Así pues, el marcaje retrógrado en la amígdala subpalial es similar en las inyecciones mediales y laterales en el VTA, salvo porque estas últimas dan lugar a mayor densidad de marca en la MeA y a algo de marca (aunque escasa) en MeP (Fig. 2.10H y Fig2.11).

En cuanto al marcaje en la amígdala extendida también es muy parecido al observado tras inyecciones en la VTA medial. Así, el BST mostraba unas pocas neuronas marcadas retrógradamente en su porción intraamigdalina (BSTIA) y una densidad mayor en las divisiones medial posterior (sobre todo pero no exclusivamente en su subdivisión intermedia BSTMPI), lateral posterior (BSTLP), medial (BSTM, tanto ventral como anterior) y lateral (BSTL, ventral y dorsal; Fig. 2.10F). Por último, en la parte sublenticular de la amígdala extendida, observamos un grupo prominente de somas marcados en la SI y la parte caudal del VP, y algunas neuronas dispersas marcadas retrógradamente en el IPAC, principalmente en su parte medial.

### **2.b. Marcaje anterógrado en el telencéfalo (Fig. 2.10A-J)**

Las inyecciones en el VTA lateral dieron, en general, más marca anterógrada en el telencéfalo que las mediales. Además, a diferencia de las inyecciones mediales, en las que la marca era bilateral, las inyecciones laterales daban marca casi exclusivamente ipsilateral.

En la corteza cerebral, al igual que ocurría con las inyecciones mediales, las fibras marcadas entraban en el isocórtex a través de las capas 1 y 3 de la DTT (Fig. 2.10B).

Desde la DTT las fibras se adentraban en la capa 1 y en las capas profundas del DP, IL, PrL, con una densidad menor en capas intermedias. Desde estas regiones, en la corteza peduncular dorsal y prelímbica, las fibras marcadas irradian a regiones corticales adyacentes, que incluían el córtex orbitofrontal, insular, y cingular-retrosplenial (Fig. 2.10A-F). Así, se observaban plexos de fibras finas y varicosas en las capas superficiales, y en menor medida en las capas intermedias, de distintas áreas del córtex orbitofrontal (MO, VO, LO), desde donde se extendían al córtex motor secundario (M2). Por su parte, desde el córtex medial peduncular y límbico, se podían seguir fibras marcadas en dirección caudal hasta el área Cg1 en donde la densidad de marca era apreciable, y hasta el área Cg2 y el córtex retrosplenial (RSG y RSA), en donde la densidad de la marca era menor (Fig. 2.10G-H). Por su parte, en las capas profundas del córtex límbico y prelímbico se observaban algunas fibras gruesas que se adentraban en la sustancia blanca, por donde discurrían en dirección lateral y caudal hacia la ínsula. En relación con estas fibras, el córtex insular mostraba campos terminales conspicuos en el área agranular (AI), cuya densidad decrecía en dirección caudal, y en las capas profundas del AI y en el claustró (Cl), en donde la marca se podía seguir a lo largo de todo su eje antero-posterior (Fig. 2.10B-J).

En el paleocórtex, pudimos observar dos patrones de marca anterógrada. Por una parte, a niveles rostrales, algunas fibras finas con botones marcadas emergían del OT y se extendían por la capa 2 del Pir adyacente al OT (Fig. 2.10B-F). Por otro lado, a niveles más caudales (cuando desaparece el OT), observamos fibras marcadas en la capa 1 del Pir que mostraban continuidad con las encontradas en la amígdala cortical (ver más adelante), así como unas pocas fibras dispersas en su capa 3. Por último, las divisiones dorsal y ventral del núcleo endopiriforme (DEn y VEn) mostraban fibras marcadas que no parecían estar conectadas con los campos terminales del Pir sino con las fibras observadas en las capas profundas de la AI y en el Cl. En niveles mucho más caudales también encontramos unas cuantas fibras dispersas a lo largo de la corteza ectorhinal.

Respecto al arquicórtex, las inyecciones laterales en la VTA difieren de las mediales en que la formación hipocámpica apenas presentaba fibras marcadas, excepto en el hipocampo caudal en donde se apreciaban algunas fibras marcadas en el *estrato radiatum* de CA1 (Fig. 2.10H-J). La inyección M0338-B, sin embargo, mostraba marcaje anterógrado abundante en los estratos moleculares y en la capa granular (en su parte más externa) del giro dentado, así como en CA2. Las inyecciones control (ver más

adelante) sugieren que esta marca se debe a que la parte más anterior de la inyección afectaba ligeramente al SuM.

Todavía en territorios paliales, (Puelles, 2001) observamos algunas fibras marcadas anterógradamente en el núcleo olfativo anterior, sobretodo en su parte medial (AOM; Fig. 2.10A).

Tras inyecciones laterales en la VTA, como tras las inyecciones mediales, la máxima densidad de fibras marcadas se observó en el subcórtez, y más específicamente en el estriado ventral. Sin embargo, el patrón de distribución de fibras en el estriado ventral difiere claramente del que se observa en inyecciones mediales (Fig. 2.9). Así, en clara contraposición con lo observado en inyecciones mediales, tras las inyecciones en la VTA lateral el Acb anterior mostraba una densa maraña de fibras varicosas marcadas que se extendía caudalmente dando lugar a dos campos terminales, uno en el AcbC y otro en el AcbSh (Fig. 2.10B-D). En el AcbC un denso campo terminal envolvía a la comisura anterior completamente, y parecía extenderse hasta el CPu ventral (Fig. 2.10B-E). En el hemisferio contralateral a la inyección, el AcbC mostraba pequeños campos terminales marcados en posición dorsomedial en niveles anteriores, y más mediales y ventrales en niveles caudales. En el *shell* el AcbSh medial presentaba algunas fibras marcadas aunque su densidad era mucho menor que tras las inyecciones mediales. También observamos fibras marcadas en el ACbSh ventromedial contralateral, aunque su número era muy reducido. Por el contrario, las inyecciones laterales en el VTA mostraban una marca muy prominente en el AcbSh ventral, en donde ésta formaba densos campos terminales asociados con las agrupaciones de neuronas marcadas retrógradamente cercanas a los CB. Desde estos campos terminales, la densa marca anterógrada se extendía a los CB adyacentes y a los ICj ventrales a éstos. A diferencia de lo observado en las inyecciones mediales, los ICj laterales mostraban fibras marcadas en su interior, mientras que en el ICjM y los ICj mediales las fibras marcadas ocupan la periferia, sin inervar apenas su estrato granular. Otra diferencia con las inyecciones mediales se aprecia en el OT, mientras que en las inyecciones mediales los axones marcados anterógradamente aparecen exclusivamente asociados a ICj, en las inyecciones laterales mostraban abundante marcaje anterógrado en todos sus estratos, especialmente denso en el OT medial, en donde el marcaje era bilateral con clara predominancia ipsilateral. Este campo terminal en el OT presentaba clara continuidad con las fibras que inervaban el exterior de los ICj imbricados en el OT. Al igual que ocurría en las inyecciones mediales, el VP mostraba fibras marcadas con una densidad

mucho menor que el estriado ventral adyacente. En general, en las inyecciones en el VTA lateral, como en las mediales, el marcaje en el complejo estriado-palidal ventral se caracteriza por mostrar una codistribución de marcaje retrógrado y anterógrado.

En cuanto estriado dorsal, en el CPu ventromedial se apreciaba un denso campo terminal que mostraba continuidad con el marcaje del AcbC, y se extendía dorsalmente (con una densidad menor) junto a la pared del ventrículo lateral hasta niveles bastante caudales (Fig. 2.10B-H). En un caso, la inyección M0413-B, presentaba un campo terminal marcado que abarcaba todo el CPu rostral, y se restringía al CPu más dorsal conforme avanzábamos en dirección caudal, además del CPu ventromedial. Es necesario tener en cuenta que la inyección M0413-B afectaba ligeramente a la SNC, de donde probablemente provenga la innervación del polo más rostral del CPu. La porción ventromedial del CPu anterior, adyacente al AcbC, compartía con el Acb una característica conectiva, ya que como en éste en el CPu ventromedial el marcaje anterógrado y el retrógrado se solapaban parcialmente siendo mayor el campo terminal marcado. Por su parte, en el *globus pallidus* observamos unas pocas fibras marcadas en ambas divisiones, medial (MGP) y lateral (LGP). Aunque la mayoría de las fibras marcadas eran lisas, sugiriendo que eran fibras de paso, unas pocas presentaban botones axónicos (Fig. 2.10F-H).

En el septum (estriado-pálido medial), la distribución de fibras marcadas en las inyecciones en el VTA lateral era similar a la observada en las inyecciones mediales, si bien las inyecciones laterales daban lugar a marca ipsilateral (las inyecciones mediales daban marca bilateral) y fibras en el núcleo dorsal del septum lateral (LSD), en el que las inyecciones mediales apenas mostraban marca (Fig. 2.10B-F). Sólo en la inyección M0338-B, que afectaba ligeramente al SuM, se observó un incremento sustancial en la densidad fibras marcadas en el MS.

Por último, como en las inyecciones mediales, los territorios de naturaleza (al menos parcialmente) palidal de transición hacia el hipotálamo preóptico, como la *substantia innominata*, LPO y MCPO, mostraban abundante marca anterógrada (Fig. 2.10E-F).

Al estudiar la inervación amigdalina tras inyecciones laterales en el VTA, se hizo patente que ésta era más abundante que tras inyecciones mediales. Así, en el BLP observamos un campo terminal conspicuo, especialmente denso junto al ventrículo lateral y en los niveles más anteriores del núcleo (el BLP contralateral mostraba unas pocas fibras marcadas; Fig. 2.10I). Como ocurría en las inyecciones mediales, de este

campo terminal del BLP pueden seguirse unas pocas fibras marcadas hacia la APir y la AHi. A niveles anteriores, este campo terminal del BLP parecía disgregarse, para dar lugar a una innervación dispersa del BMP anterior, el BMA, el BLA así como de las diferentes divisiones de la La (Fig. 2.10H). En la amígdala cortical, y aparte del marcaje mencionado en la APir, observamos fibras marcadas dispersas en los núcleos de la amígdala cortical posteromedial (PMCo) y posterolateral (PLCo, en donde la marca parecía concentrarse en capa 1; (Fig. 2.10I-J), y rostralmente en el ACo y CxA (Fig. 2.10G-H). Como hemos dicho antes, tal y como ocurría en las inyecciones en el VTA medial, las fibras del CxA mostraban continuidad con la marca anterógrada observada en el Pir. En el LOT, observamos un fenómeno similar al descrito para las inyecciones mediales: el LOT no presenta axones marcados, lo que contrasta con los núcleos adyacentes ricos en fibras marcadas, especialmente la amígdala cortical anterior y de transición (CxA, ACo), el área anterior amigdalina (AA), y la división anterior de la amígdala medial (MeA, ver abajo).

En la amígdala subpalial la densidad de marca anterógrada también era mayor en las inyecciones en el VTA lateral que tras las inyecciones más mediales. Así, observamos fibras dispersas marcadas en la amígdala medial (Me), que se agregaban para formar campos terminales mayores en las masas intercaladas de la amígdala (I), en la Ce, especialmente su división medial (CeM), en la AStr y el BSTIA (Fig. 2.10 H).

Del mismo modo, la distribución de fibras en la amígdala extendida era similar a la observada tras inyecciones mediales. Así, el BSTS presentaba unas pocas fibras marcadas lisas y gruesas, posiblemente fibras de paso. En el BST propiamente dicho, las partes más caudales del BSTMPM mostraban numerosas fibras lisas marcadas que desarrollaban densos campos terminales en todo el BSTMP que se extendían al BSTLP y al BST más anterior, incluyendo diversas subdivisiones de sus núcleos medial (BSTMA y BSTMV) y lateral (BSTLJ, BSTLV y BSTLD; Fig. 2.10E-F). Por su parte, el VP caudal y la SI, que conjuntamente forman la SLEA, mostraba un campo terminal moderadamente denso, coincidente con la distribución del marcaje retrógrado. Por último, en el IPAC aparecía un grupo de fibras marcadas restringido a la porción adyacente a la rama posterior de la comisura anterior (*acp*) y un plexo terminal marcado bilateralmente en una región específica del IPAC medial.

### 3. Inyecciones control y experimentos de confirmación

Para comprobar las proyecciones indicadas por el transporte anterógrado y retrógrado observado tras las inyecciones en el VTA realizamos una serie de inyecciones control de dos tipos. Por un lado inyectamos trazadores en áreas adyacentes al VTA para comparar el marcaje con el de las inyecciones del VTA. Por otro, inyectamos trazador en los centros del telencéfalo conectados con el VTA para comparar los resultados de transporte desde el VTA.

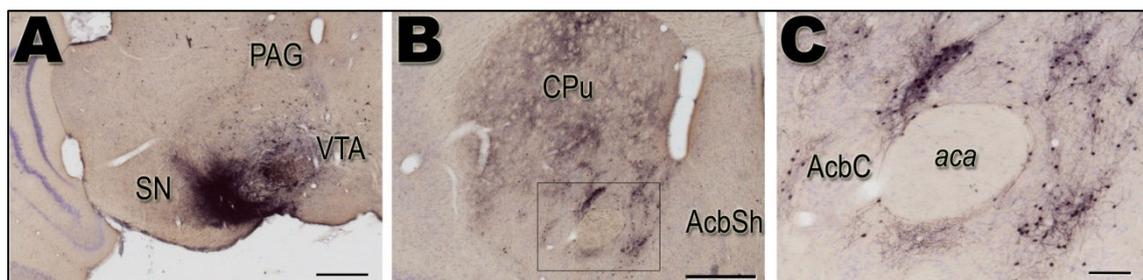
#### 3. a. Inyecciones control adyacentes al VTA

##### Inyecciones en el núcleo supramamilar

Las inyecciones en el SuM (M0344-B, M0344-R) dieron lugar a un denso campo terminal marcado anterógradamente en el septum, en ambas divisiones, lateral y medial, aunque más denso en su división medial y en la HDB. Además aparecían axones marcados anterógradamente en el VP caudal y en el estrato granular del giro dentado. Esta última proyección, descrita en la literatura (Leranth & Hajszan, 2007) nos permitió detectar la difusión de la inyección al SuM en algunas inyecciones dirigidas al VTA y descartar esta posibilidad en otras inyecciones restringidas a la porción rostral del VTA. Coincidiendo con el campo terminal en el septum, aparecieron numerosas neuronas marcadas retrógradamente, así como unas pocas en el AcbShM adyacente al septum. En el VP aparecieron varios somas marcados, algunas veces aislados en niveles anteriores y otras junto a los axones marcados.

##### Inyecciones en la substantia nigra compacta

Tras inyecciones en la SNC (M0328-B; Fig. 2.12) obtuvimos un amplio campo de marcaje anterógrado en el CPu, centrado en su parte dorsolateral, donde encontramos que se extendía hasta niveles caudales. Además de este campo terminal grande

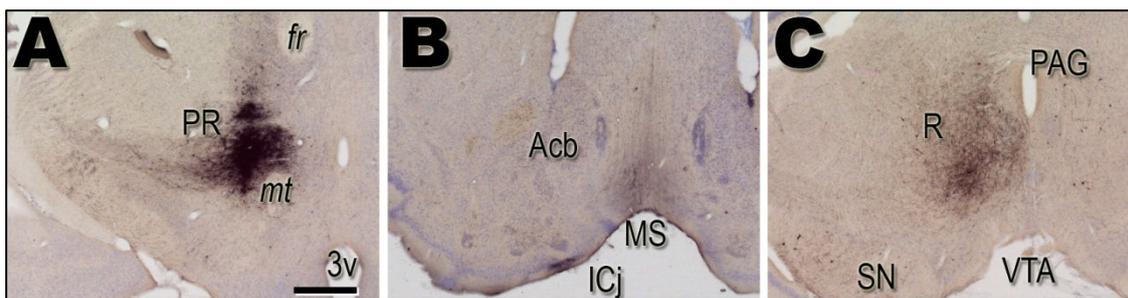


**Figura 2.12.** Fotomicrografías digitales de la inyección M0413B situada en la *substantia nigra*. En **A** observamos el lugar de inyección. Bc: 500  $\mu$ m. En **B** observamos el estriado ventral y dorsal, con abundante marca anterógrada y retrógrada en el AcbC y CPu. Bc: 500  $\mu$ m. En **C** observamos en detalle el AcbC. Bc: 100  $\mu$ m.

encontramos otros, uno en el septum medial y HDB, y otro en el VP, bilateral en ambos casos. Hay que añadir que también aparecían axones marcados anterógradamente en la capa 2 del OT ipsilateral a niveles caudales (cuando cruza los hemisferios la comisura anterior). En cuanto al marcaje retrógrado, obtuvimos unas pocas neuronas marcadas ipsilateralmente en el CPu más ventral, en el AcbShV, y bilateralmente en el VP.

### Inyecciones en el área prerrubra

La inyección en el área prerrubra (M0327B, Fig. 2.13) nos dio un marcaje escaso en el estriado, mostrando algunos axones marcados anterógradamente en algún ICj. Donde sí que observamos un marcaje mayor fue en el septum medial, donde se apreciaban diversas fibras marcadas anterógradamente. A nivel del mesencéfalo encontramos abundante marca anterógrada y retrograda en el núcleo rojo. Y con en menor medida encontramos unos pocos somas marcado en la SNR, así como unas cuantas fibras marcadas en la VTA medial y el PAG.



**Figura 2.13.** Fotomicrografías digitales de la inyección M0327B situada en el área prerrubra. En **A** observamos el lugar de inyección. Bc: 500  $\mu$ m. En **B** observamos el estriado ventral, con escasa marca y el septum medial. En **C** observamos el mesencéfalo, con abundante marcaje en el núcleo rojo.

### Inyecciones en el núcleo interpeduncular

Tras inyecciones en el núcleo interpeduncular (M0319B, M0402R) no observamos marca anterógrada ni retrograda en el estriado ni en el VTA. En su lugar observamos marca retrograda en otras áreas del núcleo interpeduncular y en ambas habenulas.

### Inyecciones en el núcleo reticulopontino

Realizamos una inyección en el núcleo reticulopontino (M0329R) sin que obtuviésemos marca anterógrada ni retrógrada en el estriado o el VTA.

### Inyecciones en el fascículo retroflejo

La inyección que realizamos en el fascículo retroflejo (M0333R) no mostró marca anterógrada ni retrograda en el estriado ventral ni dorsal, ni tampoco en el VTA o SN. En su lugar pudimos observar abundante marca anterógrada en la habenula ipsilateral y el núcleo interpeduncular.

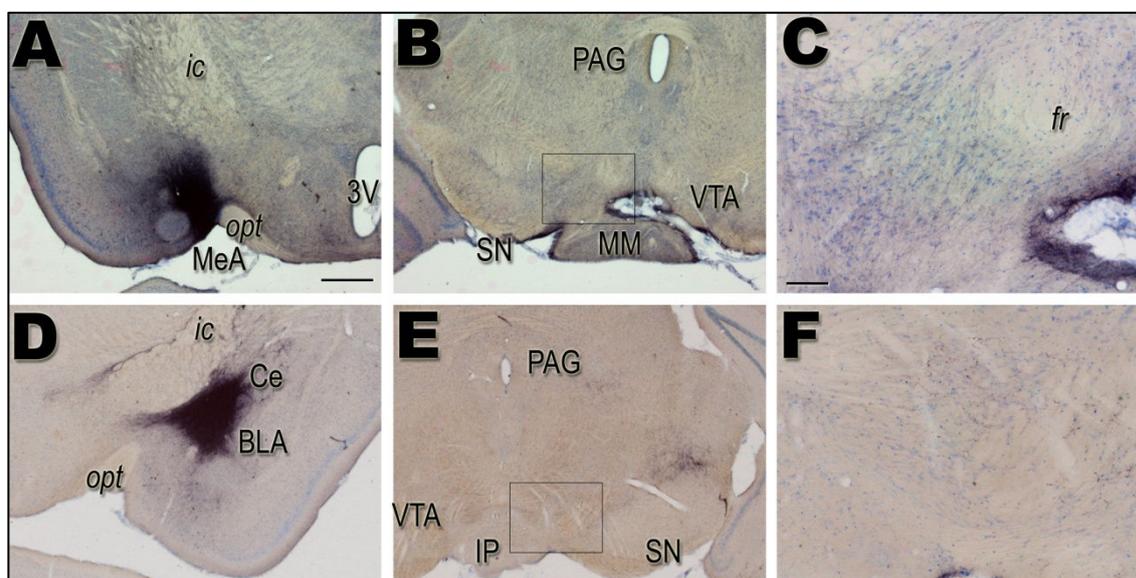
### **3. b. Inyecciones en centros diana del VTA**

#### Inyecciones en la amígdala medial

Tras la inyección en la amígdala medial (M0331B, Fig. 2.14 A-C) pudimos observar marca anterógrada en el VTA ipsilateral, principalmente en sus regiones laterales.

#### Inyecciones en la amígdala central

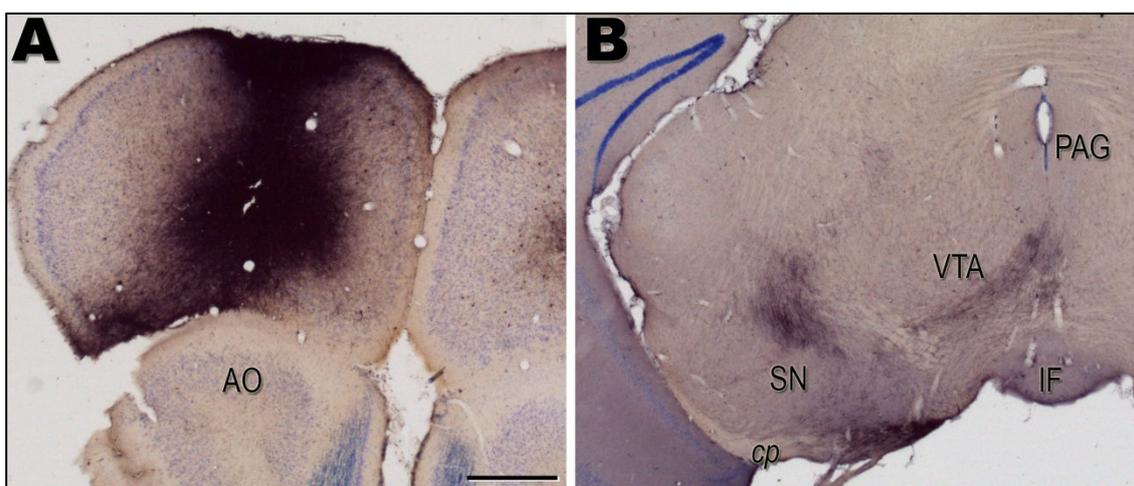
Al realizar una inyección en la amígdala central (M0231B, Fig. 2.14 D-F) observamos escasa marca anterógrada en el VTA. Estos pocos axones marcados anterógradamente están presentes a lo largo de toda la VTA.



**Figura 2.14.** Fotomicrografías digitales de la inyección M0331B y M0231B en la amígdala medial anterior y central respectivamente. En **A** y **D** observamos el lugar de inyección. Bc: 500  $\mu$ m. En **B** observamos el marcaje anterógrado en el mesencéfalo. Observamos como aparecen fibras marcadas principalmente el VTA lateral. En **C** observamos con detalle marcadas en el VTA. Bc: 100  $\mu$ m. En **E** observamos el marcaje anterógrado en el mesencéfalo. Observamos como aparecen fibras marcadas en todo el VTA ipsilateral, En **F** observamos con detalle marcadas en el VTA. Bc: 100  $\mu$ m.

### Inyecciones en el cortex prefrontal

Realizamos una serie de inyecciones en la corteza prefrontal, centradas en el área orbitofrontal (M0423-B, M0423-R, M0424-B, M0424-R, Fig. 2.15). No encontramos marcaje retrógrado en el mesencéfalo en ninguna de las inyecciones. En todas ellas, encontramos un campo de terminación conspicuo en el VTA ipsilateral (tanto en niveles laterales como mediales) y en menor medida algunas fibras en el contralateral. Además, formando un continuo con este campo terminal encontramos marcaje anterógrado en la SNC cercana al VTA, aunque en ocasiones se prolongaba bastante lateral, y numerosas fibras lisas marcadas en la parte basal del pedúnculo cerebral (*cp*). Entre ambos observamos algunas fibras marcadas en un número menor en la parte reticular de la substantia nigra (SNR). Medialmente, las fibras marcadas anterógradamente se prolongaban por el RLi hasta la parte ventral del PAG, donde las fibras marcadas parecían concentrarse en el Su3.



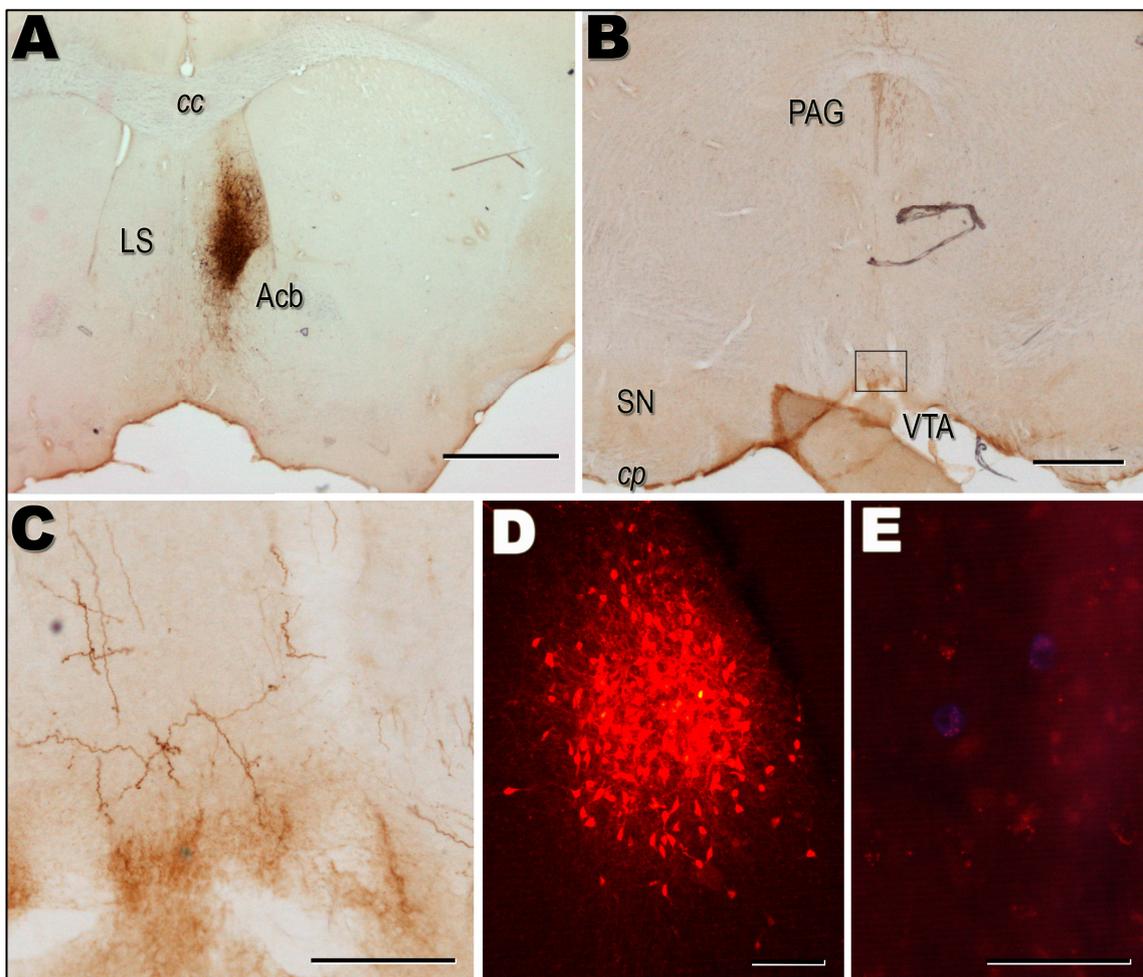
**Figura 2.15.** Fotomicrografías digitales de la inyección M0423B en la corteza orbitofrontal. En **A** observamos el lugar de inyección. Bc: 500  $\mu$ m. En **B** observamos el marcaje anterógrado en el mesencéfalo. Observamos como aparecen fibras marcadas en todo el VTA ipsilateral, así como en la SN y pedúnculo cerebral.

### Inyecciones en el septum

Tras inyecciones en el septum lateral (M0420B, M0312-B, Fig. 2.16 A) pudimos observar un campo de terminación marcado anterógradamente que abarcaba todo el VTA ventral, aunque con una mayor incidencia en el VTA medial (Fig. 2.16 B y C). Junto a estos axones marcados, aparecían también en el SuM y desde el VTA se internaban en el RLi hasta el PAG, donde formaba otro campo terminal, sobre todo a nivel dorsal, y se extendía por la línea media de los colículos ipsilaterales. El marcaje retrógrado obtenido fue similar al anterógrado. Obtuvimos somas marcadas en el VTA,

principalmente a nivel medial. Observamos algunas neuronas marcadas retrógradamente en el SuM, contralaterales también. Y en el PAG, los somas retrógradamente marcados eran un poco más ventrales que el campo de terminación descrito. Además pudimos observar algunos somas en el MnR. Todo esto coincide con lo descrito previamente (Risold & Swanson, 1997)

Además, las inyecciones que realizamos con RDA (M07139R, Fig. 2.16 D ) y las observamos con microscopia de fluorescencia en vez de revelarlas con DAB, observamos como ya hemos comentado, aparecían marcadas neuronas en el VTA, RLi y PAG. Al realizar una inmunohistoquímica fluorescente para la TH pudimos comprobar que había algunas coincidencias entre las neuronas marcadas retrógradamente y las TH-ir en todos los núcleos (Fig. 2.16 E).



**Figura 2.16.** Fotomicrográficas digitales de las inyecciones M0312B y M07139R en el septum lateral corteza. En **A** observamos el lugar de inyección de M0312B. Bc: 1 mm. En **B** observamos el marcaje anterógrado en el mesencéfalo, presente principalmente en el VTA medial y el PAG. Bc: 500  $\mu$ m. En **C** observamos un detalle de B. Bc: 100  $\mu$ m. En **D** observamos el lugar de inyección de M07139R. La RDA emite luz roja. Bc: 100  $\mu$ m. En **E** observamos algunas neuronas dopaminérgicas (en azul, anticuerpo fluorescente para la TH) con puntos rojos que indican el transporte retrogrado de la RDA. Bc: 100  $\mu$ m.

### Inyecciones en el *shell* medial del núcleo accumbens

Hicimos una serie de inyecciones centradas en el AcbShM (M0303-B, M0419-B, Fig. 2.17 A) que afectaron en algún caso también el ICjM (M03030-B).

El marcaje retrógrado en el mesencéfalo consistía en un grupo más o menos compacto de neuronas en el VTA ipsilateral, en niveles intermedios del eje antero-posterior. Las células marcadas se situaban cercanas a la línea media del VTA en sus regiones más caudales (Fig. 2.17D, G). Además pudimos observar alguna neurona marcada en las regiones más caudales del RLi. Fuera del mesencéfalo son destacables algunos somas marcados retrógradamente en el córtex frontal, localizados en PrL e IL. .

En cuanto al marcaje anterógrado, este era bastante extenso. En los niveles más anteriores del VTA, el marcaje anterógrado se concentraba en su parte más medial y rodeaba por completo al fascículo retroflejo. A niveles más caudales las fibras marcadas se encontraban junto a las neuronas marcadas retrógradamente, pero pudimos observar fibras que se extendían en la parte lateral del VTA ipsilateral, así como en la SNC más medial. Junto a estas observamos unas pocas fibras lisas en el *cp*. Además observamos algunas fibras sueltas en el VTA contralateral medial y en el RLi caudal.

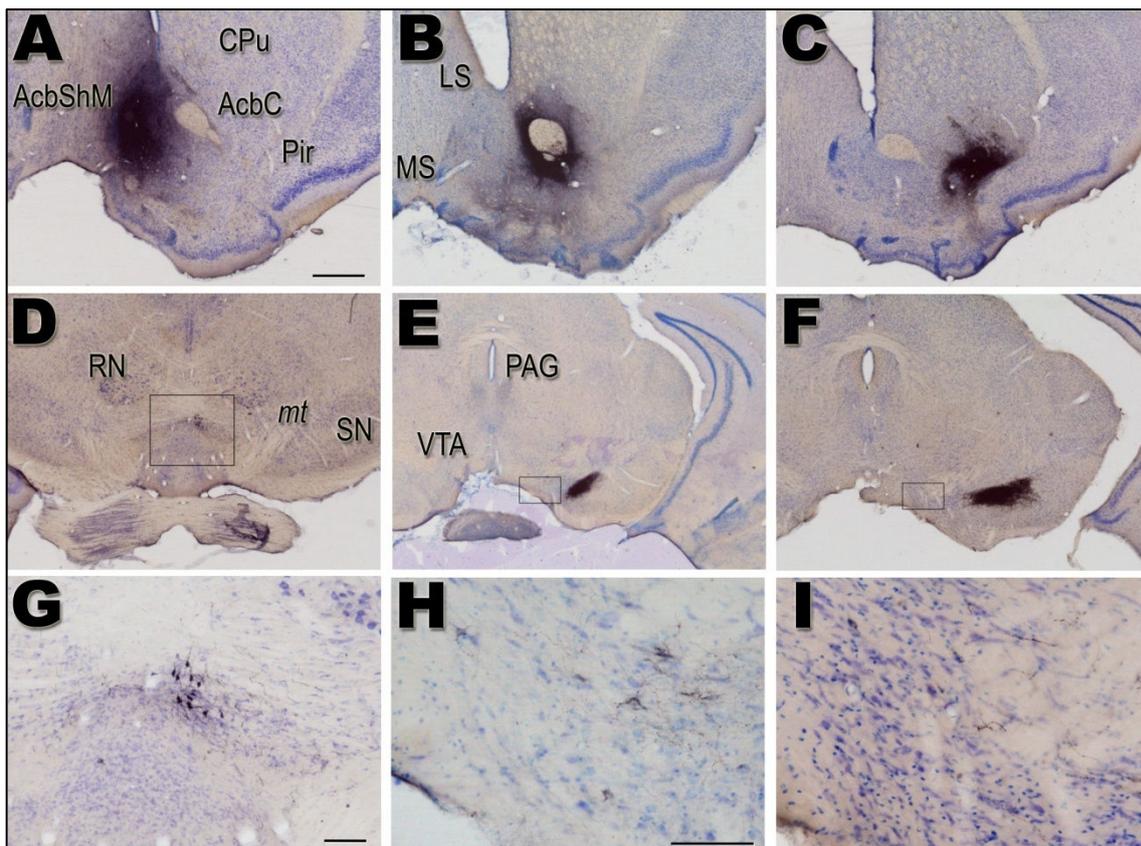
### Inyecciones en el núcleo accumbens *core*

Tras inyecciones en el AcbC (M0332-R, M0337-B, M0338-R, M0339-B, Fig. 2.17B) observamos somas con depósitos granulares de DAB dando un perfil puntuado en las neuronas del mesencéfalo, aunque no obtuvimos ningún perfil completamente marcado. Estas neuronas marcadas retrógradamente se situaban en la parte más lateral del VTA cercanas al lemnisco medial, aunque también vimos alguna cercana al fascículo retroflejo por su parte lateral. El hecho que el marcaje sea puntuado-granular junto a la gran densidad de fibras marcadas anterógradamente en la SNC nos impide observar si existen neuronas marcadas retrógradamente en la SNC.

En el VTA apenas aparecían unas pocas fibras marcadas anterógradamente. Sin embargo, como hemos adelantado, en la SNC hay una gran densidad de fibras marcadas con botones en su parte más medial, muy concentradas sobretodo en niveles anteriores. A niveles más caudales se extienden lateralmente por debajo del *ml* hasta porciones intermedias.

### Inyecciones en el caudatus putamen

Hicimos algunas inyecciones en el CPu, a nivel ventrolateral (M0333-B, M0105-B, Fig. 2.17 C) y medial (M0439-B). En el caso de las inyecciones ventrales obtuvimos un denso campo marcado en la SNR ipsilateral, siempre adyacente a la SNC en todo su eje antero-posterior, que a niveles anteriores abarcaba desde la parte medial hasta la intermedia, mientras que a niveles caudales se concentraba lateralmente. En este campo marcado se podían distinguir numerosos axones con botones sinápticos marcados anterógradamente que se extendían en menos cantidad hacia partes más ventrales de la SNR y más mediales de la SNC. Además, entre estos axones pudimos observar somas marcadas retrógradamente en la SNR, aunque la marca era tan intensa que a veces era difícil distinguirlos, y en la SNC medial pudimos ver algún soma marcado retrógradamente. En el caso de la inyección medial obtuvimos un campo terminal ipsilateral marcado anterógradamente restringido a la SNR más medial. En ambos casos encontramos fibras lisas marcadas anterógradamente en el *cp*.



**Figura 2.17.** Fotomicrografías digitales de las inyecciones M0419B, M 0339-B y M0333B en el AcbShM, AcbC y CPu ventral. En **A**, **B** y **C** observamos el lugar de inyección de las diferentes inyecciones. Bc: 500  $\mu$ m. En **D**, **E** y **F** observamos el marcaje en el mesencéfalo ventral, donde las neuronas marcadas retrógradamente se observan en VTA medial, VTA lateral y transición VTA-SN, mientras que el marcaje anterógrado se sitúa en áreas más laterales (visible claramente en **E** y **F**). En **G** observamos un detalle de **D**, donde las neuronas marcadas retrógradamente están situadas en el VTA medial. Bc: 100  $\mu$ m. En **H** y **I** observamos los detalles de **E** y **F**, donde podemos observar que algunas neuronas contienen un marcaje puntuado que indica transporte retrogrado desde el lugar de inyección. Bc: 100  $\mu$ m.

## **Discusión**

La discusión se estructura en cuatro apartados. En primer lugar, hemos de tener en cuenta algunas consideraciones metodológicas que afectan a la interpretación de los resultados. Después analizamos las aferencias al VTA reveladas por nuestros resultados y su posible significado funcional. Más específicamente, discutiremos los posibles inputs sensoriales al VTA, en el contexto de los estímulos reforzantes naturales. En el tercer apartado discutimos la actividad de las neuronas DAérgicas y su posible papel en la señalización del refuerzo y en otras funciones. Y por último discutimos la especial disposición entre las interconexiones del tegmento y el estriado y su posible significado funcional.

### **Consideraciones metodológicas**

Debido a que el VTA es un núcleo heterogéneo y su morfología varía a lo largo de su eje anteroposterior (García *et al.*, 1966) y mediolateral, resulta muy difícil obtener inyecciones que abarquen toda una zona del VTA, y al mismo tiempo estén restringidas exclusivamente al VTA. Para poder descartar marcaje anterógrado o retrógrado que no correspondiese por completo al VTA realizamos algunas inyecciones en estructuras colindantes tales como el núcleo interpeduncular, el área pre-rubra, la *substantia nigra* o los núcleos reticulopontino y supramamilar, o el fascículo retroflejo. Esto nos permitió interpretar correctamente el marcaje que observábamos en algunas inyecciones que no se restringían por completo al VTA y validar, por el contrario, el marcaje restante. Igualmente, nos permitió asegurarnos de que algunas inyecciones estaban confinadas al VTA.

Así, el marcaje anterógrado observado en las inyecciones en el SuM nos permitió eliminar de nuestra descripción las fibras marcadas anterógradamente en algunas capas moleculares del hipocampo y en la capa granular del giro dentado observadas, por ejemplo, en la inyección M0338-B.

Otro problema metodológico inherente a la inyección extracelular de neurotrazadores es que éstos no sólo son captados por los somas y las fibras terminales del lugar de inyección, sino que también pueden ser captados por “fibras de paso”, que atraviesan el núcleo de estudio hacia otros centros diana. En cualquier caso, al realizar la descripción de los resultados de las inyecciones que nos interesaban hemos tenido en

cuenta las “fibras de paso” a partir de bibliografía previa para poder excluirlas del estudio. En este sentido ha sido útil la inyección restringida al fascículo retroflejo.

Otra manera de solventar este problema es realizar inyecciones de trazadores en los centros en los que se había obtenido axones marcados anterógradamente tras las inyecciones en el centro problema (en nuestro caso el VTA). En la medida de lo posible, nosotros hemos usado esta estrategia inyectando trazadores en el núcleo accumbens, la amígdala, el cortex frontal, el BST y el septum lateral. Tras estas inyecciones obtuvimos somas marcadas retrógradamente en el VTA, lo que confirma que el marcaje descrito previamente en estos centros diana no se debe ni a núcleos colindantes ni a “fibras de paso”.

El principal problema derivado del uso de trazadores que dan lugar tanto a transporte retrógrado como anterógrado es que no podemos descartar que parte de los axones marcados anterógradamente sean axones colaterales de las neuronas retrógradamente marcadas y por tanto, en realidad no se originarían en somas del lugar de inyección. Por tanto, en aquellas áreas que reciben una proyección del VTA y de algún núcleo que proyecte al VTA, no podemos estar seguros que todos los axones marcados que hemos observado provengan del VTA. Éste problema se plantea en diversos casos como, por ejemplo, el pálido ventral (VP), en donde las inyecciones en el VTA dan lugar a fibras marcadas que podrían originarse no sólo en la propia VTA sino también en las neuronas marcadas retrógradamente del Acb (Fig. 2.6A). En algunos de estos casos, las inyecciones en los centros diana también nos pueden permitir confirmar la existencia de las proyecciones desde el VTA, como ocurre con la corteza prefrontal. La corteza prefrontal proyecta al VTA y al Acb, y parte de los axones vistos en el Acb pueden ser colaterales axónicas de las neuronas marcadas retrógradamente en el PFC. Sin embargo, el transporte retrógrado observado en la VTA tras las inyecciones en el PFC nos permite confirmar esta proyección.

Por tanto, la interpretación del marcaje anterógrado debe tener en cuenta la posibilidad de que el origen de la proyección sea doble. Por ejemplo, cuando observamos estrecha relación espacial entre el marcaje retrógrado y el anterógrado. En el VP se observa lo que podrían ser contactos sinápticos entre axones marcados y somas marcadas, aunque estos hipotéticos contactos deberíamos confirmarlos mediante microscopía electrónica. De confirmarse estos contactos, las neuronas del VTA proyectan sobre neuronas palidales que a su vez proyectan de vuelta al mismo grupo de neuronas permitiendo una retroalimentación casi inmediata. Es posible, sin embargo,

que estos axones sean colaterales axónicas de neuronas del Acb, en cuyo caso las neuronas palidales que proyectan al VTA, recibirían una proyección estriatal desde neuronas que, a su vez, proyectan al mismo grupo de neuronas tegmentales. El circuito sería más complejo, y la respuesta no sería tan inmediata, pero la retroalimentación mediada por esta organización espacial se mantendría.

### **Aferencias comunes al VTA del ratón: anatomía funcional de los estímulos reforzantes**

Nuestros resultados coinciden con los estudios previos en ratas, tanto en las aferencias del VTA (Phillipson, 1979; Swanson, 1982; Oades & Halliday, 1987; Geisler & Zahm, 2005; Omelchenko & Sesack, 2005; Del Fava *et al*, 2007; Ikemoto, 2007), como en sus eferencias, cuya descripción se encuentra más fraccionada en diversos artículos (Brinley-Reed & McDonald, 1999; Kirouac & Pittman, 2000; Ohara *et al*, 2003; Ikemoto, 2007; Li *et al*, 2008).

Recientemente Geisler y Zahm (2005) han propuesto que el VTA debería ser considerado parte de la zona nuclear isodendrítica del tronco del encéfalo (Ramon-Moliner & Nauta, 1966) ya que sus neuronas poseen un árbol dendrítico largo y poco ramificado (Phillipson, 1979) similar al de las neuronas de otras zonas de la “formación reticular”. Además, como hemos visto, las neuronas del VTA reciben proyecciones de una gran variedad de áreas de naturaleza bien distinta. Por todas estas características, el VTA tiene una notable capacidad integradora.

En este sentido, nuestros resultados sugieren la existencia de un patrón similar de aferencias a las distintas porciones de la VTA desde diversos niveles del tronco del encéfalo, el diencefalo y el córtex telencefálico. Este patrón parece similar en ratón (nuestros resultados) y en rata (Phillipson, 1979; Geisler y Zham, 2005). Estos hallazgos nos inducen a pensar que las neuronas del VTA son capaces de integrar información de diversas modalidades a través de este amplio abanico de aferencias convergentes que pueden otorgar a las neuronas del VTA una gran excitabilidad con una baja especificidad.

Dado que los estímulos reforzantes que hemos utilizado en nuestros experimentos (ver capítulos 3 y 4) son el agua, el sabor dulce y las feromonas sexuales nos centraremos en el sistema de la homeostasis hidrosalina, el sistema gustativo, y el sistema vomeronasal (las feromonas sexuales son detectadas por el órgano vomeronasal; Martínez-Ricós *et al*, 2008). Si la estimulación de estos sistemas, como predice la

hipótesis de la dopamina del refuerzo (ver Wise, 2004), desencadenan la liberación de DA en el Acb, la información de estas modalidades sensoriales debería acceder al VTA.

La transmisión de la información gustativa tiene varios relevos a lo largo del encéfalo y encontramos una conexión entre algunos de ellos y el VTA. La información procedente de los botones gustativos llega mediante los nervios craneales VII, IX y X hasta su primer relevo en el núcleo del tracto solitario (NST, Astrom, 1953; Torvik, 1956). Desde éste hay una proyección ipsilateral al núcleo pontino parabraquial (PBN, Schwartzbaum & DiLorenzo, 1982; Norgren, 1983), el cual proyecta bilateralmente al núcleo gustativo talámico (o núcleo talámico posteromedial ventral, VPM, Norgren, 1983) y desde el VPM la información llega a la corteza gustativa (o insular, Norgren & Wolf, 1975; Norgren, 1983; Kosar *et al*, 1986). De estos cuatro puntos de relevo de la información gustativa no observamos marca retrógrada en el VPM ni en el NST. Pero como ya hemos descrito, tanto la corteza gustativa como las divisiones medial y lateral del PBN presentan neuronas retrógradamente marcadas tras inyecciones en la VTA (tanto mediales como laterales). Igualmente, existe una vía gustativa desde el PBN al hipotálamo lateral, que como hemos visto también proyecta al VTA, por lo que es otra posible vía de entrada de la información gustativa al VTA.

La acción de beber cuando un animal tiene sed es reforzante. Un animal que ha sido privado trabajará para obtener agua. Sin embargo, los mecanismos que detectan que el animal está bebiendo e inhiben el acto de beber se encuentran en la boca y esófago del animal, ya que la absorción del agua y restitución del estado homeostático de los fluidos del animal se produce un tiempo después de beber, unos 40-45 minutos (Ramsay *et al*, 1977). Así, parece que los receptores en la boca y garganta influyen en la cantidad que un animal bebe, aunque son secundarios a los que se encuentran en el intestino e hígado. Thrasher *et al* (1981) midieron la cantidad de agua consumida y el tiempo de consumo en perros a los que se les había implantado una fístula gástrica en su estómago. De esta manera podían dejar cerrada la fístula, de manera que los animales absorbían el agua con normalidad y dejaban de beber entre 10-20 min antes de ser absorbida, o dejarla abierta, vaciando el contenido del estómago del animal e impidiendo que el agua fuese absorbida. Lo que observaron, es que no había diferencia ni en el consumo ni en el tiempo de saciación (cuando dejaban de beber) entre los animales con la fístula abierta o cerrada hasta pasado el tiempo de absorción del agua, aunque los animales con la fístula abierta volvían a beber al no recuperarse su estado homeostático. Si al contrario, los investigadores introducían agua por la fístula, de

manera que esta no pasaba por la boca ni el esófago, el animal mantenía la sed hasta que el agua no había sido absorbida y se recuperaban los niveles homeostáticos. Mediante la eliminación de las neuronas viscerales que proyectan por el nervio vago, o la lesión de su lugar de proyección, el núcleo del tracto solitario (Sol) y el área postrema (Curtis *et al.*, 1996), observaron que las ratas consumían excesivas cantidades de agua, especialmente en los primeros instantes del test. En el área postrema no hemos observado neuronas marcadas retrógradamente, pero como hemos comentado anteriormente con los estímulos gustativos, el NST proyecta al PBN y este al VTA. Por lo que es muy posible que el refuerzo producido por el agua converja con el utilizado con la información gustativa.

Sin embargo la sed, es decir, la motivación por la ingesta de líquido, actúa como modulador del refuerzo. El agua resulta reforzante o no en función del estado homeostático del animal. Así, para un animal saciado el agua no es reforzante. La sed es desencadenada por dos tipos de estímulos. Por un lado, la llamada sed osmométrica es provocada por la detección de un aumento de la osmolaridad del fluido intersticial. Por otro, la sed volumétrica o barométrica es desencadenada por una disminución del volumen sanguíneo detectado como una disminución de la presión arterial. La sed osmométrica es consecuencia de la activación de los osmorreceptores del área preóptica: así las lesiones del área preóptica afectan sensiblemente a la sed osmométrica, aunque no la hace desaparecer (Peck & Novin, 1971; Coburn & Stricker, 1978). Parece que estos osmorreceptores proyectan ipsilateralmente a la zona *incerta* (ZI), que regula directamente el comportamiento de ingesta de líquidos (Mok & Mogenson, 1986), muy probablemente a través de sus proyecciones a los ganglios basales, la formación reticular, el área gris periacueductal, el núcleo rojo y la columna ventral de la medula espinal (Ricardo, 1981). Nuestros resultados muestran proyecciones sobre el VTA tanto desde el área preóptica como desde la zona *incerta*, que podrían ser responsables de la motivación por beber derivada de la sed osmométrica.

La sed volumétrica depende del sistema renina-angiotensina, un par de hormonas cuya producción es provocada por disminuciones en la presión arterial detectadas por los barorreceptores renales y provocan, entre sus múltiples efectos en el cuerpo (constricción de los vasos sanguíneos y aumento de la presión arterial, aumento de la aldosterona y disminución de la diuresis), un efecto central consistente en un incremento de la motivación por ingerir líquidos (la sed). La angiotensina II, la hormona

responsable del efecto central del sistema, es detectada por el órgano subfornical (una región circunventricular situada fuera de la barrera hematoencefálica y que posee receptores para la angiotensina; Simpson *et al*, 1978). Las neuronas del órgano subfornical proyectan al núcleo preóptico mediano (MnPO, Miselis *et al*, 1979) el cual a su vez contiene también receptores para la angiotensina II (aunque los receptores están en el interior de la barrera hematoencefálica y por tanto no está expuesto a sangre). Lind y Johnson (1982) proponen que serían las propias neuronas del órgano subfornical las que interiorarían la angiotensina II y la utilizarían como neurotransmisor en el MnPO. A su vez el MnPO proyecta al área lateral hipotalámica, área preóptica, *substantia innominata*, PAG (Uschakov *et al*, 2007) y VTA como hemos visto en nuestros resultados. Por tanto, también la motivación por beber derivada de la sed volumétrica puede depender de las proyecciones desde el MnPO (y/o el área preóptica) al VTA.

En cuanto a las posibles vías de entrada de la información vomeronasal en el sistema del refuerzo tegmento-estriatal, las neuronas receptoras del órgano vomeronasal envía directamente sus proyecciones a los bulbos olfativos accesorios (AOB), y después de este primer relevo, la información llega a los diferentes subnúcleos de la amígdala vomeronasal, principalmente la amígdala medial, el núcleo cortical posteromedial amigdalino y la parte posteromedial del núcleo de la stria terminalis (Scalia & Winans, 1975; Olmos *et al*, 1978; vonCampenhausen y Mori, 1999; Brennan, 2001). Desde aquí, la información vomeronasal se proyecta a otros núcleos amigdalinos, incluyendo el área amigdalino-hipocámpica. Todos ellos parecen estar implicados en el control de comportamientos reproductores y agonísticos desencadenados por señales químicas de conespecíficos dado su patrón de conexiones con el hipotálamo y el sistema septo-hipocámpico, así como la presencia de receptores para esteroides sexuales (Canteras *et al*., 1992; Canteras *et al*., 1995; Novejarque, 2008). Además, en la amígdala medial, confluye también información de origen olfativo proveniente del bulbo olfativo principal y otros centros corticales y amigdalinos (Pro-Sistiaga *et al*., 2007; Kang *et al*., 2009). Nuestros datos indican que existe una conexión entre la amígdala medial y el VTA, aunque ésta no sea masiva. Por esta vía la información vomeronasal podría llegar al VTA y estimular la liberación de DA, desencadenado así el refuerzo asociado a feromonas sexuales (en general, a estímulos químicos reforzantes). También puede relevar información vomeronasal al VTA el núcleo de la stria terminalis, puesto que recibe del bulbo olfativo accesorio y proyecta, como hemos visto, sobre el VTA. Esta proyección es excitatoria en rata y se ha demostrado que activa las neuronas

dopaminérgicas del VTA (Georges y Aston-Jones, 2002), aunque hasta donde sabemos no existen datos funcionales sobre la posible participación de esta proyección en el refuerzo asociado a feromonas sexuales. Otra posible vía de acceso de información vomeronasal al sistema del refuerzo se origina en el núcleo posteromedial cortical de la amígdala, que proyecta directamente al estriado ventral (Novejarque, 2008; Úbeda-Bañón et al., 2008). Allí las neuronas de la amígdala posteromedial cortical podrían estimular las neuronas del Acb o bien provocar la liberación de DA mediante una sinápsis axoaxónica en los axones provenientes del VTA (Floresco et al, 1998).

Al mismo tiempo, el VTA proyecta al *nucleus incertus* (Olucha-Bordonau et al, 2003) El *nucleus incertus* proyecta a través del *mfb* hacia estructuras telencefálicas, como el septum medial e hipocampo. En el hipocampo se ha observado que grandes poblaciones de neuronas sincronizan su actividad, por lo que pueden registrarse como un patrón de ondas electroencefalográficas, según el estado de actividad del animal. Resultan especialmente interesantes las ondas *theta* (Green & Arduini, 1954) que se producen durante el sueño REM y cuando el animal despierto explora activamente (Vanderwolf, 1969). Un animal anósmico no explora (Mandiyan et al, 2005), por lo que es posible que la vía de activación de la exploración por estímulos olfativos, vaya desde la MeA hasta el VTA y desde aquí al *nucleus incertus*.

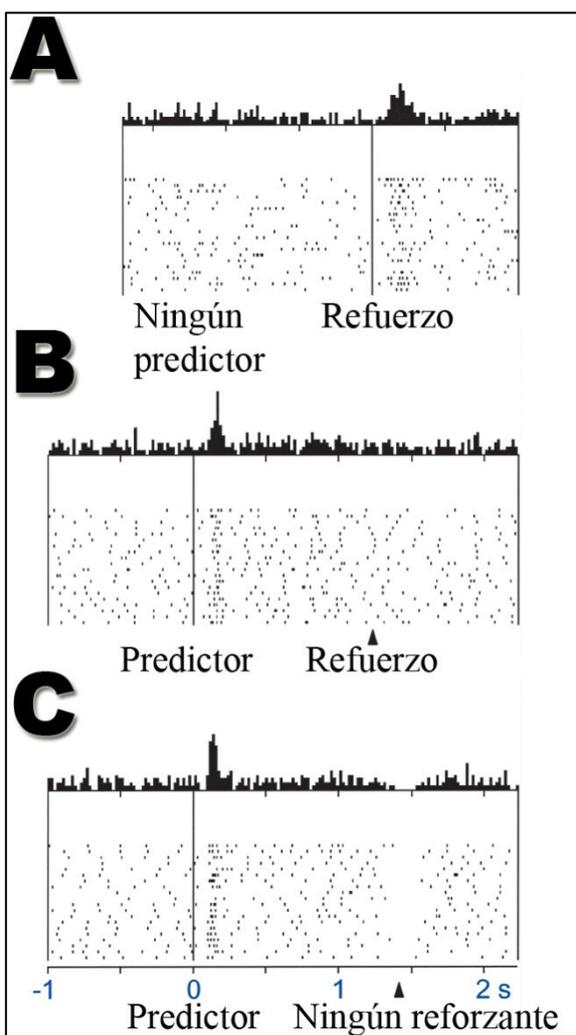
Además, hemos visto mediante marcaje retrógrado que el VTA recibe proyecciones desde el *nucleus incertus*. Estas proyecciones se habían descrito con anterioridad utilizando marcadores anterógrados tras inyecciones en éste (Olucha-Bordonau et al, 2003). Que el VTA esté interconectado con el *nucleus incertus* y éste esté implicado en la generación y reseteo de las ondas *theta* del hipocampo, indica que existe una estrecha relación entre la exploración y la atención de eventos novedosos que pueden tener relevancia biológica y por tanto pueden ser reforzantes.

Entre las diversas proyecciones hacia el VTA que hemos observado en nuestro material y que pueden tener importancia funcional debido también a su implicación en los procesos de atención (Dellu et al, 1991; Sturm et al, 1999; Kozak et al, 2005), los cuales son necesarios para detectar un estímulo reforzante, destacaremos las proyecciones ascendentes desde el núcleo tegmental pedunculopontino (PPTg) y el núcleo laterodorsal tegmental (LDTg), grupos neuronales que poseen células colinérgicas y glutamatérgicas. Mediante estudios electrofisiológicos en la rata se ha comprobado que la activación de estos centros provoca trenes de descarga en las neuronas de la VTA (Floresco et al, 2003; Lodge & Grace, 2006). De hecho, Lodge y

Grace (2006) observaron que la inervación glutamatérgica desde el LDTg al VTA es necesaria para que se produzcan trenes de descarga normales en el VTA, puesto que si se inactiva esta proyección las neuronas DAérgicas tegmentales responden como lo harían *in vitro*, con un patrón de disparo altamente regular y ausencia de trenes de despolarización espontáneos o provocados por glutamato. Además, según Omelchenko & Sesack (2005), la proyección desde el LDTg parece controlar no sólo las células DAérgicas, sino también las las células GABAérgicas de la VTA. Usando microscopía electrónica, estos autores observaron que aproximadamente el 50% de las proyecciones del LDTg al VTA son excitatorias (asimétricas, probablemente glutamatérgicas) e inervan a neuronas DA y GABAérgicas. Además comprobaron que en ambas poblaciones neuronales (DAérgicas y GABAérgicas) las células que proyectaban a la corteza prefrontal recibían por igual la proyección excitatoria, mientras que entre las neuronas que proyectan al núcleo accumbens tan solo reciben el input excitatorio desde el LDTg las neuronas DAérgicas, y no las GABAérgicas. El otro 50% de los terminales axónicos desde LDTg son inhibitorios (contactos simétricos) e inervan por igual a las neuronas GABAérgicas mesoprefrontales y mesoaccumbens, pero tan solo inhiben a las neuronas DAérgicas que proyectan al cortex prefrontal. Así, parece que el LDTg media una influencia excitatoria sobre las neuronas DAérgicas del VTA que proyectan al núcleo accumbens, y una inhibitoria sobre las GABAérgicas. Su efecto neto, por lo tanto, es una activación de la vía tegmento-estriatal. De hecho, se ha visto que la infusión local en la VTA de antagonistas del glutamato o de la acetilcolina (los neurotransmisores dominantes en el LDTg), disminuyen la liberación de DA en el Acb tras la estimulación eléctrica en el LDTg (Forster & Blaha, 2003; Lester *et al.*, 2008).

Respecto a las aferencias descendentes sobre el VTA también existe una gran divergencia en los neurotransmisores utilizados. Muchas neuronas de diversos núcleos que proyectan al VTA son glutamatérgicas (Geisler *et al.*, 2007), principalmente desde núcleos subcorticales (Geisler *et al.*, 2007; Omelchenko & Sesack, 2007) ya que muchas de las aferencias contienen VGluT2 (transportador vesicular de glutamato subtipo 2) que es característico de neuronas subcorticales. Además de estas aferencias subcorticales, como es lógico también las aferencias provenientes de la corteza son glutamatérgicas, y expresan VGluT1 (transportador vesicular de glutamato subtipo 1, característico de neuronas corticales, Geisler *et al.*, 2007). Esta proyección cortical se origina principalmente en las capas profundas del PFC (corteza prelimbica e infralimbica, corteza orbitofrontal y corteza cingulada), y en menor medida (menos del

10% del total) en la corteza peduncular dorsal, corteza insular, en el núcleo endopiriforme y el núcleo basolateral de la amígdala. Omelchenko y Sesack (2007) usando microscopía electrónica, observaron que en todas las neuronas de la VTA, independientemente de su naturaleza (DAérgicas o GABAérgicas) recibían una mayor proporción de axones que contienen VGluT2 (marcador de aferencias subcorticales) que VGluT1 (marcador de aferencias corticales). Además los axones VGluT2 acababan más proximalmente sobre el árbol dendrítico de las células tegmentales. Por otra parte, la proporción de aferencias glutamatérgicas subcorticales (VGluT2) era mayor en las neuronas tegmento-estriatales que en las meso-corticales. Estos datos sugieren que las



**Figura 2.18.** Respuesta de neuronas DAérgicas del VTA. En **A** frente a un refuerzo inesperado. En **B** el animal ha asociado el estímulo predictor al refuerzo, respondiendo las neuronas frente al predictor y no frente al refuerzo. En **C** se produce el estímulo predictor pero no se produce el refuerzo en el plazo esperado, por lo que las neuronas inhiben su respuesta. Modificado de Schultz, 2001.

aferencias subcorticales tienen un peso mayor en la actividad de las células de la VTA que las corticales y, demuestran diferencias claras entre los mecanismos de control de la actividad de las neuronas que proyectan al núcleo accumbens y las que proyectan a la corteza prefrontal. Esto concuerda con nuestros datos, a pesar que nuestro estudio no ha sido cuantitativo, si que hemos observado una mayor proporción de neuronas subcorticales marcadas en todas las áreas inyectadas del VTA.

Mediante la medición electrofisiológica de la actividad de las neuronas tegmentales, Schultz (1998, 2001) ha propuesto una función para las neuronas dopaminérgicas, alternativa a la de señalar el placer o el refuerzo. Observó que la mayoría de las neuronas DAérgicas se activaban de manera fásica al encontrarse con algún refuerzo inesperado (Fig. 2.18 A). Tras un periodo de aprendizaje las neuronas DAérgicas

dejan de responder al estímulo reforzante, pero se activan frente al predictor, y por tanto ha habido una transferencia del estímulo desencadenante de la activación del reforzante al predictor (Fig. 2.18 B). Por último, si después de producirse el estímulo predictor el refuerzo no llega o está devaluado, se produce una inhibición o depresión de la actividad de las neuronas DAérgicas (Fig. 2.18 C). Si, por el contrario, tras el estímulo predictor se produce un refuerzo mayor del esperado, las neuronas DAérgicas del VTA vuelven a activarse por éste último. Si el predictor se corresponde con la recompensa esperada, no se producen cambios en la actividad eléctrica de la neurona. Además de activarse en estos casos, las neuronas DAérgicas del VTA también se activan frente algún estímulo de relevancia intenso o novedoso (Strecker & Jacobs, 1985; Ljungberg *et al*, 1992; Horvitz *et al*, 1997). Y unas pocas neuronas DAérgicas del VTA se activan después de estímulos aversivos, aunque con incrementos o descensos menores de la actividad eléctrica (Chiodo *et al*, 1979; Schultz & Romo, 1987) o liberación de DA en el estriado (Louilot *et al*, 1986; Abercrombie *et al*, 1989; Doherty & Gratton, 1992; Young *et al*, 1992). Es posible que esta respuesta frente a estímulos reforzantes o aversivos, se deba a las diferencias en la actividad eléctrica de la subpoblación descrita por Lammel *et al* (2008) que observaron neuronas atípicas, que no poseían autorreceptores D2 acoplados al canal Girk2, de rápida respuesta, bajos niveles de DAT y que proyectaban al PFC, al AcbShM, al AcbC y BLA.

Sin embargo, las neuronas DAérgicas no parecen capaces de discriminar entre diferentes tipos de recompensas. Son capaces de determinar la presencia o ausencia de un reforzante y si era esperado o no, pero su función no parece ser determinar la naturaleza del reforzante (probablemente debido a la diversidad de inputs que poseen estas neuronas).

Por todo esto, Schultz propone que las neuronas DAérgicas codifican componentes atencionales relacionados con el refuerzo señalando errores en la predicción del mismo (Schultz, 2001). Las neuronas de otras estructuras cerebrales, como el estriado, el cortex orbitofrontal o la amígdala, codificarían la calidad, cantidad y la preferencia por los refuerzos (Schultz, 2001). Así, la idea del refuerzo esperado puede provenir del cortex orbitofrontal (Schoenbaum & Roesch, 2005). Se ha visto mediante técnicas de imagen cerebrales que esta estructura se activa en actividades de aprendizaje inverso (cuando el predictor de un refuerzo pierde su valor de predictor y el sujeto ha de percibirlo) en humanos (Cools *et al*, 2002; Morris & Dolan, 2004; Hampton *et al*, 2006) y las lesiones del orbitofrontal en ratas y primates impiden el

aprendizaje inverso a pesar que su capacidad para aprender asociaciones originales continua intacta (Meunier *et al*, 1997; McAlonan & Brown, 2003; Chudasama *et al*, 2003; Schoenbaum *et al*, 2003; Izquierdo *et al*, 2004;). Como hemos visto, existe una proyección desde las neuronas del orbitofrontal a todo el VTA, por lo que el valor esperado proveniente del orbitofrontal (probablemente inhibitorio de las neuronas del VTA, Carr & Sesack, 2000) puede coincidir con los estímulos reforzantes en el VTA, en cuyo caso que la actividad de las neuronas no se altera (Fig. 2.18B), mientras que si no coincide se produce la inhibición de las neuronas (Fig. 2.18C).

### **Vías tegmento-estriatales y estriado-tegmentales: una espiral de ida y vuelta (Fig. 2.19)**

La relación topográfica medio-lateral en las conexiones entre el VTA y el estriado ventral se ha descrito anteriormente en rata (Ikemoto, 2007) y en macacos (Haber *et al*, 2000). En ambas especies los dos centros están profusamente interconectados según un complejo patrón de conexiones. Este trabajo constituye el primer estudio de las conexiones recíprocas entre el tegmento y el estriado en una especie tan utilizada para investigaciones neurobiológicas como el ratón.

En este sentido, el transporte anterógrado observado en nuestras inyecciones tegmentales indica que el VTA medial proyecta principalmente al AcbShM y a los ICj mediales (incluyendo al ICjM). Estos datos son corroborados por el marcaje retrógrado tras inyecciones en el AcbShM. Las inyecciones en el AcbShM también muestran axones marcados en el VTA medial, mientras que tras las inyecciones en el VTA medial se observa marcaje retrógrado en neuronas del AcbShM y los ICj mediales. Estos datos indican que los componentes mediales del estriado ventral y los grupos tegmentales dopaminérgicos están conectados recíprocamente. Pero, además, las inyecciones en el estriado ventral medial (AcbShM) dan lugar a un denso campo de marcaje terminal en una zona del VTA lateral que no muestra neuronas retrógradamente marcadas. Este marcaje indica la existencia de una vía estriado-tegmental no recíproca.

Por su parte, las inyecciones de trazadores localizadas en esta zona del VTA lateral dan lugar a abundante marcaje retrógrado y anterógrado en el AcbC y AcbSh ventral, así como en los ICj laterales y las partes más mediales del CPU. También en este caso, estos datos son refrendados por los resultados de las inyecciones de trazadores en el AcbC, en las que se observan somas marcadas retrógradamente en el VTA lateral entre los que se aprecian unos pocos axones marcados anterógradamente. Así pues,

también entre los componentes laterales del estriado ventral y de la VTA parece existir una conexión recíproca. No obstante, el grueso del marcaje anterógrado tras estas inyecciones en el AcbC se encuentra en la SNC medial, lo que indica la existencia de una proyección AcbC-SN no recíproca.

Por su parte, las inyecciones en la SNC dan lugar a abundantes axones marcados en distintas regiones del CPu, mientras que las inyecciones en el CPu marcaban un denso campo terminal en la SNR.

Estos datos anatómicos indican que, en el ratón, como describieron en el macaco Haber *et al* (2000), existe una espiral tegmento-estriado-tegmental (Fig. 2.1). Las áreas más mediales del estriado reciben proyecciones de los grupos mediales tegmentales sobre los cuales proyectan de forma recíproca. Probablemente, este componente recíproco de la vía estriado-tegmental, posee una función de retroinhibición o *feedback* negativo sobre la vía dopaminérgica tegmento-estriatal. Pero además, las proyecciones desde estas regiones mediales del estriado son masivas hacia zonas más laterales del tegmento, las cuales activarían. Esto generaría una activación de una nueva vía tegmento-estriatal más lateral que se retroinhibiría (proyecciones de vuelta estriado-tegmentales) y activaría un componente aun más lateral, en una espiral funcional.

Este esquema supone la existencia de proyecciones directas desde las neuronas estriatales GABAérgicas a las neuronas tegmento-estriatales dopaminérgicas, lo que mediaría la retroinhibición inducida por la vía estriado-tegmental recíproca. Nuestros datos son compatibles con esta interpretación, dado que hemos observado no sólo solapamiento entre el marcaje retrógrado y anterógrado en el VTA tras las inyecciones en el Acb, sino incluso cestas de axones marcados sobre somas retrógradamente marcados. Del mismo modo, hemos observado axones marcados anterógradamente sobre somas del núcleo Acb marcados retrógradamente tras inyecciones en el VTA.

No obstante el microscopio óptico no permite afirmar que existan contactos sinápticos directos, que deberían comprobarse mediante observaciones al microscopio electrónico.

De la misma manera, para activar los componentes más laterales de la vía tegmento-estriatal, las proyecciones estriado-tegmentales no recíprocas que se originan en neuronas GABAérgicas del estriado ventral, deberían acabar sobre interneuronas GABAérgicas del VTA y no hacerlo sobre neuronas dopaminérgicas. Con ello, esta vía mediaría una desinhibición de las vías tegmento-estriatales laterales. Los datos electrofisiológicos en la rata indican que, efectivamente, la estimulación eléctrica del

Acb provoca la activación de neuronas GABAérgicas en el VTA (Steffensen *et al*, 1998), pero hacen falta más estudios de la conectividad de el VTA y Acb para confirmar la hipótesis propuesta por Haber *et al* (2000) y refrendada por nuestros datos en el ratón. La falta de solapamiento entre los campos de terminación masivos y la zona en la que se observan neuronas marcadas no significa necesariamente falta de conectividad, que podría darse a través de dendritas distales. Sin embargo, las aferencias más cercanas al soma neuronal y las dendritas más próximas ejercen una mayor influencia en la actividad eléctrica de la neurona que si fuesen en dendritas distales (Spruston *et al*, 1994; Magee & Johnston, 1997).

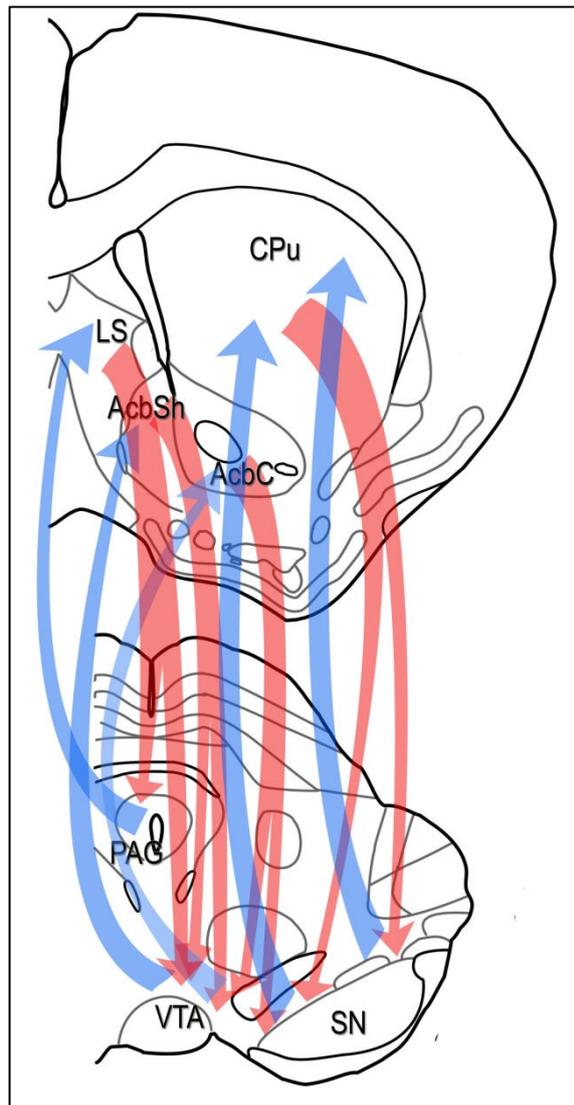
Nuestros datos anatómicos indican que, al menos en el ratón, el grupo dopaminérgico A10 presenta clara continuidad con un pequeño grupo de neuronas dopaminérgicas TH-ir y DAT-ir presentes en la PAG (Capítulo 1), que constituirían de hecho, la división más medial del mismo. Los resultados del presente capítulo indican que algunas de estas neuronas proyectan al LS (Fig. 2.16 E) y que las neuronas del LS proyectan al VTA medial (marcaje retrogrado en LS tras inyecciones en VTA medial). Aunque no podemos afirmar que las mismas neuronas del LS que reciben la proyección DAérgica de las neuronas más mediales del grupo A10 (en el PAG) proyecten de vuelta al VTA medial, sí que existe la prueba de que los tres centros están unidos con un esquema que recuerda al de la espiral estriado-tegmento-estriatal. Por ello, sugerimos que la espiral nigro-estriado-nigra que propuso Haber *et al* (2000) en macacos, se extiende más medialmente en el ratón (a falta de estudios en otras especies) para incluir el septum lateral como el componente estriatal más medial (Swanson & Risold, 1999; Lanuza *et al.*, 2002; Lanuza & Martinez-Garcia, 2009) y el PAG como el componente dopaminérgico mesencefálico más medial. Ello permitiría integrar el circuito hipocampo-septal en la espiral estriado-tegmento-estriatal, lo que podría tener importantes consecuencias funcionales en procesos tales como la adquisición de preferencia de lugar inducida por estímulos reforzantes.

**La espiral dopaminérgica y el refuerzo: ¿una función con cada vuelta?**

Aunque hay pruebas evidentes de que las vías DAérgicas son clave en la neurobiología del refuerzo, no existe consenso sobre el papel de la neurotransmisión DAérgica en los distintos procesos que componen el refuerzo y la recompensa. Se ha propuesto que la dopamina media el incremento de la motivación inducido por los estímulos recompensantes así como otros procesos de aprendizaje asociados a los mismos (Berridge y Robinson, 1998; 2003; Wise, 2004). Otros autores sugieren la existencia de diferentes funciones de la transmisión dopaminérgica, con diferentes escalas temporales (Schultz, 2007), entre las que destacan la participación de la liberación fásica de DA en la señalización de errores en la predicción del refuerzo a partir de los estímulos que lo preceden (estímulos predictores).

Nuestros datos anatómicos permiten elaborar una propuesta según la cual en la espiral estriado-tegmento-estriatal la DA podría tener funciones diferentes con cada paso de la espiral. La respuesta en el estriado a la DA es heterogénea y determinada por múltiples variables, como las complejas interacciones entre los distintos receptores (DiChiara *et al*, 1994; Starr, 1995; Arburthnott & Wickens, 1996; Wickens *et al*, 1996; Calabresi *et al*, 1997), por lo que la respuesta final obtenida no depende exclusivamente de su relación con las neuronas tegmentales, sino también de la propia idiosincrasia de las neuronas estriatales.

Como hemos expuesto en el Capítulo I, la relación en el septum de neuronas estriatales y palidales es equivalente a la



**Figura 2.19.** Esquema de las conexiones de la espiral tegmento-estriatal. Mientras las áreas tegmentales dopaminérgicas proyectan a un área más lateral en el estriado, la proyección de vuelta envía información al punto de origen y un área más lateral. De esta manera es capaz de retroinhibir la señal y que se desplace lateralmente.

que ocurre en los ganglios basales (Swanson & Risold, 1999). Nuestras inyecciones en el VTA más medial indican que los compartimentos estriatal (SL) y palidal (SM y DBN) del septum reciben bilateralmente fibras del VTA medial y PAG, en lo que el septum también se asemeja al complejo estriado-palidal ventral. Sin embargo, tras inyecciones más laterales en el VTA las fibras marcadas anterógradamente se restringen al LS, concentrándose en su división dorsal ipsilateral. En los primeros experimentos de autoestimulación en ratas, Olds y Milner (1954) observaron que la implantación de un electrodo que los animales podían activar mediante una palanca, daba lugar a tasas de activación (palanqueo) muy elevadas en ciertas áreas del cerebro, mientras que en otras no provocaba ningún cambio en la tasa de respuesta del animal o llegaban incluso a reducirla. Curiosamente la primera área cerebral en las que la implantación de electrodos indujo la autoestimulación fue el LS (y en menor medida el Cg y *mt*). Es posible que Olds y Milner (1954) estuviesen activando el inicio de la espiral tegmento-estriatal, provocando una activación de toda ella, lo que explicaría el refuerzo de la estimulación en el LS.

Todo esto es consistente con la idea que proponíamos en el Capítulo I, de que la sincronía de la DA con ciertos inputs hipocámpicos puede participar en ciertos procesos de aprendizaje (Simon *et al*, 1986), o situar en el espacio ciertas condiciones reforzantes, que después serían empleadas para determinados aprendizajes, cómo el condicionamiento de preferencia de lugar.

En otras áreas del estriado los inputs desde el tegmento convergen con proyecciones glutamatérgicas desde otras regiones del cortex. Presumiblemente la activación sincrónica de estos *inputs* convergentes está implicada en fenómenos de plasticidad sináptica subyacentes a diferentes procesos de aprendizaje. Así, es posible que la función de la DA en el AcbSh esté más relacionada con los procesos primarios de la recompensa (Berridge & Robinson, 2003), más directamente relacionados con la hedonia (*liking*). Al ir avanzando en esta espiral, el papel de la DA podría estar más relacionado con la predicción de errores o la motivación del animal (*wanting*) para obtener el refuerzo (Salamone *et al*, 2002; Salamone & Correa, 2002; Berridge & Robinson, 2003). Por último, las vías finales (laterales) de la espiral participarían en la adquisición de automatismos comportamentales y de pautas motoras, con los que se relaciona el estriado dorsal (Miller, 1983; Marsden and Obeso, 1994; Jueptner and Weiller, 1998; Canales & Graybiel, 2000; Rebec, 2006). De hecho, se sabe que esta espiral tiene una fuerte relación con los hábitos y adicciones. Belin y Everitt (2008)

demonstraron que interrumpiendo esta espiral disminuyen significativamente los comportamientos compulsivos para la obtención de cocaína en ratas altamente entrenadas. Para ello provocaron la lesión unilateral del AcbC y la inyección en el estriado contralateral de un antagonista de la DA. Esta interrupción del final de la espiral, provoca una disminución de pautas motoras estereotipadas o automatismos para la obtención de droga (según los autores comportamientos compulsivos).

En este sentido, Winter *et al* (2008) observaron que se mantenía la tasa de respuesta con un estímulo devaluado en ratas entrenadas que habían sufrido una lesión del núcleo subtalámico. Estas ratas parece que no eran capaces de percibir la devaluación del estímulo (comida cuando ya no sufrían una situación de restricción) y mantenían el comportamiento compulsivo de apretar la palanca. Cuando, se realizó el estudio neuroquímico del cerebro de estas ratas se observó un descenso en la DA en el CPu (pero no el Acb), junto a una disminución de la serotonina en PrL, IL, CPu, GP y SN/VTA.

Otra prueba, esta vez de carácter clínico, de la relación entre el CPu y los movimientos estereotipados o automatizados nos la dan los pacientes que sufren corea de Huntington, quienes no pueden evitar hacer movimientos estereotipados incontrolados. En estos enfermos se ha observado una muerte de las neuronas GABAérgicas del CPu (Bird & Iversen, 1977) que proyectan hacia la división externa del GP (Carpenter, 1976; Gandia & Gimenez-Amaya, 1991). Probablemente estas neuronas participan en procesos inhibitorios de movimientos o comportamientos automatizados, por lo que su desaparición desencadena la ejecución incontrolada de estos movimientos.

Los ganglios basales, en su conjunto, forman parte de un sistema mayor del que forman parte circuitos reverberantes que comienzan en diversas áreas corticales que proyectan sobre regiones discretas del estriado (vías cortico-estriatales), las cuales proyectan al pálido, éste al tálamo y éste, finalmente, de vuelta al área cortical que originaba el circuito (Middleton & Strick, 2000). Los diferentes circuitos cortico-estriado-tálamo corticales reverberantes, originados en distintas áreas de la corteza, no se encuentran interconectados directamente. Globalmente, estos circuitos participarían en la cognición, toma de decisiones y el aprendizaje usando criterios de economía del esfuerzo y el beneficio del refuerzo (Haruno & Kawato, 2006).

En este marco neuroanatómico, las vías DA sobre el estriado podrían coordinar los diferentes circuitos cortico-estriatales, integrando los componentes afectivos (refuerzo;

inputs prefrontales, hipocámpicos y amigdalinos sobre el estriado medial y ventral), con los cognitivos (vías corticales al estriado ventral y dorsal desde áreas límbicas multimodales como las PrF y Cg; Alexander et al, 1990; Eblen & Graybiel, 1995; Sorensen *et al*, 1995; Christensen *et al*, 1999) y los motores (inputs somatotópicos desde las áreas corticales motoras y premotoras al estriado dorsal; Takada *et al*, 1998; Gerardin *et al*, 2003) del comportamiento y el aprendizaje. Dado que, como hemos dicho, éstos circuitos no están conectados entre sí, la modulación de las vías cortico-estriatales por las aferencias DAérgicas tegmentales (Schultz & Dickinson, 2000; Takikawa *et al*, 2004), a través de las sucesivas vueltas de la espiral estriado-tegmento-estriatal jugaría un papel clave para la coordinación de estos componentes en respuestas comportamentales adaptativas complejas que incluyen procesos de aprendizaje y plasticidad.

Esta hipótesis viene refrendada por los estudios de Haruno y Kawato (2006), quienes usando técnicas funcionales de neuroimagen (resonancia magnética funcional) comprobaron que en los seres humanos los circuitos afectivos y cognitivos de este circuito cortico-estriatal (corteza cingular anterior y núcleo caudado) se activan al principio del aprendizaje, cuando se realiza mayoritariamente una estrategia de predicción de error. Sin embargo, en las fases finales del aprendizaje, cuando los sujetos actúan con una estrategia estímulo-respuesta estereotipada, se activan circuitos más laterales y meramente motores, relacionados con la formación de hábitos y estereotipias, cómo el área premotora y el núcleo putamen.

**Bibliografía**

- Abercrombie, E. D., Keefe, K.A., DiFrischia, D.S. & Zigmond, M.J. (1989) Differential effect of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens, and medial frontal cortex. *J. Neurochem.*, 52, 1655-1658.
- Alexander, G. E. & Crutcher, M.D. (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits: Neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci.*, 13, 266-271.
- Arbuthnott, G. W. & Wickens, J.R. (1996) Dopamine cells are neurones too! *Trends Neurosci.*, 19, 279-280.
- Astrom, K. E. (1953) The central course of afferent fibres in the trigeminal, facial, glossopharyngeal and vagal nerves and their nuclei in the mouse. *Acta physiol. scand.*, 29 supply. 106, 209-320.
- Beckstead, R. M., Domesick, V.B. & Nauta, W.J. (1979) Efferent connections of the substantia nigra and ventral tegmental area in the rat. *Brain Res.*, 175, 191-217.
- Belin, D. & Everitt, B.J. (2008) Cocaine seeking habits depend upon dopamine-dependent serial connectivity linking the ventral with the dorsal striatum. *Neuron*, 57, 432-441.
- Berridge, K. C. & Robinson, T.E. (1998) What is the role of dopamine in reward: Hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 28, 309-369.
- Berridge, K. C. & Robinson, T.E. (2003) Parsing reward. *Trends Neurosci.*, 26, 507-513.
- Bird, E. D. & Iversen, L.L. (1977) Neurochemical findings in huntington's chorea. *Essays Neurochem. Neuropharmacol.*, 1, 177-195.
- Brennan, P. A. (2001) The vomeronasal system. *Cell Mol. Life Sci.*, 58, 546-555.
- Brinley-Reed, M. & McDonald, A.J. (1999) Evidence that dopaminergic axons provide a dense innervation of specific neuronal subpopulations in the rat basolateral amygdala. *Brain Res.*, 850, 127-135.
- Brog, J. S., Salyapongse, A., Deutch, A.Y. & Zahm, D.S. (1993) The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: Immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J. Comp. Neurol.*, 338, 255-278.
- Cadusseau, J. & Roger, M. (1988) Description of a large projection from the mesodiencephalic junction to the rostral red nucleus. an anatomical study in the rat and in the cat. *Behav. Brain Res.*, 28, 81-86.

- Calabresi, P., Pisani, A., Centonze, D. & Bernardi, G. (1997) Synaptic plasticity and physiological interactions between dopamine and glutamate in the striatum. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 21, 519-523.
- Canales, J. J. & Graybiel, A.M. (2000) A measure of striatal function predicts motor stereotypy. *Nat. Neurosci.*, 3, 377-383.
- Canteras, N. S., Simerly, R. B. & Swanson, L. W. (1992) Connections of the posterior nucleus of the amygdala. *J Comp Neurol.* 324, 143-179.
- Canteras, N. S., Simerly, R. B. & Swanson, L. W. (1995) Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J Comp Neurol.* 360, 213-245.
- Carpenter, M. B. (1976) Anatomy of the basal ganglia and related nuclei: A review. *Adv. Neurol.*, 14, 7-48.
- Carr, D. B. & Sesack, S.R. (2000) Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: Target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *J. Neurosci.*, 20, 3864-3873.
- Cassell, M. D., Freedman, L.J. & Shi, C. (1999) The intrinsic organization of the central extended amygdala. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 877, 217-241.
- Chiodo, L. A., Caggiula, A.R., Antelman, S.M. & Lineberry, C.G. (1979) Reciprocal influences of activating and immobilizing stimuli on the activity of nigrostriatal dopamine neurons. *Brain Res.*, 176, 385-390.
- Christensen, J., Sorensen, J.C., Ostergaard, K. & Zimmer, J. (1999) Early postnatal development of the rat corticostriatal pathway: An anterograde axonal tracing study using biocytin pellets. *Anat. Embryol. (Berl)*, 200, 73-80.
- Chudasama, Y. & Robbins, T.W. (2003) Dissociable contributions of the orbitofrontal and infralimbic cortex to pavlovian autoshaping and discrimination reversal learning: Further evidence for the functional heterogeneity of the rodent frontal cortex. *J. Neurosci.*, 23, 8771-8780.
- Coburn, P. C. & Stricker, E.M. (1978) Osmoregulatory thirst in rats after lateral preoptic lesions. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 92, 350-361.
- Cools, R., Clark, L., Owen, A.M. & Robbins, T.W. (2002) Defining the neural mechanisms of probabilistic reversal learning using event-related functional magnetic resonance imaging. *J. Neurosci.*, 22, 4563-4567.
- Curtis, K. S., Verbalis, J.G. & Stricker, E.M. (1996) Area postrema lesions in rats appear to disrupt rapid feedback inhibition of fluid intake. *Brain Res.*, 726, 31-38.

- De Olmos, J., Hardy, H. & Heimer, L. (1978) The afferent connections of the main and the accessory olfactory bulb formations in the rat: An experimental HRP-study. *J. Comp. Neurol.*, 181, 213-244.
- Del-Fava, F., Hasue, R.H., Ferreira, J.G. & Shammah-Lagnado, S.J. (2007) Efferent connections of the rostral linear nucleus of the ventral tegmental area in the rat. *Neuroscience*, 145, 1059-1076.
- Dellu, F., Mayo, W., Cherkaoui, J., Le Moal, M. & Simon, H. (1991) Learning disturbances following excitotoxic lesion of cholinergic pedunculo-pontine nucleus in the rat. *Brain Res.*, 544, 126-132.
- Di Chiara, G., Morelli, M. & Consolo, S. (1994) Modulatory functions of neurotransmitters in the striatum: ACh/dopamine/NMDA interactions. *Trends Neurosci.*, 17, 228-233.
- Doherty, M. D. & Gratton, A. (1992) High-speed chronoamperometric measurements of mesolimbic and nigrostriatal dopamine release associated with repeated daily stress. *Brain Res.*, 586, 295-302.
- Eblen, F. & Graybiel, A.M. (1995) Highly restricted origin of prefrontal cortical inputs to striosomes in the macaque monkey. *J. Neurosci.*, 15, 5999-6013.
- Fadel, J. & Deutch, A.Y. (2002) Anatomical substrates of orexin-dopamine interactions: Lateral hypothalamic projections to the ventral tegmental area. *Neuroscience*, 111, 379-387.
- Fallon, J. H. & Moore, R.Y. (1978) Catecholamine innervation of the basal forebrain. IV. topography of the dopamine projection to the basal forebrain and neostriatum. *J. Comp. Neurol.*, 180, 545-580.
- Feldman, S. G. & Kruger, L. (1980) An axonal transport study of the ascending projection of medial lemniscal neurons in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 192, 427-454.
- Floresco, S. B., West, A.R., Ash, B., Moore, H. & Grace, A.A. (2003) Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nat. Neurosci.*, 6, 968-973.
- Forster, G. L. & Blaha, C.D. (2003) Pedunculopontine tegmental stimulation evokes striatal dopamine efflux by activation of acetylcholine and glutamate receptors in the midbrain and pons of the rat. *Eur. J. Neurosci.*, 17, 751-762.
- Gandia, J. A. & Gimenez-Amaya, J.M. (1991) A neuroanatomical analysis of the rostral striatopallidal pathway in the rat. *J. Hirnforsch.*, 32, 79-88.
- Garcia, J., Ervin, F.R. & Koelling, R.A. (1966) Learning with prolonged delay of reinforcement. *Psychonomic Science.*, Vol 5(3), 121-122.

- Geisler, S. & Zahm, D.S. (2005) Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. *J. Comp. Neurol.*, 490, 270-294.
- Geisler, S., Derst, C., Veh, R.W. & Zahm, D.S. (2007) Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat. *J. Neurosci.*, 27, 5730-5743.
- Georges, F. & Aston-Jones, G. (2002) Activation of ventral tegmental area cells by the bed nucleus of the stria terminalis: a novel excitatory amino acid input to midbrain dopamine neurons. *J. Neurosci.*, 22, 5173-5187.
- Gerardin, E., Lehericy, S., Pochon, J.B., Tezenas du Montcel, S., Mangin, J.F., Poupon, F., Agid, Y., Le Bihan, D. & Marsault, C. (2003) Foot, hand, face and eye representation in the human striatum. *Cereb. Cortex*, 13, 162-169.
- Green, J. D. & Arduini, A.A. (1954) Hippocampal electrical activity in arousal. *J. Neurophysiol.*, 17, 533-557.
- Groenewegen, H. J., Wright, C.I., Beijer, A.V. & Voorn, P. (1999) Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 877, 49-63.
- Haber, S. N., Fudge, J.L. & McFarland, N.R. (2000) Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *J. Neurosci.*, 20, 2369-2382.
- Hampton, A. N., Bossaerts, P. & O'Doherty, J.P. (2006) The role of the ventromedial prefrontal cortex in abstract state-based inference during decision making in humans. *J. Neurosci.*, 26, 8360-8367.
- Haruno, M. & Kawato, M. (2006) Heterarchical reinforcement-learning model for integration of multiple cortico-striatal loops: fMRI examination in stimulus-action-reward association learning. *Neural Netw.*, 19, 1242-1254.
- Hasue, R. H. & Shammah-Lagnado, S.J. (2002) Origin of the dopaminergic innervation of the central extended amygdala and accumbens shell: A combined retrograde tracing and immunohistochemical study in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 454, 15-33.
- Horvitz, J. C., Stewart, T. & Jacobs, B.L. (1997) Burst activity of ventral tegmental dopamine neurons is elicited by sensory stimuli in the awake cat. *Brain Res.*, 759, 251-258.
- Ikemoto, S. & Wise, R.A. (2004) Mapping of chemical trigger zones for reward. *Neuropharmacology*, 47 Suppl 1, 190-201.
- Ikemoto, S., Qin, M. & Liu, Z.H. (2005) The functional divide for primary reinforcement of D-amphetamine lies between the medial and lateral ventral striatum: Is the division of the accumbens core, shell, and olfactory tubercle valid? *J. Neurosci.*, 25, 5061-5065.

- Ikemoto, S. (2007) Dopamine reward circuitry: Two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res. Rev.*, 56, 27-78.
- Izquierdo, A., Suda, R.K. & Murray, E.A. (2004) Bilateral orbital prefrontal cortex lesions in rhesus monkeys disrupt choices guided by both reward value and reward contingency. *J. Neurosci.*, 24, 7540-7548.
- Jueptner, M. & Weiller, C. (1998) A review of differences between basal ganglia and cerebellar control of movements as revealed by functional imaging studies. *Brain*, 121 (Pt 8), 1437-1449.
- Kalivas, P. W. (1993) Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 18, 75-113.
- Kang, N., Baum, M. J. & Cherry, J. A. (2009) A direct main olfactory bulb projection to the 'vomeronasal' amygdala in female mice selectively responds to volatile pheromones from males. *Eur J Neurosci.* 29, 624-634.
- Kirouac, G. J. & Pittman, Q.J. (2000) A projection from the ventral tegmental area to the periaqueductal gray involved in cardiovascular regulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 278, R1643-50.
- Kosar, E., Grill, H.J. & Norgren, R. (1986) Gustatory cortex in the rat. II. Thalamocortical projections. *Brain Res.*, 379, 342-352.
- Kozak, R., Bowman, E.M., Latimer, M.P., Rostron, C.L. & Winn, P. (2005) Excitotoxic lesions of the pedunculopontine tegmental nucleus in rats impair performance on a test of sustained attention. *Exp. Brain Res.*, 162, 257-264.
- Lammel, S., Hetzel, A., Hackel, O., Jones, I., Liss, B. & Roeper, J. (2008) Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron*, 57, 760-773.
- Lanuza, E., Novejarque, A., Moncho-Bogani, J., Hernandez, A. & Martinez-Garcia, F. (2002) Understanding the basic circuitry of the cerebral hemispheres: The case of lizards and its implications in the evolution of the telencephalon. *Brain Res. Bull.*, 57, 471-473.
- Lanuza E, Martínez-García F. (2009) Evolution of septal nuclei. In Binder MD, Hirokawa N, Windhorst U (ed), *Encyclopedia of Neuroscience*. Springer, Heidelberg, pp. 1219-1225.
- Leranth, C. & Hajszan, T. (2007) Extrinsic afferent systems to the dentate gyrus. *Prog. Brain Res.*, 163, 63-84.
- Lester, D. B., Miller, A.D., Pate, T.D. & Blaha, C.D. (2008) Midbrain acetylcholine and glutamate receptors modulate accumbal dopamine release. *Neuroreport*, 19, 991-995.

- Li, Y., Fang, F., Wang, X. & Lei, H. (2008) Neuronal projections from ventral tegmental area to forebrain structures in rat studied by manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Magn. Reson. Imaging*, en prensa, doi:10.1016/j.mri.2008.07.011.
- Ljungberg, T., Apicella, P. & Schultz, W. (1992) Responses of monkey dopamine neurons during learning of behavioral reactions. *J. Neurophysiol.*, 67, 145-163.
- Lodge, D. J. & Grace, A.A. (2006) The laterodorsal tegmentum is essential for burst firing of ventral tegmental area dopamine neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103, 5167-5172.
- Louilot, A., Le Moal, M. & Simon, H. (1986) Differential reactivity of dopaminergic neurons in the nucleus accumbens in response to different behavioral situations. an in vivo voltammetric study in free moving rats. *Brain Res.*, 397, 395-400.
- Magee, J. C. & Johnston, D. (1997) A synaptically controlled, associative signal for hebbian plasticity in hippocampal neurons. *Science*, 275, 209-213.
- Mandiyani, V. S., Coats, J.K. & Shah, N.M. (2005) Deficits in sexual and aggressive behaviors in Cnga2 mutant mice. *Nat. Neurosci.*, 8, 1660-1662.
- Marsden, C. D. & Obeso, J.A. (1994) The functions of the basal ganglia and the paradox of stereotaxic surgery in parkinson's disease. *Brain*, 117 ( Pt 4), 877-897.
- Martinez-Garcia, F., Novejarque, A. & Lanuza, E. (2007) Evolution of the amygdala in vertebrates. In Kaas, J. H. (ed), *Evolution of Nervous Systems. A Comprehensive Reference*. Elsevier Academic Press, Oxford, pp. 255-334.
- Martinez-Marcos, A., Lanuza, E., Font, C. & Martinez-Garcia, F. (1999) Afferents to the red nucleus in the lizard *Podarcis hispanica*: Putative pathways for visuomotor integration. *J. Comp. Neurol.*, 411, 35-55.
- Martinez-Ricos, J., Agustin-Pavon, C., Lanuza, E. & Martinez-Garcia, F. (2008) Role of the vomeronasal system in intersexual attraction in female mice. *Neuroscience*, 153, 383-395.
- McAlonan, K. & Brown, V.J. (2003) Orbital prefrontal cortex mediates reversal learning and not attentional set shifting in the rat. *Behav. Brain Res.*, 146, 97-103.
- Meunier, M., Bachevalier, J. & Mishkin, M. (1997) Effects of orbital frontal and anterior cingulate lesions on object and spatial memory in rhesus monkeys. *Neuropsychologia*, 35, 999-1015.
- Middleton, F. A. & Strick, P.L. (2000) Basal ganglia and cerebellar loops: Motor and cognitive circuits. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 31, 236-250.
- Miller, J. C. (1983) Sex differences in dopaminergic and cholinergic activity and function in the nigro-striatal system of the rat. *Psychoneuroendocrinology*, 8, 225-236.

- Miselis, R. R., Shapiro, R.E. & Hand, P.J. (1979) Subfornical organ efferents to neural systems for control of body water. *Science*, 205, 1022-1025.
- Mok, D. & Mogenson, G.J. (1986) Contribution of zona incerta to osmotically induced drinking in rats. *Am. J. Physiol.*, 251, R823-32.
- Moncho-Bogani, J., Lanuza, E., Hernandez, A., Novejarque, A. & Martinez-Garcia, F. (2002) Attractive properties of sexual pheromones in mice. innate or learned? *Physiol. Behav.*, 77, 167-176.
- Morris, J. S. & Dolan, R.J. (2004) Dissociable amygdala and orbitofrontal responses during reversal fear conditioning. *Neuroimage*, 22, 372-380.
- Nauta, W. J. H., Smith, G.P., Faull, R.L.M. & Domesick, V.B. (1978) Efferent connections and nigral afferents of the nucleus accumbens septi in the rat. *Neuroscience*, 3, 385-401.
- Newman, R. & Winans, S.S. (1980) An experimental study of the ventral striatum of the golden hamster. I. neuronal connections of the nucleus accumbens. *J. Comp. Neurol.*, 191, 167-192.
- Norgren, R. & Wolf, G. (1975) Projections of thalamic gustatory and lingual areas in the rat. *Brain Res.*, 92, 123-129.
- Norgren, R. (1983) Afferent interactions of cranial nerves involved in ingestion. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 9, 67-77.
- Novejarque, A. (2008) Evolución del cerebro emocional: Análisis comparado de las vías amígdalo-estriatales. Tesis Doctoral. Universitat de València.
- Oades, R. D. & Halliday, G.M. (1987) Ventral tegmental (A10) system: Neurobiology. 1. anatomy and connectivity. *Brain Res.*, 434, 117-165.
- Ohara, P. T., Granato, A., Moallem, T.M., Wang, B.R., Tillet, Y. & Jasmin, L. (2003) Dopaminergic input to GABAergic neurons in the rostral agranular insular cortex of the rat. *J. Neurocytol.*, 32, 131-141.
- Olds, J. & Milner, P. (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 47, 419-427.
- Olucha-Bordonau, F. E., Teruel, V., Barcia-Gonzalez, J., Ruiz-Torner, A., Valverde-Navarro, A.A. & Martinez-Soriano, F. (2003) Cytoarchitecture and efferent projections of the nucleus incertus of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 464, 62-97.
- Omelchenko, N. & Sesack, S.R. (2005) Laterodorsal tegmental projections to identified cell populations in the rat ventral tegmental area. *J. Comp. Neurol.*, 483, 217-235.

- Omelchenko, N. & Sesack, S.R. (2007) Glutamate synaptic inputs to ventral tegmental area neurons in the rat derive primarily from subcortical sources. *Neuroscience*, 146, 1259-1274.
- Paxinos, G. & Franklin, K. B. J. (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.
- Peck, J. W. & Novin, D. (1971) Evidence that osmoreceptors mediating drinking in rabbits are in the lateral preoptic area. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 74, 134-147.
- Phillipson, O. T. (1979) Afferent projections to the ventral tegmental area of tsai and interfascicular nucleus: A horseradish peroxidase study in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 187, 117-144.
- Phillipson, O. T. & Griffiths, A.C. (1985) The topographic order of inputs to nucleus accumbens in the rat. *Neuroscience*, 16, 275-296.
- Philpot, K. B., Dallvechia-Adams, S., Smith, Y. & Kuhar, M.J. (2005) A cocaine-and-amphetamine-regulated-transcript peptide projection from the lateral hypothalamus to the ventral tegmental area. *Neuroscience*, 135, 915-925.
- Pro-Sistiaga P, Mohedano-Moriano A, Ubeda-Bañon I, Del Mar Arroyo-Jimenez M, Marcos P, Artacho-Pérula E, Crespo C, Insausti R & Martinez-Marcos A. (2007) Convergence of olfactory and vomeronasal projections in the rat basal telencephalon. *J Comp Neurol*. 504, 346-362.
- Puelles, L. (2001) Brain segmentation and forebrain development in amniotes. *Brain Res. Bull.*, 6, 695-710.
- Ramon-Moliner, E. & Nauta, W.J. (1966) The isodendritic core of the brain stem. *J. Comp. Neurol.*, 126, 311-335.
- Ramsay, D. J., Rolls, B.J. & Wood, R.J. (1977) Body fluid changes which influence drinking in the water deprived rat. *J. Physiol.*, 266, 453-469.
- Rebec, G. V. (2006) Behavioral electrophysiology of psychostimulants. *Neuropsychopharmacology*, 31, 2341-2348.
- Rebec, G. V., Grabner, C.P., Johnson, M., Pierce, R.C. & Bardo, M.T. (1997) Transient increases in catecholaminergic activity in medial prefrontal cortex and nucleus accumbens shell during novelty. *Neuroscience*, 76, 707-714.
- Reiner A, Veenman CL, Medina L, Jiao Y, Del Mar N, Honig MG. (2000) Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *J Neurosci Methods*, 103, 23-37.
- Ricardo, J. A. (1981) Efferent connections of the subthalamic region in the rat. II. the zona incerta. *Brain Res.*, 214, 43-60.

- Risold, P. Y. & Swanson, L.W. (1997) Chemoarchitecture of the rat lateral septal nucleus. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 24, 91-113.
- Salamone, J. D., Arizzi, M.N., Sandoval, M.D., Cervone, K.M. & Aberman, J.E. (2002) Dopamine antagonists alter response allocation but do not suppress appetite for food in rats: Contrast between the effects of SKF 83566, raclopride, and fenfluramine on a concurrent choice task. *Psychopharmacology (Berl)*, 160, 371-380.
- Salamone, J. D. & Correa, M. (2002) Motivational views of reinforcement: Implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behav. Brain Res.*, 137, 3-25.
- Scalia, F. & Winans, S.S. (1975) The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J. Comp. Neurol.*, 161, 31-55.
- Schoenbaum, G. & Roesch, M. (2005) Orbitofrontal cortex, associative learning, and expectancies. *Neuron*, 47, 633-636.
- Schoenbaum, G., Setlow, B., Nugent, S.L., Saddoris, M.P. & Gallagher, M. (2003) Lesions of orbitofrontal cortex and basolateral amygdala complex disrupt acquisition of odor-guided discriminations and reversals. *Learn. Mem.*, 10, 129-140.
- Schultz, W. & Romo, R. (1987) Responses of nigrostriatal dopamine neurons to high-intensity somatosensory stimulation in the anesthetized monkey. *J. Neurophysiol.*, 57, 201-217.
- Schultz, W. (1997) Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 7, 191-197.
- Schultz, W. (1998) Predictive reward signal of dopamine neurons. *J. Neurophysiol.*, 80, 1-27.
- Schultz, W. & Dickinson, A. (2000) Neuronal coding of prediction errors. *Annu. Rev. Neurosci.*, 23, 473-500.
- Schultz, W. (2001) Reward signaling by dopamine neurons. *Neuroscientist*, 7, 293-302.
- Schultz, W. (2007) Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu. Rev. Neurosci.*, 30, 259-288.
- Schwartzbaum, J. S. & DiLorenzo, P.M. (1982) Gustatory functions of the nucleus tractus solitarius in the rabbit. *Brain Res. Bull.*, 8, 285-292.
- Sellings, L. H., McQuade, L.E. & Clarke, P.B. (2006) Characterization of dopamine-dependent rewarding and locomotor stimulant effects of intravenously-administered methylphenidate in rats. *Neuroscience*, 141, 1457-1468.

- Simon, H., Taghzouti, K. & Le Moal, M. (1986) Deficits in spatial-memory tasks following lesions of septal dopaminergic terminals in the rat. *Behav. Brain Res.*, 19, 7-16.
- Simpson, J. B., Epstein, A.N. & Camardo, J.S., Jr (1978) Localization of receptors for the dipsogenic action of angiotensin II in the subfornical organ of rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 92, 581-601.
- Sorensen, J. C., Slomianka, L., Christensen, J. & Zimmer, J. (1995) Zinc-containing telencephalic connections to the rat striatum: A combined fluoro-gold tracing and histochemical study. *Exp. Brain Res.*, 105, 370-382.
- Spruston, N., Jaffe, D.B. & Johnston, D. (1994) Dendritic attenuation of synaptic potentials and currents: The role of passive membrane properties. *Trends Neurosci.*, 17, 161-166.
- Starr, M. S. (1995) Glutamate/dopamine D1/D2 balance in the basal ganglia and its relevance to parkinson's disease. *Synapse*, 19, 264-293.
- Strecker, R. E. & Jacobs, B.L. (1985) Substantia nigra dopaminergic unit activity in behaving cats: Effect of arousal on spontaneous discharge and sensory evoked activity. *Brain Res.*, 361, 339-350.
- Sturm, W., de Simone, A., Krause, B.J., Specht, K., Hesselmann, V., Radermacher, I., Herzog, H., Tellmann, L., Muller-Gartner, H.W. & Willmes, K. (1999) Functional anatomy of intrinsic alertness: Evidence for a fronto-parietal-thalamic-brainstem network in the right hemisphere. *Neuropsychologia*, 37, 797-805.
- Swanson, L. W. (1982) The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: A combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res. Bull.*, 9, 321-353.
- Swanson, L. W. & Risold, P. Y. (1999) On the basic architecture of the septal region. In Numan, R. (ed), *The Behavioral Neuroscience of the Septal Region*. Springer, New York, pp. 1-14.
- Takada, M., Tokuno, H., Nambu, A. & Inase, M. (1998) Corticostriatal input zones from the supplementary motor area overlap those from the contra- rather than ipsilateral primary motor cortex. *Brain Res.*, 791, 335-340.
- Takikawa, Y., Kawagoe, R. & Hikosaka, O. (2004) A possible role of midbrain dopamine neurons in short- and long-term adaptation of saccades to position-reward mapping. *J. Neurophysiol.*, 92, 2520-2529.
- Teune, T. M., van der Burg, J., van der Moer, J., Voogd, J. & Ruigrok, T.J. (2000) Topography of cerebellar nuclear projections to the brain stem in the rat. *Prog. Brain Res.*, 124, 141-172.

- Teune, T. M., van der Burg, J., de Zeeuw, C.I., Voogd, J. & Ruigrok, T.J. (1998) Single purkinje cell can innervate multiple classes of projection neurons in the cerebellar nuclei of the rat: A light microscopic and ultrastructural triple-tracer study in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 392, 164-178.
- Thrasher, T. N., Nistal-Herrera, J.F., Keil, L.C. & Ramsay, D.J. (1981) Satiety and inhibition of vasopressin secretion after drinking in dehydrated dogs. *Am. J. Physiol.*, 240, E394-401.
- Torvik, A. (1956) Afferent connections to the sensory trigeminal nuclei, the nucleus of the solitary tract and adjacent structures; an experimental study in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 106, 51-141.
- Ubeda-Bañon I, Novejarque A, Mohedano-Moriano A, Pro-Sistiaga P, Insausti R, Martinez-Garcia F, Lanuza E, Martinez-Marcos A. (2008) Vomeronasal inputs to the rodent ventral striatum. *Brain Res Bull.* 75, 467-473.
- Uschakov, A., Gong, H., McGinty, D. & Szymusiak, R. (2007) Efferent projections from the median preoptic nucleus to sleep- and arousal-regulatory nuclei in the rat brain. *Neuroscience*, 150, 104-120.
- Vanderwolf, C. H. (1969) Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.*, 26, 407-418.
- von Campenhausen, H. & Mori, K. (1999) Convergence of segregated pheromonal pathways from the accessory olfactory bulb to the cortex in the mouse. *Eur J Neurosci.*, 12, 33-46.
- Wickens, J. R., Begg, A.J. & Arbuthnott, G.W. (1996) Dopamine reverses the depression of rat corticostriatal synapses which normally follows high-frequency stimulation of cortex in vitro. *Neuroscience*, 70, 1-5.
- Winter, C., Flash, S., Klavir, O., Klein, J., Sohr, R. & Joel, D. (2008) The role of the subthalamic nucleus in 'compulsive' behavior in rats. *Eur. J. Neurosci.*, 27, 1902-1911.
- Wise, R. A. (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nat. Rev. Neurosci.*, 5, 483-494.
- Young, A. M., Joseph, M.H. & Gray, J.A. (1992) Increased dopamine release in vivo in nucleus accumbens and caudate nucleus of the rat during drinking: A microdialysis study. *Neuroscience*, 48, 871-876.
- Zahm, D. S., Grosu, S., Williams, E.A., Qin, S. & Berod, A. (2001) Neurons of origin of the neurotensinergic plexus enmeshing the ventral tegmental area in rat: Retrograde labeling and in situ hybridization combined. *Neuroscience*, 104, 841-851.



Capitulo III:

La lesión selectiva de neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental en hembras de ratón reduce la preferencia por la sacarosa pero no por las feromonas sexuales de macho.



## **Introducción**

La vía dopaminérgica meso-córtico-límbica, que como hemos descrito en el capítulo II conecta el área ventral tegmental del mesencéfalo (*ventral tegmental area*, VTA) con el núcleo accumbens (Acb), la amígdala y la corteza prefrontal, parece estar implicada en la señalización de las propiedades reforzantes tanto de refuerzos naturales (Kelley & Berridge, 2002) como de drogas de abuso (Everitt & Robbins, 2005). Evidencias experimentales derivadas de estudios de auto-estimulación (Olds & Milner, 1954), de los efectos de agonistas y antagonistas de la dopamina (DA) sobre el refuerzo (Wise, 2004), así como de los análisis de liberación de DA en el Acb en respuesta a diferentes estímulos reforzantes, apoyan la teoría que dichas propiedades se deben a la capacidad de estos estímulos de provocar que las neuronas del VTA liberen DA en el Acb (Wise & Rompre, 1989). Esto ha sido comprobado con diferentes clases de estímulos reforzantes naturales, como por ejemplo la comida, el agua o el sexo (Westerink *et al.*, 1994; Becker *et al.*, 2001; Hajnal *et al.*, 2004).

En este contexto, nuestro laboratorio ha demostrado que las hembras de ratón muestran una atracción innata hacia las feromonas sexuales de macho. Esta atracción se puede observar de manera muy robusta en un test de preferencia entre dos estímulos (Moncho-Bogani *et al.*, 2002; 2005). Hay evidencias que indican que esta atracción no se debe a un efecto novedad (investigación de un estímulo novedoso) ya que no es mostrada ni por volátiles derivados de viruta ensuciada por ratones macho ni por olores sintéticos novedosos (citrálva, Martínez-Ricos *et al.*, 2007). Además, las señales químicas derivadas de macho pueden inducir una preferencia condicionada de lugar en hembras (Martínez-Ricos *et al.*, 2007), lo que indica que las feromonas constituyen un refuerzo natural. Esta idea es corroborada por el hecho que las feromonas sexuales activan la expresión de *c-fos* en algunos núcleos del sistema del refuerzo (como la amígdala basolateral y la zona periférica medial *-shell-* del Acb; Moncho-Bogani *et al.*, 2005).

Al contrario que otros refuerzos naturales que dependen del gusto y de los sistemas de percepción visceral y/o somato-sensorial, los estímulos feromonales se procesan principalmente por el sistema vomeronasal, que incluye partes del complejo amigdalino (Halpern & Martínez-Marcos, 2003). Los resultados expuestos en el Capítulo II confirman estudios anteriores de las aferencias al VTA en rata (Phillipson, 1979; Geisler & Zahm, 2005) que revelan una escasa inervación de origen vomeronasal

al VTA, originada en la amígdala medial y algunas subdivisiones del núcleo de la *stria terminalis*. En contraste con esta escasa inervación vomeronasal del VTA, partes del complejo amigdalino proyectan masivamente al Acb (Pitkanen, 2000; Novejarque, 2008), lo que sugiere que las propiedades reforzantes de las feromonas sexuales podrían deberse a las proyecciones desde la amígdala al Acb, tal como indica la expresión de c-fos (Moncho-Bogani *et al.*, 2005), en vez de a la vía dopaminérgica desde el VTA al Acb.

Para explorar esta posibilidad, analizamos los efectos de lesiones con 6-hidroxidopamina (6-OHDA) en neuronas dopaminérgicas del VTA sobre la atracción innata que las hembras adultas muestran por las feromonas sexuales de macho. Con el objetivo de comparar con otro estímulo reforzante natural, también comprobamos en estos mismos animales si la lesión afectaba al consumo de sacarosa (cuya dependencia de la integridad del VTA había sido previamente demostrada, Shimura *et al.*, 2002). Nuestros resultados indican que mientras las lesiones del VTA dan lugar a un descenso en el consumo de sacarosa en periodos largos, no tienen ningún efecto sobre la atracción de las hembras de ratón por feromonas sexuales. Los resultados se discuten a la luz de recientes investigaciones sobre las bases neurales del refuerzo que proponen funciones alternativas para la DA en procesos relacionados con el refuerzo, como por ejemplo, indicadora del valor incentivo que poseen los estímulos reforzantes o mediadora de la asociación entre el refuerzo y sus estímulos predictores (Berridge & Robinson, 1998; Spanagel & Weiss, 1999; Schultz, 2002; Wise, 2004).

## **Material y métodos**

### **Animales y diseño experimental**

Estos experimentos se realizaron utilizando hembras de ratón de la cepa CD-1 (Harlan, Barcelona, España), que fueron tratadas de acuerdo con las Directivas del Consejo de la Comunidad Europea del 24 de Noviembre de 1986 (86/609/EEC). Para asegurarnos que las hembras utilizadas en estos experimentos nunca habían estado expuestas a señales químicas de machos sexualmente adultos, pusimos las hembras preñadas en una habitación limpia sin machos. Diecinueve días después del nacimiento (aún lejos de su pubertad) se determinó el sexo de las crías y se retiraron los machos prejuveniles de la habitación. Las hembras se utilizaron en los experimentos a una edad de 9-12 semanas. Utilizar estas hembras “químicamente vírgenes” tiene la ventaja que su comportamiento químico-exploratorio por el sustrato utilizado por machos (ver más adelante) no se ha modificado por la experiencia previa y, por lo tanto, evidencia su atracción innata por las feromonas sexuales de macho (Moncho-Bogani *et al.*, 2002).

Veinticuatro hembras adultas “químicamente vírgenes” de ratón se asignaron al azar al grupo control (n=8, cirugía simulada) y el grupo con el VTA lesionada (n=16). Después de la cirugía y el periodo de recuperación, se testó la atracción de las hembras por los compuestos químicos contenidos en el sustrato utilizado por machos de ratón. A continuación, se realizó un control funcional del efecto de las lesiones dopaminérgicas en el VTA comprobando la preferencia por líquidos endulzados, comportamiento que depende de la integridad del VTA (Shimura *et al.*, 2002). Por último, los animales fueron perfundidos y sus cerebros se procesaron para la evaluación histológica de la lesión.

### **Cirugía y cuidados post-operatorios**

Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron en ratones anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg i.p.). Se inyectó intraperitonealmente sulfato de atropina (0.4 mg/kg) con tal de reducir la depresión cardio-respiratoria. Cada animal se situó en un marco esterotáxico y recibieron alternativamente inyecciones bilaterales de neurotoxina (grupo lesionado) ó de vehículo (grupo simulado) en el VTA. Las lesiones fueron realizadas inyectando 0.3 µl de una solución 10mM de 6-OHDA hidrobromido con 0.01% de ácido ascórbico (Sigma, Saint Louis, MO) en 0.9% solución salina, usando una jeringa Hamilton de 10 µl acoplada una micropipeta de vidrio (diámetro

interno, 10 $\mu$ m). Se realizaron inyecciones bilaterales en las siguientes coordenadas: -3.5 mm caudal desde bregma, 0.25 mm desde la línea media y 4.5 de profundidad desde la superficie cerebral (adaptado a la cepa CD-1 desde Paxinos & Franklin, 2001). La punta de la pipeta permaneció en el sitio por 10 minutos después del final de la inyección. Treinta minutos antes de la inyección de 6-OHDA o del vehículo, los animales recibieron una inyección de desipramina (Sigma, Saint Louis, MO; 25 mg/Kg) para restringir el efecto neurotóxico de la droga a las células dopaminérgicas.

Todos los ratones tuvieron un período de recuperación post-quirúrgico de al menos 12 días antes del comienzo de los tests comportamentales. Como las lesiones del VTA pueden provocar afagia o adipsia, se controló diariamente el peso de los animales después de la cirugía. Aquellos ratones que mostraron pérdida de peso fueron alimentados con comida humedecida hasta su recuperación. Todos los animales habían recuperado su peso prequirúrgico cuando empezaron los tests comportamentales.

#### **Tests de preferencia por las señales químicas derivadas de machos y comportamiento quimio-investigador**

Los tests de preferencia están basados en Mossman y Drickamer (1996). Se utilizaron cajas de plástico (25 x 50 x 30 cm) con sustrato limpio, divididas en dos cámaras iguales conectadas por una puerta. Los estímulos (sustrato limpio o utilizado por machos) se pusieron en dos recipientes de vidrio que medían 5 x 12 x 12 cm, localizados en esquinas opuestas de la caja. Cada recipiente contenía 10 g de sustrato limpio o utilizado por macho. En el test control de preferencia, se disponía sustrato limpio en ambos recipientes (*clean-clean preferente test, C/C*). En el test de preferencia de macho contra limpio (C/M) el recipiente de la derecha contenía sustrato utilizado por macho y el recipiente izquierdo contenía sustrato limpio (previamente se ha demostrado, en tests similares de preferencia, que el comportamiento de las hembras es independiente de en que lado de la caja se localice el sustrato utilizado por macho, ver Moncho-Bogani *et al.*, 2002; Martínez-Ricós *et al.*, 2007).

El sustrato utilizado por macho se recogió de diversas cajas que contenían machos adultos con experiencia sexual durante un período de 3-5 días. Para asegurarnos una composición homogénea a lo largo del experimento, el sustrato de las diversas cajas se mezcló y almacenó en un congelador hasta el día del experimento.

En el test de preferencia, el compartimiento de inicio de los animales fue decidido al azar y su comportamiento quimio-investigador se registró en vídeo durante 5

minutos. Una persona que desconocía las condiciones experimentales midió el tiempo que cada animal gastaba investigando cada uno de los recipientes. Se consideraba que un ratón está investigando un determinado recipiente cuando sitúa su hocico sobre el recipiente o muy cercano a menos de 1 cm de éste.

Antes de la cirugía, todas las hembras fueron habituadas a la manipulación y a la caja de de test (10 minutos al día durante dos días) y se les realizó un test C/C (prequirúrgico). Este test se utilizó posteriormente para comprobar si los animales de cada grupo mostraban preferencia por alguno de los recipientes de la caja experimental (ver Resultados). Después del test control prequirúrgico las hembras se asignaron al azar al grupo control o al experimental. Tras el tiempo de recuperación postoperatorio, todas las hembras (de los grupos SIMULADO y LESIONADO) pasaron de nuevo por dos días de habituación y se les realizó un test C/C. Como medida del comportamiento exploratorio global, medimos el tiempo invertido en la exploración de ambos recipientes en los tests pre y postoperatorios. Los animales que mostraron un descenso considerable en su comportamiento exploratorio después de la intervención fueron descartados, tomando como criterio de descarte que el tiempo de exploración total de ambos recipientes fuese menor que el 25% del tiempo de exploración total antes de la operación. Con este criterio resultó descartado un animal de cada grupo (SIMULADO y LESIONADO). Después del test C/C postoperatorio se realizó el test de preferencia por señales químicas derivadas de machos (C/M, sustrato limpio contra sustrato utilizado por macho).

### **Test de actividad locomotora**

Las lesiones de la vía tegmento-estriatal pueden afectar también a la actividad y movilidad de los animales (Koob *et al.*, 1981; Parkinson *et al.*, 2002), lo que podría hacer que las medidas del comportamiento investigador no fuesen fiables. Para analizar el efecto de estas lesiones en la movilidad de los animales, la actividad motora fue medida en las grabaciones post-quirúrgicas en el test control (C/C) dibujando tres líneas equidistantes en la pantalla, paralelas al eje menor de la caja, y midiendo el número de líneas cruzadas por cada animal.

### **Test de preferencia por el sabor dulce**

En el test de preferencia por el sabor dulce los ratones tuvieron acceso simultáneo a dos botellas, una que contenía agua y una segunda que contenía una solución 0.1 M de sacarosa. La localización (lado izquierdo o derecho) de las botellas que contenían cada líquido fue asignada al azar para cada animal. Medimos el consumo de agua y la solución de sacarosa en un período de 48 horas pesando ambas botellas antes y después del test.

### **Metodología histológica**

Al final de los experimentos, los ratones fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital sódico (0.14g/Kg) y perfundidos a través del corazón con tampón fosfato 0.9% NaCl (PBS) seguido de formaldehído 4% en tampón fosfato 0.1 M (pH 7.4). Se extrajeron los cerebros y se post-fijaron durante 4 h en el mismo fijador a 4 °C, y se crioprotegieron en sacarosa al 30% hasta que se hundieron. Usando un microtomo de congelación, obtuvimos secciones coronales de 40 µm de espesor en cinco series paralelas preparadas para el análisis histológico de la lesión.

La extensión de la lesión fue valorada mediante la estimación del número de células dopaminérgicas en el VTA de cada animal. Para marcar células dopaminérgicas específicamente, detectamos el transportador de la dopamina (DAT) usando protocolo inmunocitoquímico del complejo avidina-biotina-peroxidasa, tal como se ha descrito en el capítulo primero. Para evaluar la extensión de la lesión analizamos tres niveles del VTA, anterior (coordenada AP, -3.08 mm desde Bregma de acuerdo con Franklin & Paxinos, 2001), intermedia (coordenada AP, -3.28) y caudal (coordenada AP, -3.52 mm). Usando una cámara clara se dibujó cada sección y se contó el número perfiles de somas positivos para el DAT en ambos lados del VTA.

### **Tratamiento de los datos y análisis estadístico**

Los datos relativos a la extensión de la lesión del VTA, a la movilidad y al comportamiento exploratorio, al tiempo gastado investigando el sustrato limpio o utilizado por macho y al consumo de agua y sacarosa fueron analizados estadísticamente usando el paquete de software SPSS (versión 11.5). La normalidad de las variables fue evaluada mediante un test de normalidad Kolmogorov-Smirnov con la corrección de Lilliefors, aplicada separadamente a los datos de los animales de los grupos SIMULADO y LESIONADO (ver más adelante). Este test mostró que los datos

del número de células inmunopositivas en el VTA, movilidad y comportamiento exploratorio, así como los datos del tiempo invertido investigando el sustrato limpio o utilizado por macho, seguían una distribución normal ( $p$ -valores  $> 0.05$ ). Contrariamente, los datos del consumo de agua, de sacarosa y el consumo total (la suma de ambos consumos) seguían una distribución normal en el grupo SIMULADO ( $p > 0.05$ ) pero no en el grupo LESIONADO ( $p < 0.05$ ). La diferencia del consumo de las dos soluciones (sacarosa menos agua) seguía una distribución normal en el grupo SIMULADO ( $p > 0.05$ ) pero en el grupo LESIONADO el valor de  $p$  obtenido en el test de normalidad era marginalmente significativo ( $p = 0.058$ ). Por lo tanto utilizamos un test no paramétrico para analizar los resultados del test de preferencia por sacarosa (ver más adelante).

### **Control histológico de la lesión**

Aquellos animales del grupo LESIONADO que mostraron un elevado número de perfiles de células inmunoreactivas para el DAT (indicando una lesión relativamente pequeña) fueron descartados de los siguientes análisis estadísticos (excepto para el estudio de correlación, ver más adelante). Esto dio como resultado un tamaño de muestra de siete animales para cada grupo. Los datos del número de perfiles en los grupos SIMULADO y LESIONADO fueron analizados con una prueba ANOVA de una vía.

### **Comportamiento químio-investigador**

Un test t-Student para muestras emparejadas fue utilizado para comparar el tiempo de exploración de ambos recipientes en el test control pre-quirúrgico. Para evaluar posibles diferencias en el comportamiento químioinvestigador del sustrato limpio o utilizado por machos, el tiempo utilizado explorando cada recipiente fue analizado utilizando una prueba ANOVA de tres vías, con los tests (C/C, C/M) y la localización de los estímulos (izquierda o derecha) como variables intrasujetos y grupo (SIMULADO y LESIONADO) como variable intersujetos, seguido cuando era apropiado por una comparación de pares múltiple con la corrección de Bonferroni. El tiempo total utilizado investigando ambos recipientes también fue analizado usando una prueba ANOVA de una vía comparando los grupos SIMULADO y LESIONADO.

#### **Preferencia por sacarosa**

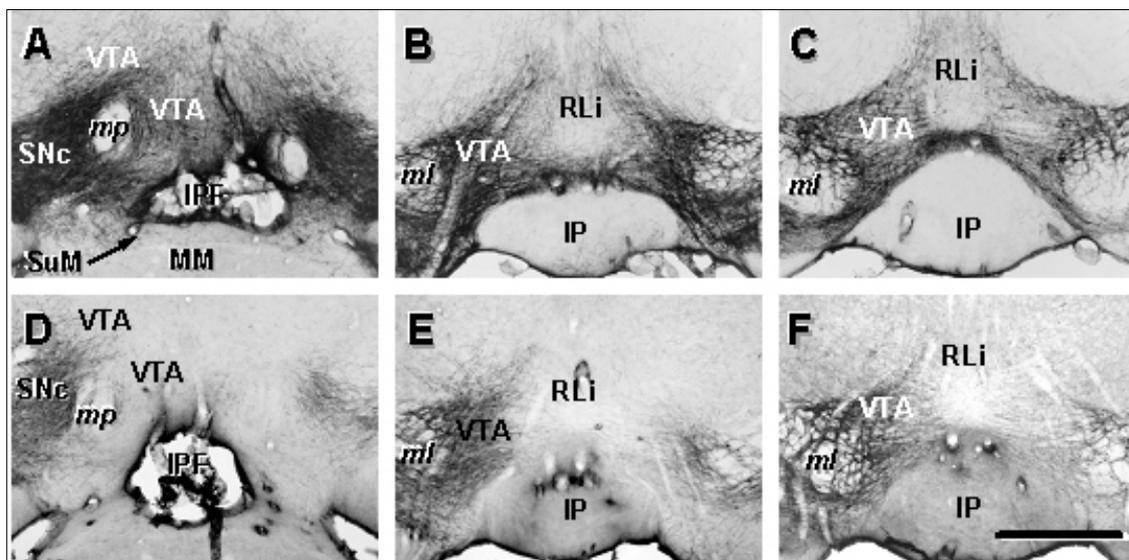
Como los datos del consumo de agua y sacarosa no siguen una distribución normal, utilizamos el test no paramétrico U de Mann-Whitney para analizar los efectos de la lesión en este test de preferencia. Se analizaron las siguientes variables: consumo de sacarosa, consumo de agua, diferencia entre el consumo de sacarosa y el de agua (una estimación de la “preferencia por sacarosa”) y el consumo total de líquido (sacarosa más agua).

#### **Correlación entre el tamaño de la lesión y la preferencia comportamental por las feromonas de macho y el sabor dulce**

Finalmente, analizamos si el tamaño de la lesión inducida por la 6-OHDA (estimada como el número de perfiles inmunoreactivos para el DAT en las tres secciones a lo largo de la VTA) mostraban una correlación estadística (usando el test de Pearson) con la preferencia comportamental por los estímulos reforzantes, las feromonas de macho y la solución de sacarosa. Para este análisis, es apropiado incluir los animales control y todos los lesionados (incluso aquellos con lesiones pequeñas). Como la correlación de Pearson solo puede aplicarse cuando las variables están distribuidas normalmente, primero comprobamos la normalidad (usando un test de normalidad Kolmogorov-Smirnov con la corrección de Lilliefors) de los diferentes parámetros relacionados con la exploración de las feromonas y por la preferencia por la sacarosa de todas, las 22 hembras. Este análisis muestra que la “preferencia por la sacarosa” (sacarosa menos agua) seguía una distribución normal ( $p > 0.05$ ) mientras que el consumo absoluto de la sacarosa no lo hacía ( $p < 0.05$ ). Las variables relacionadas con la quimioinvestigación de las feromonas y el número de perfiles DAT-positivos seguían una distribución normal ( $p > 0.05$ ). Por lo tanto, calculamos el coeficiente de correlación de Pearson del número de perfiles DAT-positivos en las secciones muestreadas del VTA de las 22 hembras de ratón con la “preferencia por sacarosa” (el consumo de sacarosa menos el de agua en el test de dos elecciones) y con el de “preferencia por feromona” (tiempo de exploración del sustrato utilizado por macho menos el tiempo de exploración del sustrato limpio en el test de dos elecciones).

## Resultados

### Evaluación histológica de las lesiones



**Figura 3.1.** Fotomicrografías digitales de secciones transversales del área ventral tegmental de un animal SIMULADO (A-C de rostral a caudal) y un animal experimental que recibió una inyección bilateral de 6-OHDA hidrobromido (D-F, de rostral a caudal). Las células y los terminales dopaminérgicos se han revelado con una detección inmunohistoquímica del transportador de la dopamina (DAT). Resaltar la considerable falta de estructuras inmunoreactivas para el DAT en el VTA y la sustancia nigra medial, sobretodo en el lado derecho. Barra de calibración en F: 500  $\mu$ m. Abreviaturas, ver la lista.

La inyección de 6-OHDA causó una reducción de células inmunoreactivas para el DAT en el VTA (Fig. 3.1) y, en algunos casos, en la parte medial de la sustancia nigra. El promedio de perfiles DAT-positivos en las tres secciones del VTA que fueron analizadas era  $1019 \pm 29$  (media  $\pm$  SEM) en el grupo SIMULADO y  $425 \pm 37$  en los siete animales con las mayores lesiones bilaterales. Esta diferencia entre ambos grupos es estadísticamente significativa (Fig. 3.2), como revela el análisis ANOVA ( $F_{1,12} = 154.6$ ;  $p < 0.001$ ). La lesión implica a todo el eje anteroposterior del VTA, ya que la diferencia en el número de perfiles DAT-positivos era significativo ( $p < 0.001$ ) en los tres niveles de muestreo.

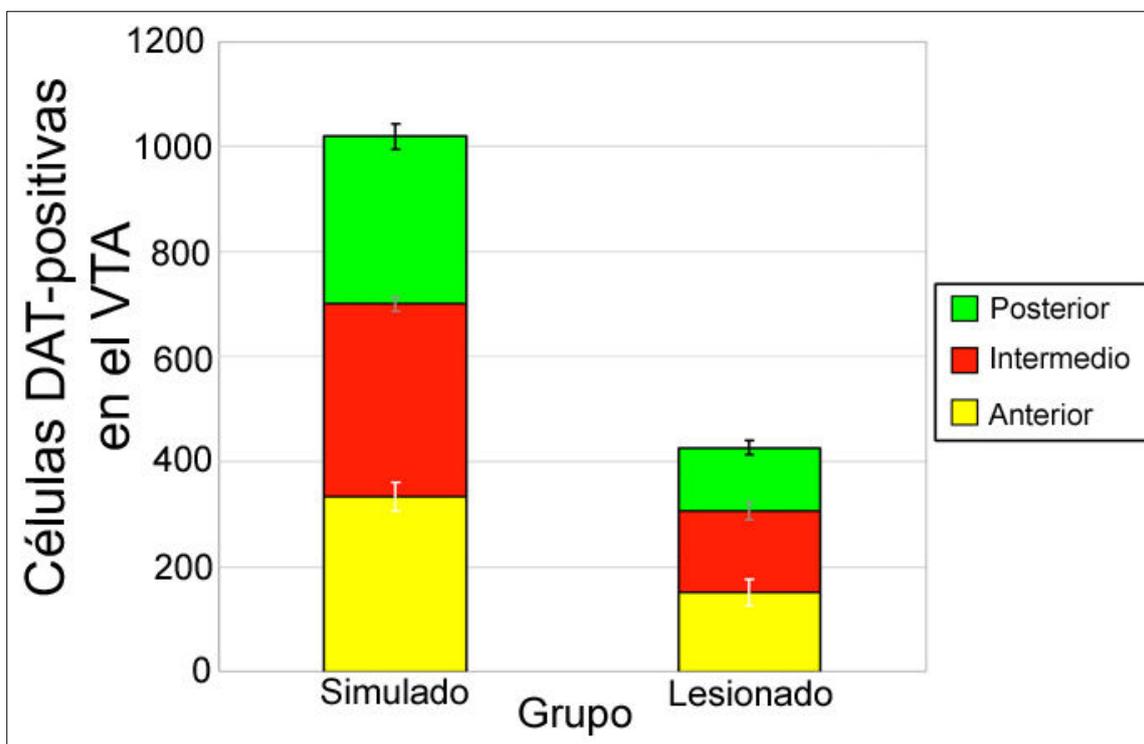
En concordancia con esta observación, cuando comparábamos con los animales SIMULADOS, los ratones con el VTA lesionada mostraban una falta parcial de la innervación inmunoreactiva para el DAT en el Acb (particularmente en la división medial del *Shell*) y en partes del caudatus-putamen (CPu) (Fig. 3.3). Otros campos de innervación positiva para el DAT en los hemisferios cerebrales (no se muestran), como la amígdala (cortical anterior y corteza de transición cortico-amigdaloides, núcleos central y basolateral, masas de células intercaladas) y la corteza prefrontal (área cingular

anterior), también mostraban una pérdida parcial de fibras inmunoreactivas para el DAT en los animales lesionados.

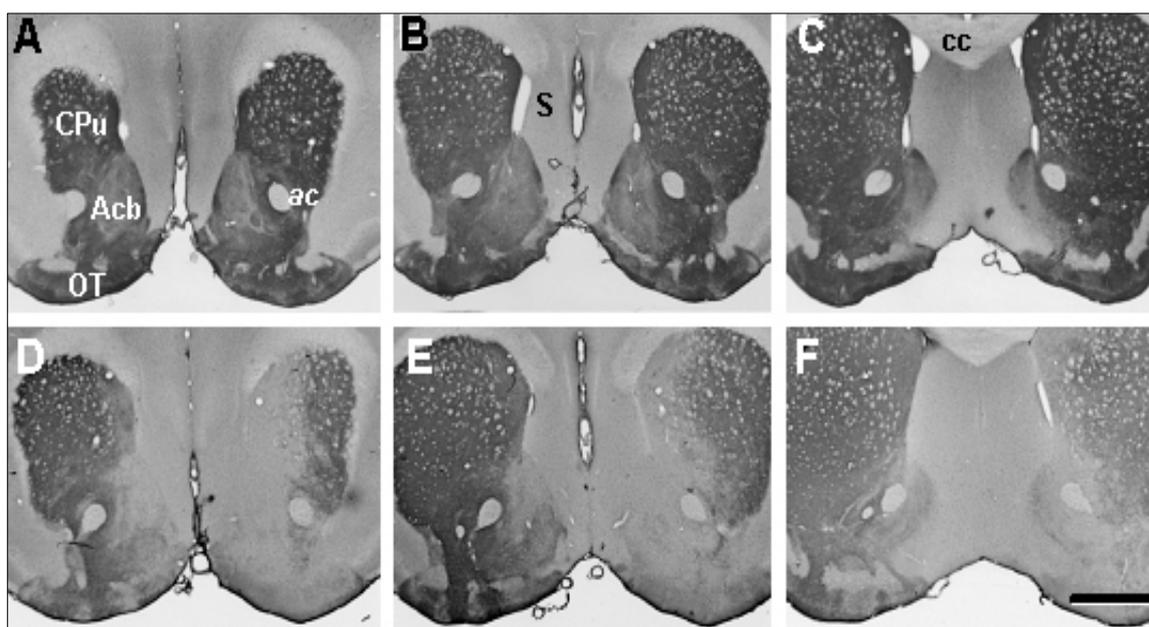
### Tests de preferencia por la feromona de macho

Para comprobar que los animales no tenían una preferencia previa por uno de los lados de la caja antes de la operación, comparamos el comportamiento exploratorio de ambos grupos en el test control (sustrato limpio en ambos recipientes) usando un test t-Student para muestras emparejadas. El análisis reveló que ambos grupos SIMULADO ( $t_{1,6} = -0.079$ ;  $p > 0.9$ ) y LESIONADO ( $t_{1,6} = -0.55$ ;  $p > 0.5$ ) mostraban una exploración equilibrada por ambos recipientes.

Las lesiones químicas del sistema dopaminérgico tegmento-estriatal pueden producir animales hiperactivos (Parkinson *et al.*, 2002) o hipoactivos (en el caso de lesiones grandes, ver Koob *et al.*, 1981). Como esto puede afectar al comportamiento exploratorio de nuestros animales en los tests de preferencia, analizamos si los animales de los grupos SIMULADO y LESIONADO diferían en su actividad locomotora en el



**Figura 3.2.** Las inyecciones de 6-OHDA en el VTA dieron como resultado una reducción significativa en el número de células inmunoreactivas para el DAT en el VTA. El gráfico enseña el promedio ( $\pm$  error estándar) de neuronas dopaminérgicas en el VTA en los grupos SIMULADO y LESIONADO. El número de células dopaminérgicas se estimó contando el número total de células marcadas para el DAT en tres secciones frontales a lo largo del VTA a tres niveles rostro-caudales (anterior, intermedio y posterior) equivalentes a los que se muestran en la figura 3.1.



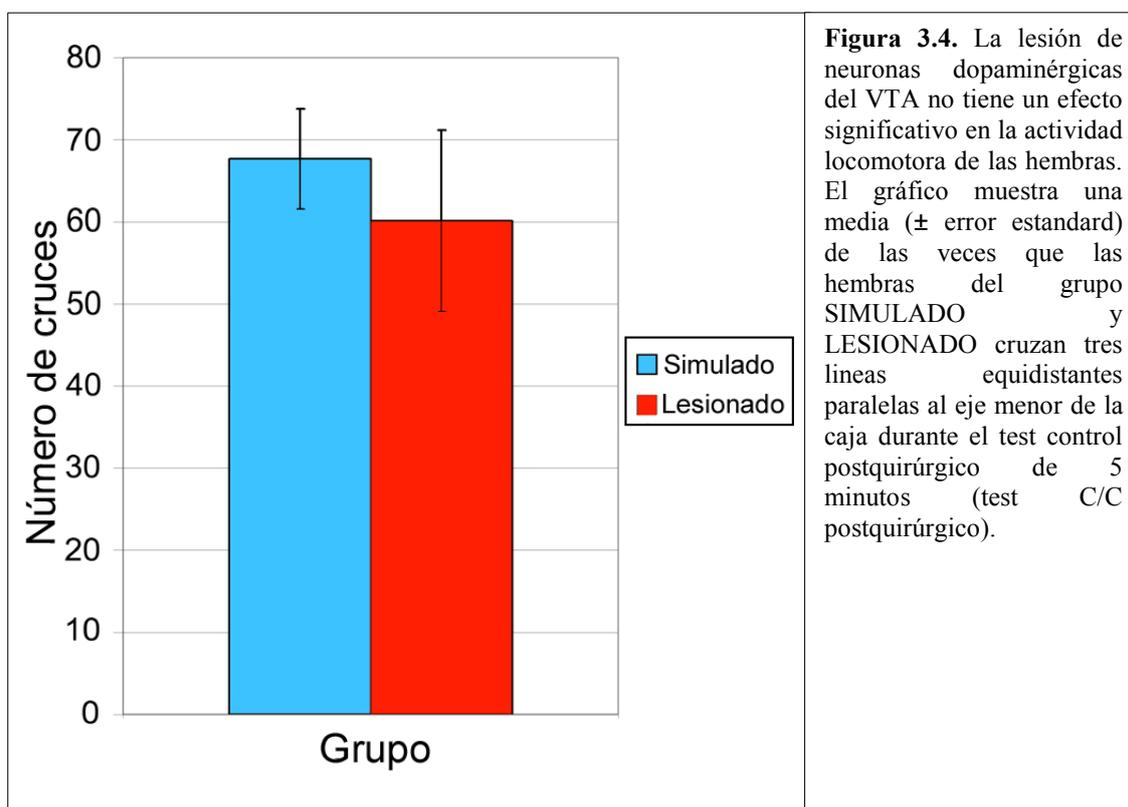
**Figura 3.3.** Fotomicrografías digitales mostrando una detección inmunohistoquímica para el DAT en secciones transversales del estriado ventral del mismo animal SIMULADO (A-C de rostral a caudal) y experimental (D-F, de rostral a caudal) mostrado en la figura 3.1. El núcleo accumbens y el tubérculo olfativo muestran una pérdida bilateral de innervación positiva para el DAT, más acusada en el hemisferio derecho en el que también se observa afectada la porción medial del caudatus-putamen. En el hemisferio izquierdo, la pérdida de fibras inmunoreactivas para el DAT está centrada en el área dorsomedial del shell y core del núcleo accumbens. Barra de calibración en F: 1 mm. Abreviaturas, ver la lista.

test C/C postquirúrgico. La prueba ANOVA comparando el número de cruces a lo largo de la caja (ver Métodos) de ambos grupos mostraba que no había diferencia estadística entre ellos ( $F_{1,12} = 0.36$ ;  $p > 0.5$ ; Fig. 3.4). Además, el tiempo total invertido investigando los recipientes no se vio afectado por la lesión, como revela la ANOVA comparando este parámetro en los grupos SIMULADO y LESIONADO en el test C/C postquirúrgico ( $F_{1,12} = 0.73$ ;  $p > 0.4$ ) y en el test de preferencia C/M ( $F_{1,12} = 0.68$ ;  $p > 0.4$ ).

El comportamiento quimioinvestigador de las hembras fue analizado utilizando una prueba ANOVA de tres vías, con el test (test control o de preferencia por macho) y la localización del estímulo (izquierda y derecha) como variables intrasujetos, y el grupo (SIMULADO, LESIONADO) como variable intersujetos. La prueba ANOVA reveló un efecto significativo del test ( $F_{1,12} = 14.2$ ;  $p < 0.01$ ) y de la localización del estímulo ( $F_{1,12} = 12.6$ ;  $p < 0.01$ ), pero ningún efecto del grupo  $F_{1,12} = 0.93$ ;  $p > 0.3$ ). Por tanto, la localización de las feromonas en el recipiente de la derecha en el test C/M, tiene un efecto significativo en la exploración que fue similar en los grupos SIMULADO y LESIONADO (Fig. 3.5). La interacción de segundo orden “localización x test” era significativa ( $F_{1,12} = 5.8$ ;  $p < 0.05$ ), como lo era la interacción entre la

localización y el grupo ( $F_{1,12} = 5.04$ ;  $p < 0.05$ ), mientras que la interacción "grupo x test" ( $F_{1,12} = 0.22$ ;  $p > 0.6$ ) y la interacción de tercer orden (test x localización x grupo,  $F_{1,12} = 0.08$ ;  $p > 0.7$ ) no era significativa. La presencia de una interacción significativa "localización x test" es indicativa de de una preferencia de todos los animales por las feromonas derivadas de macho. De hecho, un análisis *post-hoc* de la interacción "localización x test" usando la comparación por pares (con la corrección de Bonferroni) mostró que los recipientes izquierdo y derecho eran investigados por igual en el test control ( $p > 0.8$ ), pero no en el test de preferencia por macho, en el que el recipiente que contenía el sustrato utilizado por macho era investigado significativamente más tiempo ( $p < 0.01$ ) (ver Fig. 3.5).

La interacción significativa "localización x grupo" indica que, cuando los valores de test control y el test de preferencia por macho están promediados, los grupos SIMULADO y LESIONADO difieren en la exploración del recipiente de la izquierda comparado con el de la derecha. Las comparaciones *post-hoc* muestran que esta diferencia entre grupos es marginalmente significativa ( $p < 0.07$ ) en la exploración del recipiente izquierdo (donde siempre hay sustrato limpio) pero es claramente no significativo en la exploración del recipiente derecho ( $p > 0.5$ ). Por tanto, ésta es una diferencia intrínseca entre grupos que no dice nada sobre su preferencia por la



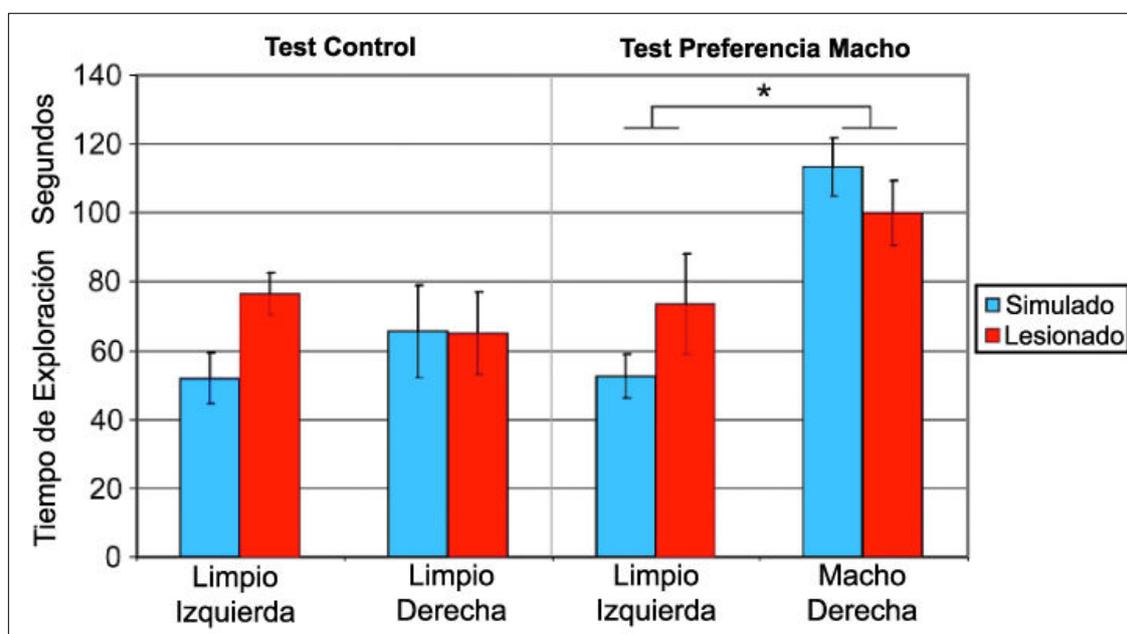
**Figura 3.4.** La lesión de neuronas dopaminérgicas del VTA no tiene un efecto significativo en la actividad locomotora de las hembras. El gráfico muestra una media ( $\pm$  error estándar) de las veces que las hembras del grupo SIMULADO y LESIONADO cruzan tres líneas equidistantes paralelas al eje menor de la caja durante el test control postquirúrgico de 5 minutos (test C/C postquirúrgico).

feromonas de macho.

Por otro lado, la falta de significación de la interacción “grupo x test” (y también de la interacción de tercer orden) indica que la presencia de feromonas en el test de preferencia de macho tiene el mismo efecto en el comportamiento de los animales de los grupos SIMULADO y LESIONADO. En otras palabras, no hay diferencia en la preferencia por el sustrato utilizado por macho entre los grupos SIMULADO y LESIONADO.

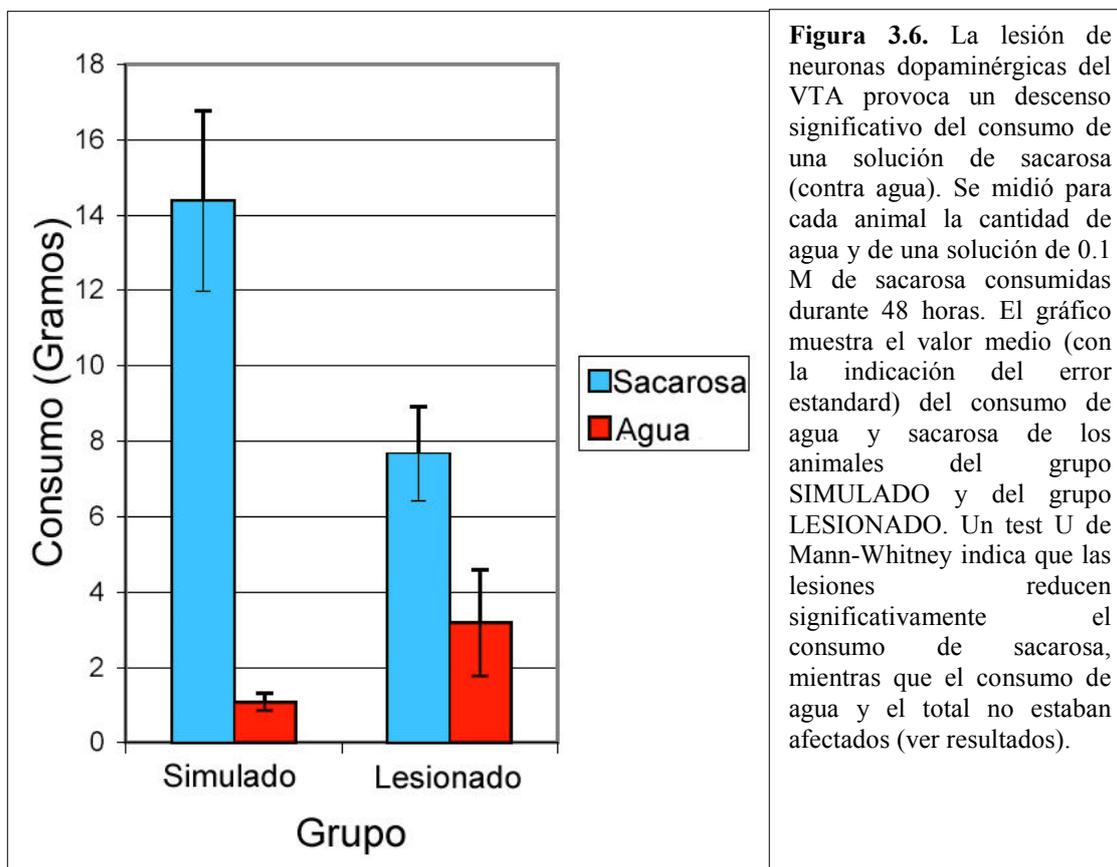
### Test de preferencia por sacarosa

A continuación las mismas hembras fueron testadas por la preferencia de la sacarosa frente el agua, en el que se ha descrito un papel clave de la integridad del VTA (Shimura et al., 2002). Como los valores de consumo de agua y de sacarosa no siguen una distribución normal (ver Métodos), usamos un test no paramétrico (test U de Mann-Whitney) para analizar las posibles diferencias entre los animales SIMULADO y LESIONADO en la preferencia por el sabor dulce. Este test se aplicó al consumo total de líquido (agua más sacarosa), al consumo de sacarosa y de agua, y a la preferencia por la sacarosa (sacarosa menos agua). Los resultados de estos análisis revelaron una diferencia significativa en el consumo de sacarosa ( $U = 9$ ,  $Z = -1.981$ ,  $p = 0.048$ ) y en la



**Figura 3.5.** La lesión de neuronas dopaminérgicas del VTA no tiene un efecto significativo en la preferencia de las hembras por el sustrato utilizado por macho. El gráfico muestra el tiempo medio ( $\pm$  error estándar) que las hembras gastan investigando ambos recipientes en el test control, cuando había sustrato limpio en ambos recipientes, y en el test de preferencia, cuando había sustrato utilizado por macho en el recipiente derecho. No había diferencia entre ambos grupos (SIMULADO y LESIONADO) en la investigación preferente de las señales químicas derivadas de macho. Ambos recipientes fueron investigados por igual en el test control, mientras que en el test de preferencia, el sustrato utilizado por macho era preferido significativamente (asterisco) (ver texto para más detalles).

preferencia por sacarosa ( $U = 8$ ,  $Z = -2.113$ ,  $p = 0.035$ ; Fig. 3.6). La diferencia entre los grupos SIMULADO y LESIONADO en el consumo total se aproximaba pero no llegó a ser significativa ( $U = 10$ ,  $Z = -1.854$ ,  $p = 0.064$ ). Por último, el U-test de Mann-Whitney no mostró ningún efecto de las lesiones del VTA en el consumo de agua ( $U = 13.5$ ,  $Z = -1.409$ ,  $p = 0.159$ ).



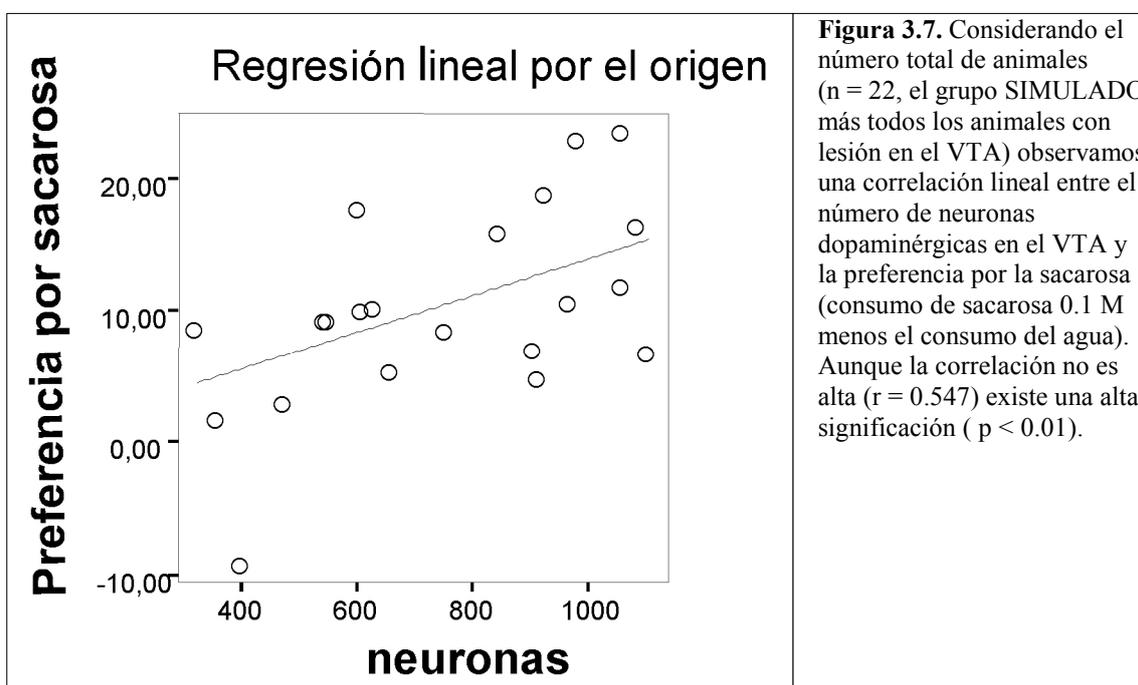
**Figura 3.6.** La lesión de neuronas dopaminérgicas del VTA provoca un descenso significativo del consumo de una solución de sacarosa (contra agua). Se midió para cada animal la cantidad de agua y de una solución de 0.1 M de sacarosa consumidas durante 48 horas. El gráfico muestra el valor medio (con la indicación del error estándar) del consumo de agua y sacarosa de los animales del grupo SIMULADO y del grupo LESIONADO. Un test U de Mann-Whitney indica que las lesiones reducen significativamente el consumo de sacarosa, mientras que el consumo de agua y el total no estaban afectados (ver resultados).

Esto indica que las lesiones de VTA eran suficientemente grandes para tener un efecto significativo en un comportamiento apetitivo, en este caso la preferencia por la sacarosa. Al usar un test de larga duración (48 horas) las lesiones de VTA podrían haber afectado tanto a las propiedades orosensoriales (p.e. el sabor dulce) como a los efectos postingestivos de la sacarosa (Smith, 2004).

### Correlación estadística entre el “tamaño de la lesión” y el comportamiento

Los tests anteriores indican que la preferencia por las sustancias químicas derivadas de macho es independiente de la proyección dopaminérgica desde el VTA al estriado ventral, mientras que la preferencia por sacarosa depende, al menos parcialmente, de la integridad de esta conexión. Otra manera de comprobar esta hipótesis es examinar si el tamaño de la lesión (cuantificado como el número de

neuronas inmunoreactivas para el DAT presentes en el VTA) está estadísticamente correlacionado con la preferencia comportamental por sacarosa o con la preferencia comportamental por las feromonas derivadas de macho. Este test estadístico puede incluir los animales lesionados que fueron descartados porque el tamaño de la lesión era pequeño, y por lo tanto incluye a los siete SIMULADOS y a los quince animales LESIONADOS. Los resultados del análisis del coeficiente de correlación de Pearson revelaron que el número de células inmunoreactivas para el DAT en el VTA y la “preferencia por sacarosa” (sacarosa menos agua) están significativamente correlacionados ( $r = 0.547$ ;  $p < 0.01$ ) (Fig. 3.7), aunque el coeficiente de correlación no es muy alto. Por el contrario, el número de perfiles inmunoreactivos para el DAT en el VTA no mostró correlación con la “preferencia por macho” (tiempo de exploración del sustrato utilizado por macho menos el del sustrato limpio;  $r = 0.308$ ;  $p > 0.16$ ). Por lo tanto, a mayor número de células dopaminérgicas en el VTA, mayor preferencia por la sacarosa. En contraste, el número de células inmunoreactivas para el DAT no se correlaciona con la preferencia comportamental por las señales químicas derivadas de macho.



## **Discusión**

La proyección dopaminérgica tegmento-estriatal parece ser parte de un sistema implicado en la expresión de comportamientos apetitivos (búsqueda de recompensa) como el consumo de comida, el consumo de agua o el sexo (ver Wise & Rompre, 1989). El descubrimiento de que algunos de los animales en el grupo de los lesionados padecían hipofagia e hipodipsia inmediatamente después de la inyección del agente neurotóxico (6-OHDA) apoya esta hipótesis. En contraste, estudios previos indican que proyecciones no dopaminérgicas de origen pontino que cruzan el VTA contribuyen a la hipofagia causada por lesiones de esta estructura (y/o la sustancia nigra) generadas mediante radiofrecuencia (Nadaud *et al.*, 1984). Nuestros resultados, obtenidos mediante una lesión excitotóxica específica de las células dopaminérgicas (6-OHDA) que no daña las fibras de paso, demuestran que en ratones las proyecciones dopaminérgicas del VTA al núcleo accumbens contribuyen sustancialmente al mantenimiento de una conducta normal de alimentación e ingesta de líquidos.

### **Las células dopaminérgicas del VTA no están implicadas de la misma manera en la expresión de todos los comportamientos dirigidos a una meta**

Nuestros resultados indican que lesiones de 6-OHDA del VTA dan como resultado una reducción parcial en la preferencia por fluidos de sabor dulce, como también se ha probado en rata (Shimura *et al.*, 2002; Shibata *et al.*, 2009). De hecho, hay una diferencia significativa tanto en los valores del consumo de sacarosa como en la “preferencia por sacarosa” entre los grupos LESIONADO y SIMULADO (Fig. 3.6). Esta conclusión es además reforzada por la presencia de una correlación baja, pero significativa, entre el número de perfiles de células positivas para el DAT en el VTA y la preferencia por sacarosa en todos nuestros animales (incluyendo aquellos que mostraban lesiones pequeñas, ver Resultados). El consumo de agua no está afectado, indicando que los animales lesionados no tienen dificultades para acceder a los bebederos y, lo que es más importante, que la lesión no tiene un efecto no específico en el consumo de líquido. De hecho, las diferencias entre el consumo total de líquido entre los grupos SIMULADO y LESIONADO no llegan a ser significativas y además estas diferencias en el consumo total se deben al descenso del consumo de sacarosa. Este efecto no puede ser atribuido a una deficiencia motora y/o exploratoria, porque los comportamientos exploratorio y locomotor son normales en animales con el VTA

lesionado, como lo indica la falta de efecto de la lesión en el número de cruzamientos en el test C/C postquirúrgico (Fig. 3.4) y en el tiempo total de exploración de ambos recipientes (ver RESULTADOS). Además, se ha demostrado que lesiones con 6-OHDA en el VTA en ratas no causan un descenso en la capacidad del animal para discriminar la sacarosa (Berridge *et al.*, 1989), así que una deficiencia sensorial causada por nuestras lesiones del VTA también es muy improbable.

Para concluir, nuestras lesiones parciales son suficientemente grandes para interferir en la preferencia por la sacarosa, un comportamiento que depende de la integridad del VTA (Shimura *et al.*, 2002). Este efecto probablemente se debe a cambios en la motivación por el consumo de soluciones de sabor dulce. Al contrario, el comportamiento de búsqueda de feromonas es indistinguible en los grupos LESIONADO y SIMULADO, como lo indica la prueba ANOVA de la comparación del tiempo utilizado investigando el sustrato limpio y el sustrato ensuciado por machos en el test control y en el test C/M (Fig. 3.5). La falta de correlación estadística entre el tamaño de las lesiones del VTA y la investigación preferencial del sustrato utilizado por macho también indica que la integridad del VTA no es crítica para la expresión de la preferencia de las hembras de ratón por las feromonas derivadas de macho.

### **¿Las feromonas tienen un sistema neuronal específico para señalar el refuerzo?**

Durante la última década diversos estudios han cambiado nuestro punto de vista sobre la función de la DA en el refuerzo (Berridge & Robinson, 1998; Salamone & Correa, 2002; Wise, 2004; véase también la Introducción General). Así, mientras que la visión clásica plantea que la liberación de DA en el accumbens es la causa de los efectos hedónicos (placenteros) del estímulo reforzante (si un determinado estímulo es “gustado”, ver Wise, 1982), las células del VTA son también activadas por estímulos desagradables que no eran esperados (ver Schultz, 1997). Además, durante comportamientos apetitivos (dirigidos a una meta), la DA es liberada antes de la fase de consumación, en vez de después (Richardson & Gratton, 1996). Estos datos han llevado a plantear nuevas hipótesis que expliquen el papel de la DA en comportamientos relacionados con el refuerzo (Berridge & Robinson, 1998; Wise, 2004). Los efectos de lesiones dopaminérgicas (Berridge *et al.*, 1989) y el comportamiento de ratones mutantes *knockdown* para el DAT (Peciña *et al.*, 2003) sugieren que la DA podría señalar la relevancia del estímulo como incentivo (Wyvell & Berridge, 2000) más que el valor hedónico del mismo. En otras palabras, la DA podría señalar si el estímulo

reforzante es “deseado” y los animales están motivados por conseguirlo (incluso con algo de esfuerzo) más que si les resulta placentero. En nuestros tests, las feromonas y la sacarosa se obtienen después de una cantidad de esfuerzo similar, que implica sólo la exploración de la caja y el hecho de beber desde el bebedero de la botella con sacarosa o oler (quizás con el bombeo vomeronasal) el sustrato utilizado por machos. Por eso, los efectos diferenciales de las lesiones del VTA en la preferencia por la sacarosa o por las feromonas sugieren que ambos comportamientos apetitivos están mediados por diferentes mecanismos neurales.

Una interpretación sencilla de estos resultados podría ser que las feromonas sexuales estimulan el sistema cerebral del refuerzo sin activar la vía tegmento-estriatal, por tanto evitando el VTA, mientras que el refuerzo inducido por sacarosa requeriría la activación de las células dopaminérgicas del VTA de proyección al accumbens, amígdala, septum o corteza prefrontal. De hecho, como hemos descrito en el Capítulo II el VTA recibe importantes aferencias gustativas (p.e.: el núcleo parabraquial e hipotálamo lateral, Phillipson, 1979; Geisler & Zahm, 2005). No obstante, proyecciones al accumbens desde estructuras corticales gustativas (p.e.: la corteza insular) podrían también estar relacionadas en la expresión de la preferencia por sacarosa (ver más abajo).

Respecto a esto, las feromonas constituyen un estímulo reforzante peculiar en comparación con otros reforzantes naturales. De hecho, son estímulos detectados por el órgano vomeronasal (o quizás por el epitelio olfativo), desde donde la información “feromonal” es transmitida a través de los bulbos olfativos accesorios a la amígdala medial (y cortical posteromedial) y al núcleo de la *stria terminalis* (Halpern & Martinez-Marcos, 2003). Mientras que las proyecciones desde la amígdala vomeronasal al VTA son escasas (Phillipson, 1979; Geisler & Zahm, 2005; véase el capítulo II), conexiones intramigdalinas (Pitkanen, 2000) permiten una entrada de información feromonal polisináptica al Acb a través de la división basolateral de la amígdala (Wright *et al.*, 1996; Novejarque, 2008). Esta podría ser la vía para la señalización del refuerzo derivado de las feromonas sexuales. Esta hipótesis es consistente con el patrón de expresión de *Fos* en hembras de ratón expuestas a sustrato utilizado por macho (Moncho-Bogani *et al.*, 2005), de acuerdo con el cual las feromonas no activan el VTA pero inducen la expresión de *Fos* en el sistema vomeronasal (incluyendo la amígdala), en la amígdala basolateral y en el *shell* medial del Acb.

Por lo tanto, una posible explicación de los efectos diferenciales de la lesión de las células dopaminérgicas del VTA en la preferencia por sacarosa y feromonas podría ser que ambos tipos de refuerzo usaran diferentes mecanismos neurales y circuitos sinápticos. La preferencia por sacarosa podría depender de estímulos gustativos y/o de la estimulación viscerosceptiva post-ingestión pasando por el VTA, mientras las vías vomeronasales al accumbens, evitando el VTA, podrían mediar la preferencia por feromonas.

### **Los efectos de la lesión en la preferencia por sacarosa**

Aunque nuestros ratones no tenían experiencia previa ni con sacarosa ni con sustancias químicas derivadas de macho antes de los tests de preferencia, ambos tests se diferencian en su duración, sólo 5 min en el caso del test de preferencia por feromonas y 48 h en el caso del test de preferencia por sacarosa. Esto sugiere la posibilidad que los efectos diferenciales de las lesiones dopaminérgicas en ambos tests puedan deberse, en parte, a diferencias en el diseño, debido a que el aprendizaje durante la duración del experimento no tiene la misma importancia en ambos tipos de test. En el caso del test de preferencia por feromonas, es muy improbable que tenga lugar un aprendizaje significativo durante los 5 min duración del mismo, y de hecho este test mide la respuesta primaria a los estímulos reforzantes (feromonas no volátiles) durante el comportamiento exploratorio que se expresa de manera innata cuando los animales visitan un nuevo ambiente.

Al contrario, durante el test de 48 h de preferencia por sacarosa, el aprendizaje permite a los animales asociar al refuerzo (sabor dulce o efectos post-ingestivos de la sacarosa) con los estímulos que predicen el refuerzo. Estos estímulos sirven como pistas, de manera que podrían motivar un comportamiento apetitivo dirigido hacia el objetivo reforzante (la solución de sacarosa). Esta clase de aprendizaje, denominado “*incentive salience attribution*” (atribución de relevancia como incentivo) por Berridge & Robinson (1998), permite a los animales buscar activamente la botella que contiene la solución de sacarosa antes de que el test termine. Si la DA estuviese envuelta en esta clase de asociación, los ratones con falta de DA podrían mostrar reducida la atribución de relevancia como incentivo, provocando un descenso del consumo de sacarosa a largo (pero no a corto) plazo. Esta hipótesis es consistente con los resultados de Shimura *et al.* (2002), quienes vieron que lesiones de radiofrecuencia del VTA tenían un efecto significativo en el consumo de soluciones de sacarosa durante un período de 24 h (en un

test de preferencia similar al nuestro), mientras que lesiones de 6-OHDA no tenían ningún efecto en el consumo de sacarosa durante un periodo de test de 2 h. Esta interpretación también es consistente con evidencias que muestran que la innervación dopaminérgica del accumbens en ratas está relacionada con la adquisición de un aprendizaje asociativo Pavloviano entre pistas visuales y la sacarosa (Parkinson *et al.*, 2002), así como con el desarrollo de respuestas instrumentales dirigidas a un objetivo en respuesta a pista relacionadas (predictoras) con el refuerzo (Nicola *et al.*, 2005).

La DA no se necesita para todas las clases de aprendizaje relacionado con el refuerzo. Robinson *et al.* (2005) mostraron que ratones genéticamente modificados que no expresan la hidroxilasa de la tirosina y, por lo tanto, no sintetizan DA, aprendieron la localización de una recompensa (comida) en uno de los dos brazos de un laberinto en forma de T, de manera equivalente a los ratones control (cepa salvaje). En contraste, los ratones deficientes en DA mostraban un déficit en la motivación de búsqueda de recompensas, como lo revela un mayor tiempo de latencia (comparado con los controles) en consumirla. En otro experimento, Peciña *et al.* (2003) entrenaron ratones control e hiperdopaminérgicos (DAT *knock-down*) a conseguir una recompensa (cereales dulces) al final de un pasadizo. Ambas clases de animales consiguieron realizarlo al final del entrenamiento (descenso de la latencia para conseguir la recompensa) pero los ratones hiperdopaminérgicos aprendieron más deprisa, mostrando más carreras directas hacia la recompensa, con menos retrocesos, que los controles. En conjunto, estos datos sugieren una función específica para la DA en la atribución (después del proceso de aprendizaje) de motivación a las pistas predictoras de la recompensa.

En conclusión, el descenso de la preferencia por la sacarosa mostrada por nuestros ratones lesionados podría estar indicando una baja capacidad (en comparación con los controles) de desarrollar comportamientos motivados hacia la sacarosa en respuesta a las pistas que la predicen.

#### **El substrato neural de la preferencia innata por los refuerzos naturales**

Independientemente de las probables diferencias en los circuitos neurales subyacentes a la motivación por obtener sacarosa y a la motivación por obtener las feromonas sexuales, es posible que la preferencia innata (no-aprendida) por reforzantes naturales sea independiente de DA. Esto incluye la preferencia por las feromonas sexuales (nuestros resultados) y por los sabores dulces. Dos tipos de evidencias apoyan

esta teoría. Primero, Cannon y Palmiter (2003) demostraron que los ratones *knockout* deficientes en DA, aunque presentan una disminución en la ingesta de fluidos, demuestran una preferencia innata (no-aprendida) por la sacarosa (en detrimento del agua). Los ratones carentes de DA se acercaron a las botellas que contenían el agua o sacarosa con una frecuencia similar, baja, pero la preferencia por el sabor dulce provocó que lamieran el líquido edulcorado durante más tiempo, y consecuentemente consumieron sacarosa de manera preferente. Por tanto, los ratones *knock-out* deficientes en DA se comportan como si no pudieran asociar las señales de la sacarosa al refuerzo del sabor dulce. En ausencia de tales señales incentivadoras, el que un animal se acerque a cualquiera de las dos botellas es una cuestión probabilística. Cuando, por casualidad, los ratones entran en el contacto con la solución de sacarosa alargan el tiempo que pasan bebiendo, mostrando así un comportamiento primario, no aprendido, de predilección por la sacarosa, que no es dependiente de DA. Esto es coherente con los resultados de Peciña *et al.* (2003), que demostraron que la latencia en consumir un reforzante dulce con anterioridad a la asociación de la recompensa con sus señales, era igual en el tipo salvaje que en los ratones hiperdopaminérgicos (apareciendo las diferencias únicamente durante el aprendizaje). Por tanto, parece que la respuesta primaria a las feromonas (nuestros resultados) y a otros reforzantes naturales (tales como alimentos o líquidos azucarados) es independiente de DA.

Esto plantea la cuestión de cuáles son los circuitos y mecanismos neurales responsables de la aproximación innata hacia (el valor motivacional de) los reforzantes naturales. En relación con esta cuestión, Peciña y Berridge (2000) mostraron que microinyecciones de agonistas de opiáceos en el Acb aumentan el valor hedónico de la sacarosa (según las expresiones orofaciales típicas de la especie en respuesta a soluciones de sacarosa administradas a través de una cánula oral). Estos resultados son consistentes con los datos previos que indican que el bloqueo de los receptores de opiáceos reduce el consumo de soluciones de sacarosa incluso a dosis bajas que no afectaban a la preferencia de lugar condicionada inducida por la sacarosa (Agmo *et al.*, 1995). Al contrario, los antagonistas dopaminérgicos no afectaban al consumo de la solución de sacarosa a la dosis que inhibía la inducción de la preferencia de lugar condicionada (Agmo *et al.*, 1995). Por lo tanto parece que el refuerzo primario de la sacarosa no está mediado por *inputs* dopaminérgicos sino por la activación de receptores endorfinérgicos en el *shell* del Acb.

Respecto a esto, las principales aferencias no dopaminérgicas del núcleo accumbens provienen desde regiones corticales como la corteza prefrontal, insular o perirhinal, el hipocampo y la amígdala basolateral. Estas aferencias son excitatorias y principalmente hacen sinapsis en espinas de neuronas de proyección (ver Meredith, 1999). Es tentador sugerir que la actividad de *inputs* córtico-amigdalinos al accumbens (ya sea directamente o por medio de la activación de sinápsis endorfinérgicas) podría constituir el substrato último del refuerzo primario. Esto podría ser válido para el refuerzo inducido por feromonas y para las propiedades reforzantes primarias del sabor dulce de la sacarosa (como sugieren Hajnal y Norgren, 2005). Esto es consistente con el hecho que la autoestimulación cerebral se consigue con electrodos implantados en todas las aferencias córtico-amigdalinas al Acb (Kane *et al.*, 1991; Wise, 1996). En relación con esta hipótesis, se ha descrito que el glutamato en el núcleo accumbens puede inducir la liberación de DA de los terminales dopaminérgicos independientemente de sus células de origen del VTA (Floresco *et al.*, 1998), y ello podría explicar porqué los refuerzos primarios provocan la liberación de DA en el accumbens (Hajnal *et al.*, 2004) incluso si esta liberación de DA no es la causa del refuerzo.

Para testar esta hipótesis es necesario analizar las respuestas apetitivas primarias a diversos reforzantes naturales, utilizando paradigmas comportamentales en los que los animales puedan responder sin experiencia previa con esos reforzantes, de manera que el aprendizaje no contribuya al comportamiento registrado. En este sentido, la investigación de la neurobiología de los comportamientos relacionados con las feromonas reforzantes puede aportar información novedosa y relevante para entender la base neural del refuerzo.

**Bibliografía**

- Agmo,A., Galvan,A. & Talamantes,B. (1995) Reward and reinforcement produced by drinking sucrose: two processes that may depend on different neurotransmitters. *Pharmacol.Biochem.Behav.*, 52, 403-414.
- Becker,J.B., Rudick,C.N. & Jenkins,W.J. (2001) The role of dopamine in the nucleus accumbens and striatum during sexual behavior in the female rat. *J.Neurosci.*, 21, 3236-3241.
- Berridge,K.C. & Robinson,T.E. (1998) What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res.Rev.*, 28, 309-369.
- Berridge,K.C., Venier,I.L. & Robinson,T.E. (1989) Taste reactivity analysis of 6-hydroxydopamine-induced aphagia: implications for arousal and anhedonia hypotheses of dopamine function. *Behav.Neurosci.*, 103, 36-45.
- Brog,J.S., Salyapongse,A., Deutch,A.Y. & Zahm,D.S. (1993) The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J.Comp Neurol.*, 338, 255-278.
- Cannon,C.M. & Palmiter,R.D. (2003) Reward without Dopamine. *J.Neurosci.*, 23, 10827-10831.
- Everitt,B.J. & Robbins,T.W. (2005) Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat.Neurosci.*, 8, 1481-1489.
- Floresco,S.B., Yang,C.R., Phillips,A.G. & Blaha,C.D. (1998) Basolateral amygdala stimulation evokes glutamate receptor-dependent dopamine efflux in the nucleus accumbens of the anaesthetized rat. *Eur.J.Neurosci.*, 10, 1241-1251.
- Geisler,S. & Zahm,D.S. (2005) Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. *J.Comp Neurol.*, 490, 270-294.
- Hajnal,A. & Norgren,R. (2005) Taste pathways that mediate accumbens dopamine release by rapid sucrose. *Physiol Behav.*, 84, 363-369.
- Hajnal,A., Smith,G.P. & Norgren,R. (2004) Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*, 286, R31-R37.
- Halpern,M. & Martinez-Marcos,A. (2003) Structure and function of the vomeronasal system: an update. *Prog.Neurobiol.*, 70, 245-318.

- Kane,F., Coulombe,D. & Miliaressis,E. (1991) Amygdaloid self-stimulation: a movable electrode mapping study. *Behav.Neurosci.* , 105, 926-932.
- Kelley,A.E. & Berridge,K.C. (2002) The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs. *J.Neurosci.*, 22, 3306-3311.
- Koob,G.F., Stinus,L. & Le Moal,M. (1981) Hyperactivity and hypoactivity produced by lesions to the mesolimbic dopamine system. *Behav.Brain Res.*, 3, 341-359.
- MacDonald,A.F., Billington,C.J. & Levine,A.S. (2004) Alterations in food intake by opioid and dopamine signaling pathways between the ventral tegmental area and the shell of the nucleus accumbens. *Brain Res.*, 1018, 78-85.
- Martinez-Ricos, J., Agustin, M.C., Lanuza, E. Martinez-Ricos, J., Agustin-Pavon, C., Lanuza, E. & Martinez-Garcia, F. (2007) Intraspecific communication through chemical signals in female mice: Reinforcing properties of involatile male sexual pheromones. *Chem. Senses*, 32, 139-148.
- Meredith,G.E. (1999) The synaptic framework for chemical signaling in nucleus accumbens. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 877, 140-156.
- Moncho-Bogani,J., Lanuza,E., Hernandez,A., Novejarque,A. & Martinez-Garcia,F. (2002) Attractive properties of sexual pheromones in mice. Innate or learned? *Physiol Behav.*, 77, 167-176.
- Moncho-Bogani,J., Martinez-Garcia,F., Novejarque,A. & Lanuza,E. (2005) Attraction to sexual pheromones and associated odorants in female mice involves activation of the reward system and basolateral amygdala. *Eur.J.Neurosci.*,21, 2186-2198.
- Mossman,C.A. & Drickamer,L.C. (1996) Odor preferences of female house mice (*Mus domesticus*) in seminatural enclosures. *J.Comp Psychol.*, 110, 131-138.
- Nadaud,D., Simon,H., Herman,J.P. & Le Moal,M. (1984) Contributions of the mesencephalic dopaminergic system and the trigeminal sensory pathway to the ventral tegmental aphagia syndrome in rats. *Physiol Behav.*, 33, 879-887.
- Nakahara,D., Ozaki,N., Miura,Y., Miura,H. & Nagatsu,T. (1989) Increased dopamine and serotonin metabolism in rat nucleus accumbens produced by intracranial self-stimulation of medial forebrain bundle as measured by in vivo microdialysis. *Brain Res.*, 495, 178-181.
- Nicola,S.M., Taha,S.A., Kim,S.W. & Fields,H.L. (2005) Nucleus accumbens dopamine release is necessary and sufficient to promote the behavioral response to reward-predictive cues. *Neuroscience*, 135, 1025-1033.

- Novejarque, A. (2008) Evolución del cerebro emocional: Análisis comparado de las vías amígdalo-estriatales. Tesis Doctoral. Universitat de València.
- Olds, J. & Milner, P. (1954) Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J. Comp Physiol Psychol.*, 47, 419-427.
- Parkinson, J.A., Dalley, J.W., Cardinal, R.N., Bamford, A., Fehnert, B., Lachenal, G., Rudarakanchana, N., Halkerston, K.M., Robbins, T.W. & Everitt, B.J. (2002) Nucleus accumbens dopamine depletion impairs both acquisition and performance of appetitive Pavlovian approach behaviour: implications for mesoaccumbens dopamine function. *Behav. Brain Res.*, 137, 149-163.
- Paxinos, G. & Franklin, K.B.J. (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* Academic Press, San Diego.
- Pecina, S. & Berridge, K.C. (2000) Opioid site in nucleus accumbens shell mediates eating and hedonic 'liking' for food: map based on microinjection Fos plumes 6602. *Brain Res.*, 863, 71-86.
- Pecina, S., Cagniard, B., Berridge, K.C., Aldridge, J.W. & Zhuang, X. (2003) Hyperdopaminergic mutant mice have higher "wanting" but not "liking" for sweet rewards. *J. Neurosci.*, 23, 9395-9402.
- Phillipson, O.T. (1979) Afferent projections to the ventral tegmental area of tsai and interfascicular nucleus: A horseradish peroxidase study in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 187, 117-144.
- Pitkanen, A. (2000) Connectivity of the rat amygdaloid complex. In Aggleton, J.P. (ed), *The Amygdala. A functional analysis*. Oxford University Press, Oxford, pp. 31-115.
- Richardson, N.R. & Gratton, A. (1996) Behavior-relevant changes in nucleus accumbens dopamine transmission elicited by food reinforcement: an electrochemical study in rat. *J. Neurosci.*, 16, 8160-8169.
- Robinson, S., Sandstrom, S.M., Denenberg, V.H. & Palmiter, R.D. (2005) Distinguishing whether dopamine regulates liking, wanting, and/or learning about rewards. *Behav. Neurosci.*, 119, 5-15.
- Salamone, J.D. & Correa, M. (2002) Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behav. Brain Res.*, 137, 3-25.
- Schultz, W. (1997) Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 7, 191-197.

- Schultz,W. (2002) Getting formal with dopamine and reward. *Neuron*, 36, 241-263.
- Schultz,W. (2006) Behavioral theories and the neurophysiology of reward. *Annu.Rev.Psychol.*, 57, 87-115.
- Shibata, R., Kameishi, M., Kondoh, T. & Torii, K. (2009) Bilateral dopaminergic lesions in the ventral tegmental area of rats influence sucrose intake, but not umami and amino acid intake. *Physiol. Behav.* (in press).
- Shimura,T., Kamada,Y. & Yamamoto,T. (2002) Ventral tegmental lesions reduce overconsumption of normally preferred taste fluid in rats. *Behav.Brain Res.*, 134, 123-130.
- Smith,G.P. (2004) Accumbens dopamine mediates the rewarding effect of orosensory stimulation by sucrose. *Appetite*, 43, 11-13.
- Spanagel,R. & Weiss,F. (1999) The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends Neurosci.*, 22, 521-527.
- Westerink,B.H., Teisman,A. & de Vries,J.B. (1994) Increase in dopamine release from the nucleus accumbens in response to feeding: a model to study interactions between drugs and naturally activated dopaminergic neurons in the rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.*, 349, 230-235.
- Wise,R.A. (1982) Neuroleptics and operant behavior: the anhedonia hypothesis. *Behav.Brain Sci.*, 5, 39-87.
- Wise,R.A. (1996) Addictive drugs and brain stimulation reward. *Annu.Rev.Neurosci.*, 19, 319-340.
- Wise,R.A. (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nat.Rev.Neurosci.*, 5, 483-494.
- Wise,R.A. & Rompre,P.P. (1989) Brain dopamine and reward. *Annu.Rev.Psychol.*, 40, 191-225.
- Wright,C.I., Beijer,A.V.J. & Groenewegen,H.J. (1996) Basal amygdaloid complex afferents to the rat nucleus accumbens are compartmentally organized. *J.Neurosci.*, 16, 1877-1893.
- Wyvell,C.L. & Berridge,K.C. (2000) Intra-accumbens amphetamine increases the conditioned incentive salience of sucrose reward: enhancement of reward "wanting" without enhanced "liking" or response reinforcement. *J.Neurosci.*, 20, 8122-8130.
- Yoshida,M., Yokoo,H., Mizoguchi,K., Kawahara,H., Tsuda,A., Nishikawa,T. & Tanaka,M. (1992) Eating and drinking cause increased dopamine release in the nucleus accumbens and ventral tegmental area in the rat: measurement by in vivo microdialysis. *Neurosci.Lett.*, 139, 73-76.

Zocchi,A., Girlanda,E., Varnier,G., Sartori,I., Zanetti,L., Wildish,G.A., Lennon,M., Mugnaini,M. & Heidbreder,C.A. (2003) Dopamine responsiveness to drugs of abuse: A shell-core investigation in the nucleus accumbens of the mouse. *Synapse*, 50, 293-302.



## Capítulo IV:

### Papel de la inervación dopaminérgica del shell medial del núcleo accumbens en la generación de preferencias por estímulos reforzantes



## **Introducción**

El papel de la inervación dopaminérgica del núcleo accumbens dentro del sistema neural del refuerzo sigue siendo muy debatido, tal como hemos visto en los capítulos anteriores (Berridge y Robinson, 1998; Wise, 2004; Salamone *et al.*, 2007; Salamone, 2007; Schultz, 2007). Aunque es comúnmente aceptado que las proyecciones dopaminérgicas sobre el núcleo accumbens originadas en el área ventral tegmental juegan un papel clave en procesar la información derivada de los estímulos reforzantes, se discute si estas conexiones median el procesamiento del valor hedónico de estos estímulos (*liking*), la motivación por obtenerlos (*wanting*), o bien el aprendizaje asociado al refuerzo (Berridge & Robinson, 2003).

Parte de esta discusión se centra en la identidad de las estructuras estriatales en las que se producen los procesos celulares subyacentes a estos tres componentes del refuerzo. Desde el punto de vista anatómico, el núcleo accumbens es una estructura heterogénea en la que se distingue un área central (*core*) y un área periférica (*shell*), que se describieron originalmente debido a sus diferentes perfiles de expresión de marcadores neuroquímicos (Zaborszky *et al.*, 1985).

Hoy en día es bien conocido que, además de las diferencias neuroquímicas, existen importantes diferencias funcionales entre las áreas periférica y central del accumbens (DiChiara, 2004; Kelley, 2004), en lo relativo a su papel en el procesamiento del valor reforzante de los estímulos naturales (como la comida, Basso & Kelley, 1999; Zhang & Kelley, 2000) y en el refuerzo mediado por drogas adictivas (Ikemoto, 2003; Ikemoto *et al.*, 2005). Así, el área periférica medial (AcbShM) parece jugar un papel clave en el procesamiento del valor hedónico de los estímulos naturales reforzantes, mientras que el área central parece participar de manera más relevante en los efectos condicionados inducidos por las drogas adictivas (Everitt & Robbins, 2005). Así, Alderson *et al.* (2001b) observaron que lesiones selectivas del AcbSh no alteraban la autoadministración intravenosa de heroína, mientras que las lesiones en el AcbC provocaban una reducción en la adquisición y en la respuesta en función a la dosis de heroína.

El descubrimiento de un nuevo estímulo reforzante natural, las feromonas sexuales (Martínez-Ricos *et al.*, 2007) constituye una oportunidad de poner a prueba estas teorías y de comprobar si son válidas para estímulos recompensantes de diversa naturaleza. Así, en el Capítulo III ya comparamos los efectos de las lesiones de las neuronas dopaminérgicas de la VTA sobre la preferencia por feromonas sexuales y por soluciones

de azúcar (frente a agua) (ver también Martínez-Hernández *et al.*, 2006). En este capítulo nos proponemos estudiar el efecto de lesiones restringidas de la inervación dopaminérgica de la porción medial del *Shell* del núcleo accumbens sobre las fases iniciales de adquisición de preferencia por ambos estímulos reforzantes, para contrastar la hipótesis de que la dopamina en los primeros ciclos de la espiral tecto-estriato-estriatal (AcbShM) pueda estar implicada en el procesamiento del valor hedónico de los estímulos recompensantes. Además, la comparación del efecto de las lesiones en la adquisición de preferencia por dos reforzantes naturales diferentes (ambos de naturaleza quimiosensorial) permite estudiar si el papel de esta inervación dopaminérgica es similar para los distintos refuerzos.

En este sentido nos planteamos que, en ausencia de experiencia previa, un déficit parcial en la capacidad de procesar el valor hedónico de un estímulo o en la motivación por el mismo puede no ser observable en el "consumo" total efectuado por el animal sino en la dinámica de obtención del refuerzo. Siguiendo este argumento, un déficit en el procesamiento del valor hedónico se reflejaría en los primeros instantes de obtención del estímulo reforzante (dado que el estímulo no es detectado como placentero), mientras que un déficit en la motivación por obtener el refuerzo debe aparecer algo más tarde en el test de preferencia (dado que el estímulo es detectado como placentero pero la motivación por obtenerlo es defectuosa). Por tanto, en este experimento analizamos la dinámica de la quimioinvestigación de las feromonas, que podría revelar un efecto de las lesiones que no aparece en el tiempo total de exploración, así como la dinámica de la adquisición de preferencia por sacarosa. En este sentido, como hemos descrito en el Capítulo III, las neuronas dopaminérgicas del VTA son necesarias para la expresión de la preferencia por una solución dulce. Ello puede deberse a que la muerte de las neuronas dopaminérgicas afecte a la capacidad de procesar el valor hedónico del sabor dulce o, alternativamente, puede deberse a que la lesión altere la motivación por obtener la solución dulce (Berridge & Robinson, 2003). Además, la motivación por la solución de sacarosa puede estar afectada por déficits en el aprendizaje que permite a los animales atribuir a los estímulos predictores del refuerzo una relevancia como pistas que incentivan el deseo de obtener el mismo (véase discusión del Capítulo III).

Es también necesario tener en cuenta que las neuronas dopaminérgicas del VTA dan lugar a importantes proyecciones que inervan, además del núcleo accumbens (tanto el área central como el área periférica), la corteza prefrontal y la amígdala (véase capítulo II). Estas tres estructuras forman parte del sistema del refuerzo (Kelley &

Berridge, 2002; Baxter & Murray, 2002), y por tanto pueden participar en el procesamiento del refuerzo derivado del sabor dulce. Sin embargo, diversos trabajos previos sugieren que la implicación de la vía dopaminérgica tegmento-estriatal en la recompensa derivada del sabor dulce depende específicamente de la proyección sobre el AcbShM (Hajnal & Norgren, 2001; Norgren *et al.*, 2006). Por tanto, las lesiones específicas del AcbShM nos revelarán si efectivamente el *input* dopaminérgico sobre esta estructura es crítico en la preferencia por el sabor dulce. Además, al igual que hemos planteado para el caso de las feromonas, el análisis de la dinámica de obtención del refuerzo puede aportar datos reveladores sobre si las lesiones afectan a la hedonía, a la motivación o al aprendizaje asociado al refuerzo.

Los experimentos descritos en este capítulo tienen, por tanto, un doble objetivo. Por un lado comprobar si la depleción de dopamina del AcbShM afecta a la dinámica de preferencia por feromonas sexuales, y por otro comprobar si el déficit en la preferencia por sacarosa observado tras lesiones de las células dopaminérgicas del VTA se debe a la falta de dopamina en el AcbShM, así como clarificar si el déficit de dopamina en esta zona afecta a la preferencia por sacarosa alterando el componente hedónico, el motivacional o el aprendizaje asociado al refuerzo. Para responder estas preguntas, lesionamos los terminales dopaminérgicos de la zona medial del Acb y analizamos en detalle la dinámica de la preferencia por sacarosa y por feromonas sexuales especialmente en los primeros minutos de obtención del refuerzo.

Es importante resaltar que, puesto que nuestros animales experimentales no tenían experiencia previa ni con sacarosa ni con feromonas sexuales, en la primera experiencia con el refuerzo sólo el valor hedónico del mismo puede dar lugar a una preferencia, dado que el componente motivacional y el aprendido dependen, por definición, de la experiencia previa con el estímulo reforzante. Por tanto, el análisis de los primeros minutos de exposición a los estímulos reforzantes (sacarosa o feromonas sexuales) debe revelarnos los efectos de la lesión sobre el procesamiento del valor hedónico de cada estímulo, mientras que el análisis de la dinámica de la preferencia una vez pasados los primeros instantes debe revelarnos efectos sobre la adquisición de la motivación o sobre el aprendizaje asociado al refuerzo.

Para poder estudiar la dinámica de la preferencia por los dos estímulos reforzantes es necesario utilizar un método de medida que permita comparar los primeros instantes en que los animales acceden por primera vez a la sacarosa y a las feromonas sexuales, y por tanto no es útil la metodología utilizada en el capítulo III, en el que los

experimentos de preferencia por sacarosa y por feromonas tenían marcos temporales muy distintos. Por ello, en este capítulo, utilizamos el test de preferencia por feromonas anteriormente descrito pero en este caso analizamos la preferencia en intervalos temporales de 10 segundos. Para estudiar la preferencia por la sacarosa utilizamos un contador de lametones (Cannon & Palmiter, 2003), con el que podemos saber de qué botella bebe el animal y en qué cantidad en cada momento, y ajustamos el periodo de test a una hora. Además, este paradigma experimental ha sido descrito en detalle utilizando una concentración de sacarosa de 0.5 M (Cannon & Palmiter, 2003), por lo que decidimos utilizar esta misma concentración en nuestros experimentos a fin de poder comparar nuestros resultados con los disponibles en la literatura. Con el fin de comparar con los resultados obtenidos en el Capítulo III, después de los tests llevados a cabo en los contadores de lametones repetimos los tests de 48 horas siguiendo el protocolo utilizado anteriormente.

Los resultados obtenidos indican que, ya en los individuos control, la obtención de ambos estímulos reforzantes muestra dinámicas iniciales muy diferentes. Mientras la preferencia por feromonas masculinas muestra una dinámica lineal, la dinámica inicial de la preferencia por la solución azucarada es mucho más compleja, con una fase marcada de preferencia inicial, seguida de un rechazo del estímulo dulce que es interpretado como una neofobia (ver discusión). Por otra parte, nuestros resultados indican que mientras las lesiones del VTA daban lugar a un descenso en el consumo de sacarosa (en periodos largos), las lesiones del área periférica medial del Acb no parecen tener efectos sobre la preferencia por sacarosa a largo plazo, aunque sí sobre la dinámica de adquisición de la preferencia por sacarosa. Por el contrario, la depleción de dopamina del AcbShM no parece afectar a la atracción de las hembras de ratón por feromonas sexuales, de acuerdo con los resultados del Capítulo III, ni a su dinámica inicial.

## **Material y métodos**

### **Animales y diseño experimental**

Estos experimentos se realizaron utilizando hembras de ratón de la cepa CD-1 (Harlam, Barcelona, España), que fueron tratadas de acuerdo con la Directiva del Consejo de la Comunidad Europea del 24 de Noviembre de 1986 (86/609/EEC). Como en el Capítulo III, las hembras utilizadas en estos experimentos fueron criadas de manera que, en el momento de los experimentos, no tenían experiencia previa con señales químicas derivadas de machos adultos. Veinticinco hembras de ratón adultas “químicamente vírgenes” se asignaron al azar al grupo control (n=10, cirugía simulada) o al grupo experimental (lesiones de los terminales dopaminérgicos del AcbShM) (n=15).

### **Cirugía y cuidados post-operatorios**

Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron siguiendo los protocolos descritos en el Capítulo III. Los animales en el grupo LESIONADO recibieron inyecciones bilaterales de neurotoxina (6-OHDA, preparada tal como se ha descrito en el capítulo III) en el área periférica medial del núcleo accumbens utilizando las siguientes coordenadas: 1.5 mm anterior desde bregma, 1.1 mm desde la línea media y 4.0 mm de profundidad desde la superficie cerebral (coordenadas adaptadas a la cepa CD-1 a partir del atlas de Paxinos & Franklin, 2001). Por su parte, los animales del grupo SIMULADO recibieron inyecciones de vehículo en las mismas coordenadas. Las inyecciones se realizaron a un flujo de 0.1  $\mu$ l por minuto hasta alcanzar los 0.5  $\mu$ l totales por hemisferio. Como en el capítulo III, inyectamos desipramina intraperitonealmente a los animales, para proteger sus neuronas adrenérgicas del efecto del neurotóxico. Igualmente, durante el período posoperatorio y los días siguientes controlamos el peso de los animales y cambiamos su dieta como en el capítulo III en los casos en que observamos hipofagia e hipodipsia.

### **Test de actividad locomotora**

Las lesiones de la vía tecto-estriatal pueden afectar también a la actividad y movilidad de los animales, lo que haría difícil interpretar las medidas del comportamiento investigador. Para analizar el efecto de estas lesiones en la movilidad de los animales, estimamos la actividad motora midiendo la velocidad media (cm/s) de

los animales durante los tests control (C/C) pre- y post-quirúrgicos, usando el programa informático de análisis de comportamiento Smart v.2.0 (Panlab, Barcelona).

### **Test de preferencia por el sabor dulce**

El test de preferencia por el sabor dulce se realizó en el interior de una caja de Skinner provista de dos botellas con contador automático de lametones (PanLab, Barcelona). Cada vez que un animal da un lametón en alguna de las botellas el sistema envía una señal a un ordenador que genera el correspondiente registro. Para que los animales bebiesen al ser introducidos en la caja, se les privó de agua durante las 24 horas anteriores. Previamente, los animales fueron habituados a la caja de Skinner mediante 3 sesiones de 1 hora durante 3 días sucesivos (tras 24 horas de privación en cada caso), en las que tuvieron acceso a agua el primer día en una de las botellas, el segundo en la otra y el tercero en ambas simultáneamente. El cuarto día se realizó el test de preferencia por sabor dulce, en el que una de las botellas contenía una solución 0.5 M de sacarosa y la otra agua. El test se repitió un día después intercambiando la posición de las botellas. En ambos tests la duración de la prueba fue de 1 hora. Los lametones se analizaron en bloques de 1 minuto desde el inicio de la prueba.

Para poder comparar más fácilmente los resultados de este capítulo con los del anterior, a continuación los animales fueron sometidos a otro test de preferencia por sacarosa idéntico al del capítulo III. Resumiendo, los animales pasaron 48 horas con acceso libre a dos botellas que contenían agua o una solución 0.1 M de sacarosa. Las botellas se pesaron al principio y al final del test para obtener una medida del consumo de agua y sacarosa de cada animal durante las 48 horas.

### **Metodología histológica**

Al finalizar los experimentos los animales fueron perfundidos, y sus cerebros extraídos, cortados y procesados utilizando la misma metodología y procedimientos inmunohistoquímicos que en el capítulo III. Para evaluar la extensión de la lesión analizamos, en las preparaciones de detección inmunohistoquímica del transportador de dopamina, tres niveles del Acb, uno anterior (coordenada AP, 1.70 mm desde Bregma de acuerdo con Franklin & Paxinos, 2001), uno intermedio (coordenada AP, 1.10) y uno caudal (coordenada AP, 0.86 mm). Usando una cámara clara dibujamos para cada sección, la citoarquitectura y la extensión de la lesión. Tras escanear cada dibujo utilizamos el software *Image J* 1.5 (Wayne Rasband, NIH, USA) para determinar qué

porcentaje del AcbShM estaba afectado por la lesión. Para ello, consideramos la extensión ventral del AcbShM hasta la línea que va desde el *aca* hasta el borde medial del tubérculo olfativo (Fig. 4.1). Aquellos animales en los que la lesión del AcbShM fue inferior al 65% (considerando ambos hemisferios en cada animal) fueron descartados de los siguientes análisis estadísticos.

### **Tratamiento de los datos y análisis estadístico**

Los datos relativos a la movilidad y comportamiento exploratorio, tiempo gastado investigando el sustrato limpio o utilizado por macho y el consumo de agua y sacarosa en los tests de 1 hora fueron analizados estadísticamente usando el programa informático de análisis estadístico SPSS (versión 14.0). Para analizar si existen diferencias entre los grupos en las diferentes variables se utilizó un análisis de varianza de medidas repetidas para la movilidad, el comportamiento exploratorio de las feromonas y el consumo de sacarosa. Previamente al análisis, se comprobó que los datos cumplían el requisito de esfericidad, y en caso de no hacerlo se aplicó el ajuste de Greenhouse-Geisser.

Algunos de los datos del consumo de agua y sacarosa en el test de 48 horas no seguían una distribución normal (el consumo de agua y la variable "resta" en el grupo SIMULADO y la variable "suma" en el grupo LESIONADO, test de Kolmogorov-Smirnov). Por tanto, como en el capítulo anterior, se analizaron estos datos utilizando test no paramétricos, la U de Mann-Whitney.

### **Comportamiento quimio-investigador**

Para comprobar si la investigación de ambos recipientes era equilibrada antes de la operación, se realizó un test t de Student para muestras emparejadas comparando el tiempo que los animales pasaron explorando cada recipiente en el test control prequirúrgico. El tiempo total utilizado investigando ambos recipientes también fue analizado usando una ANOVA de una vía comparando los grupos SIMULADO y LESIONADO para comprobar que las posibles diferencias no se debían a un déficit en el comportamiento investigador del grupo LESIONADO. Para evaluar posibles diferencias en el comportamiento quimioinvestigador del sustrato limpio o el ensuciado por machos, el tiempo utilizado investigando cada recipiente fue analizado utilizando una ANOVA de tres vías de medidas repetidas. También se estudió la dinámica temporal de la preferencia por el sustrato utilizado por machos, analizando en bloques

de 10 segundos la preferencia a lo largo del test mediante una ANOVA de tres vías de medidas repetidas.

### **Preferencia por sacarosa**

Antes de analizar los datos del test de preferencia por el sabor dulce, para comprobar si hay una preferencia previa por alguna botella (por ejemplo, los animales podrían evitar la botella más cercana a la puerta de la caja de Skinner), se comparó mediante una *t* de Student en cada uno de los grupos (SIMULADO y LESIONADO), los lametones en la botella izquierda con los lametones en la botella derecha en el test en el que ambas botellas contenían agua.

Los datos de los lametones efectuados en el test de preferencia por el sabor dulce fueron analizados de tres maneras. En primer lugar, para comprobar que la lesión no disminuía la apetencia por los líquidos o dificultaba de alguna manera la acción de beber, se analizó mediante una ANOVA de dos vías el total de lametones (suma) en ambas botellas. En segundo lugar, para evaluar el consumo de agua y sacarosa, el número de lametones en cada botella fue analizado utilizando una ANOVA de medidas repetidas. En tercer lugar, al igual que en el capítulo III, tomamos como índice de preferencia por sacarosa la resta de los lametones efectuados en la botella que contenía sacarosa menos los lametones de la botella que contenía agua. Esta variable fue analizada mediante una ANOVA de dos vías (ver resultados).

Con el objetivo de complementar este análisis y para investigar los detalles de la dinámica inicial de consumo de sacarosa y agua, realizamos una serie de análisis de los 15 primeros minutos en bloques de un minuto. Para ello, utilizamos las mismas variables descritas en el párrafo anterior, consumo total (suma), consumos de agua y de sacarosa, y el índice de preferencia por sacarosa (resta) y los mismos análisis (ANOVA de medidas repetidas).

Por último analizamos en detalle la primera experiencia de las hembras de ratón con la sacarosa, dado que durante este período, previsiblemente, el consumo debería estar determinado fundamentalmente por el impacto hedónico del sabor dulce mientras que el desarrollo de la motivación es incipiente. Para ello intentamos estimar la duración de los períodos de consumo continuado de sacarosa, es decir, los períodos en que los animales, tras probar la solución dulce, no cambiaban de botella sino que seguían bebiendo de la misma. Analizamos así los primeros cuatro períodos de consumo continuado de sacarosa (o de agua), para los que medimos la duración de los mismos, el

número de lametones por período, y la avidez del consumo estimada como el número de lametones por segundo.

### **Tests de preferencia por las señales químicas derivadas de machos y comportamiento quimio-investigador**

Para realizar estos test comportamentales utilizamos un protocolo similar al descrito en el capítulo anterior, con la diferencia de que para medir el tiempo que cada animal gastaba investigando cada uno de los recipientes se utilizó el programa informático Smart v.2.0, que discrimina automáticamente el animal respecto del fondo y registra su posición. Para cuantificar el tiempo que un ratón pasa investigando un determinado recipiente se tomó como criterio que su centro de masas estuviera situado sobre el recipiente o a menos de 1 cm de éste. El registro proporcionado por Smart permitió analizar no sólo el tiempo total de investigación de los recipientes al final del test, sino también la evolución de este comportamiento a lo largo del test en bloques de 10 segundos.

Antes de realizar la cirugía, todas las hembras fueron habituadas a la manipulación necesaria para realizar el test y a la caja experimental (10 minutos al día durante dos días) y se les realizó un test prequirúrgico con viruta limpia en ambos recipientes (C/C). Este test se utilizó para eliminar los animales que mostraban un comportamiento exploratorio muy desequilibrado (al pasar más de un 80% del tiempo de exploración de los recipientes sobre uno de los dos lados), y con este criterio resultó eliminado un animal de cada grupo (SIMULADO, n = 9; LESIONADO, n = 14. Después del tiempo de recuperación postoperatorio, todas las hembras (de los grupos SIMULADO y LESIONADO) pasaron de nuevo por dos días de habituación y se les realizó un test C/C postquirúrgico. La comparación de ambos tests control (pre- y post-quirúrgico) nos permitía analizar el efecto de las lesiones sobre comportamiento exploratorio global. Después del test C/C, se realizó el test de preferencia de señales químicas derivadas de machos (C/M, sustrato limpio contra sustrato utilizado por machos).

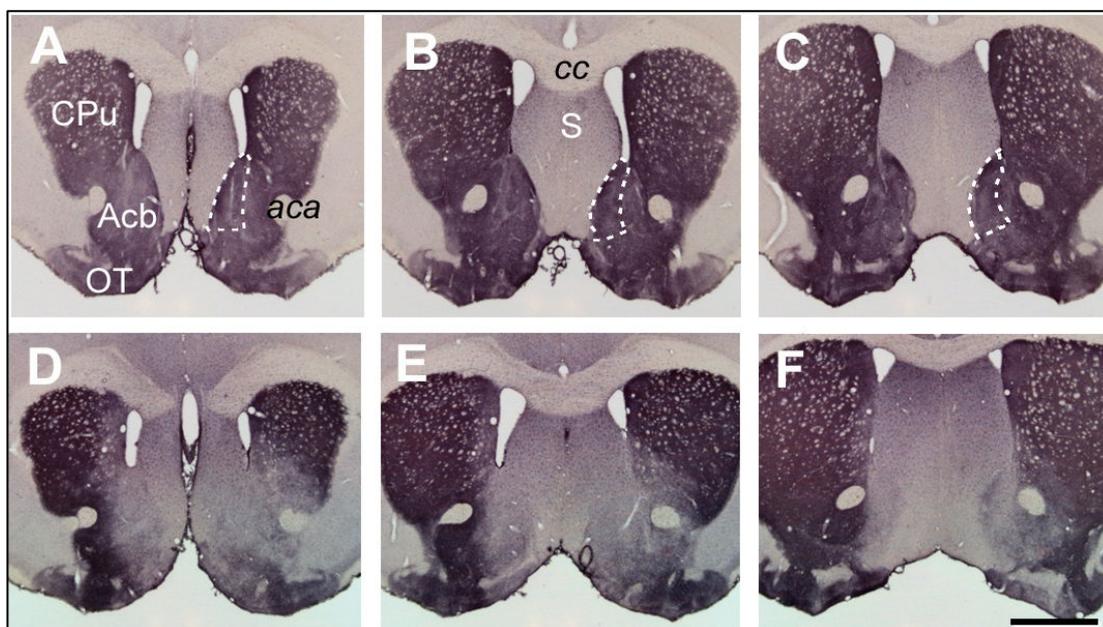
## Resultados

### Evaluación histológica de las lesiones

La inyección de 6-OHDA resultó en la reducción sustancial de fibras inmunoreactivas para el DAT en el Acb bilateralmente, particularmente en el área objetivo (el *shell* medial, Fig. 4.1) y, en algunos casos, en la parte ventral del caudatus putamen, en la zona atravesada por la trayectoria de la micropipeta. De los 14 animales lesionados se seleccionaron los ocho animales que tenían al menos un 65% del área total del AcbShM con una clara depleción de la innervación dopaminérgica, que integraron el grupo LESIONADO. El área lesionada del *shell* medial del núcleo accumbens en los ocho animales del grupo lesionado fue, en promedio, del 82%. El área lesionada incluía el islote mayor de Calleja. Otros seis animales no cumplieron este requisito (depleción dopaminérgica menor del 65% del AcbShM) y fueron descartados para el resto de análisis.

### Tests de actividad motora

Para comprobar que los animales no sufrían una deficiencia motora debida a la inyección de neurotóxico, que dificultase la movilidad y por tanto el comportamiento



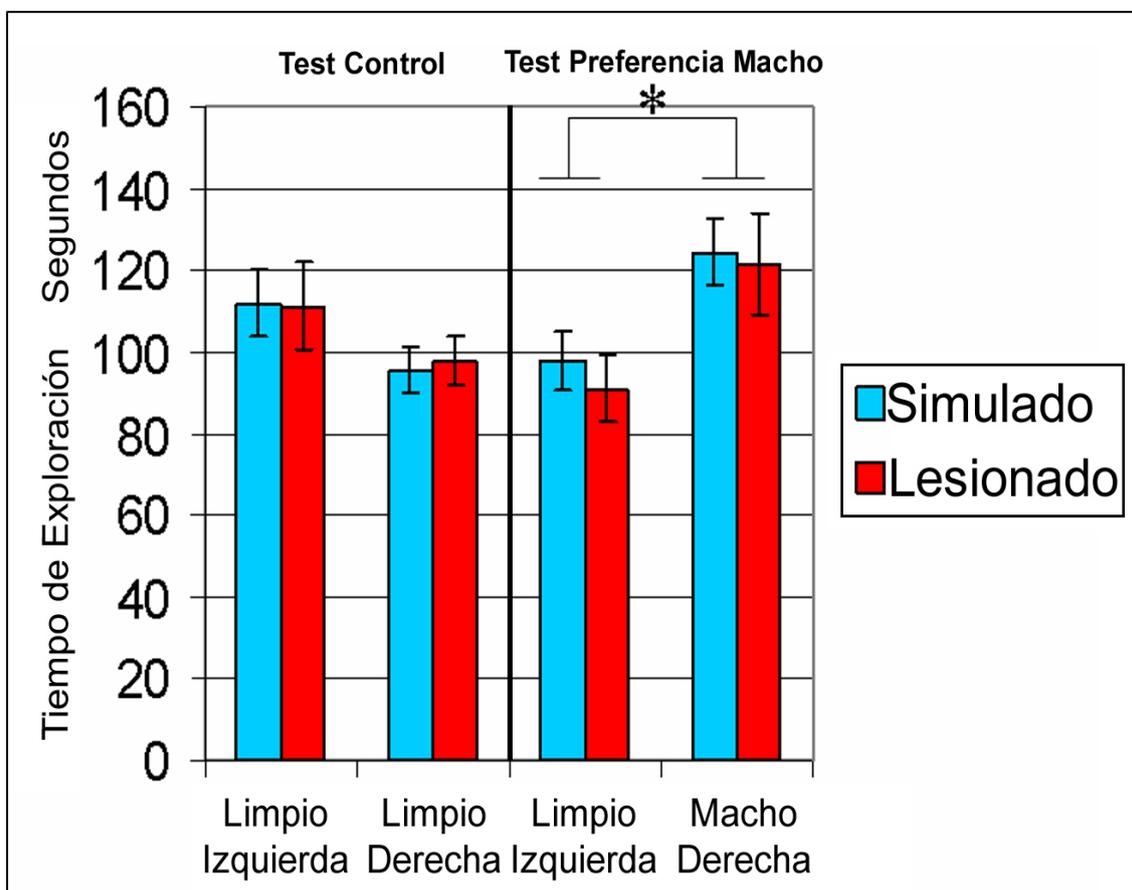
**Figura 4.1** Fotomicrografías digitales de tres secciones del núcleo accumbens procesadas para la detección inmunohistoquímica del DAT, de un animal del grupo SIMULADO (A-C de rostral a caudal) y uno del LESIONADO (D-F, de rostral a caudal). El *shell* medial del núcleo accumbens (señalado con una línea discontinua) muestra una pérdida bilateral sustancial de innervación positiva para el DAT en el animal lesionado. Otras partes del núcleo accumbens, tubérculo olfativo y caudatus putamen también sufrieron una pérdida de innervación dopaminérgica. Barra de calibración en F: 1 mm. Abreviaturas, ver la lista.

exploratorio, medimos la velocidad media del animal en los 5 minutos en el test C/C antes y después de la operación. Los datos de la velocidad se analizaron mediante una ANOVA de medidas repetidas comparando los grupos LESIONADO y SIMULADO (factor entre-sujetos) y los tests pre- y post-quirúrgico (factor intra-sujetos). Este análisis demostró que no había efectos significativos del factor grupo ( $F_{1,15} = 0.01$ ;  $p > 0.9$ ) ni de la operación ( $F_{1,15} = 0.158$ ;  $p > 0.6$ ). Tampoco era significativa la interacción entre ambos factores ( $F_{1,15} = 0.021$ ;  $p > 0.8$ ). Por tanto, ni las lesiones ni la operación afectaron a la capacidad locomotora de los animales.

### **Tests de preferencia por la feromona de macho**

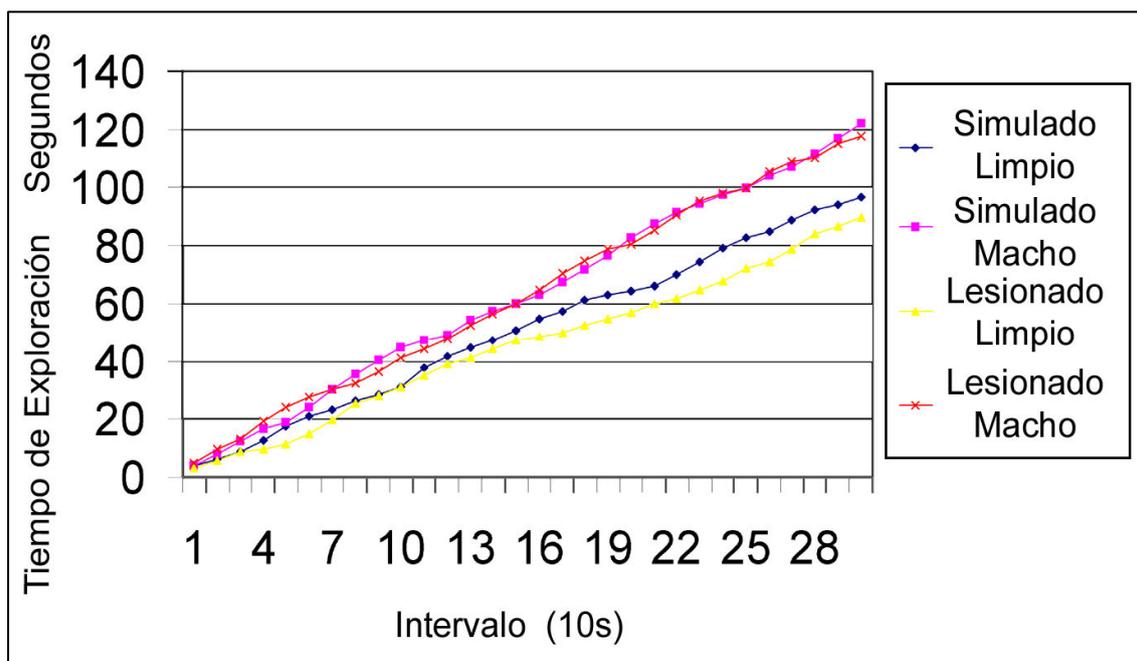
Para comprobar que los animales no tenían una preferencia previa por algún lado de la caja antes de la operación, estudiamos el comportamiento exploratorio de ambos grupos en el test control (sustrato limpio en ambos recipientes). Mediante un test t de Student para muestras emparejadas comparamos el tiempo que los animales pasaron explorando cada recipiente. El análisis reveló que ambos grupos, SIMULADO ( $t_8 = 1.31$ ;  $p > 0.2$ ) y LESIONADO ( $t_7 = 1.22$ ;  $p > 0.2$ ), mostraban una exploración equilibrada por ambos recipientes. Además, el tiempo total invertido investigando los recipientes no se vio afectado por la lesión, como revela la ANOVA comparando este parámetro en los grupos SIMULADO y LESIONADO en el test C/C postquirúrgico ( $F_{1,15} = 0.018$ ;  $p > 0.8$ ) y en el test de preferencia C/M ( $F_{1,15} = 0.707$ ;  $p > 0.4$ ). Por tanto nuestro diseño experimental es no sesgado, dado que los animales no muestran preferencia previa por ninguno de los recipientes, y además las lesiones no afectan al comportamiento exploratorio cuando éste es realizado sobre viruta limpia.

El comportamiento quimioinvestigador de las hembras fue analizado utilizando una ANOVA de tres vías, con el TEST (control o de preferencia por machos) y LADO (izquierda, derecha) como factores intrasujetos, y el GRUPO (SIMULADO, LESIONADO) como factor intersujetos. La ANOVA reveló que los factores "LADO" ( $F = 0.05$ ;  $p > 0.3$ ) y "GRUPO" ( $F = 0.1$ ;  $p > 0.7$ ) no tenían efectos significativos. El



**Figura 4.2** La lesión de la innervación dopaminérgica del AcbShM no tiene un efecto significativo en la preferencia de las hembras por el sustrato utilizado por macho. El gráfico muestra el tiempo promedio ( $\pm$  error estándar) que las hembras gastan investigando ambos recipientes en el test control, cuando había sustrato limpio en ambos recipientes, y en el test de preferencia, cuando había sustrato utilizado por macho en el recipiente derecho. No había diferencia entre ambos grupos (SIMULADO y LESIONADO) en la investigación preferencial de las señales químicas derivadas de macho. Ambos recipientes fueron investigados por igual en el test control, mientras que en el test de preferencia, el sustrato utilizado por macho era preferido significativamente (asterisco) (ver texto para más detalles).

efecto del "TEST" era marginalmente significativo ( $F = 3.36$ ;  $p < 0.09$ ). La interacción de segundo orden "LADO x TEST" era significativa ( $F_{1,15} = 11.23$ ;  $p < 0.05$ ), mientras que la interacción "GRUPO x TEST" ( $F_{1,15} = 1.53$ ;  $p > 0.2$ ) y la interacción de tercer orden (TEST x LADO x GRUPO,  $F_{1,15} = 0.001$ ;  $p > 0.9$ ) no eran significativas. La presencia de una interacción significativa "localización x test" y la ausencia de una interacción de tercer orden son indicativas de una preferencia similar de ambos grupos de animales por las feromonas derivadas de macho (Fig. 4.2). De hecho, un análisis



**Figura 4.3** El gráfico ilustra la dinámica de la exploración decada recipiente que las hembras de ratón muestran en el test de preferencia, dividido en bloques de 10s. No se observan diferencias entre ambos grupos (SIMULADO y LESIONADO), que siguen una dinámica lineal.

post-hoc de la interacción “LADO x TEST” usando la comparación por pares (con la corrección de Bonferroni) mostraba que los recipientes izquierdo y derecho eran investigados por igual en el test control ( $p > 0.05$ ), pero no en el test de preferencia por macho, en el que el recipiente que contenía el sustrato utilizado por macho era significativamente más investigado ( $p < 0.05$ ) (Fig. 4.2).

Por otro lado, la falta de significación de la interacción “GRUPO x TEST”, así como de la interacción de tercer orden, indican que la presencia de feromonas en el test de preferencia de macho tiene el mismo efecto en el comportamiento de los animales del grupo SIMULADO y del grupo LESIONADO. En otras palabras, no hay diferencia en la preferencia por el sustrato utilizado por macho entre ambos grupos.

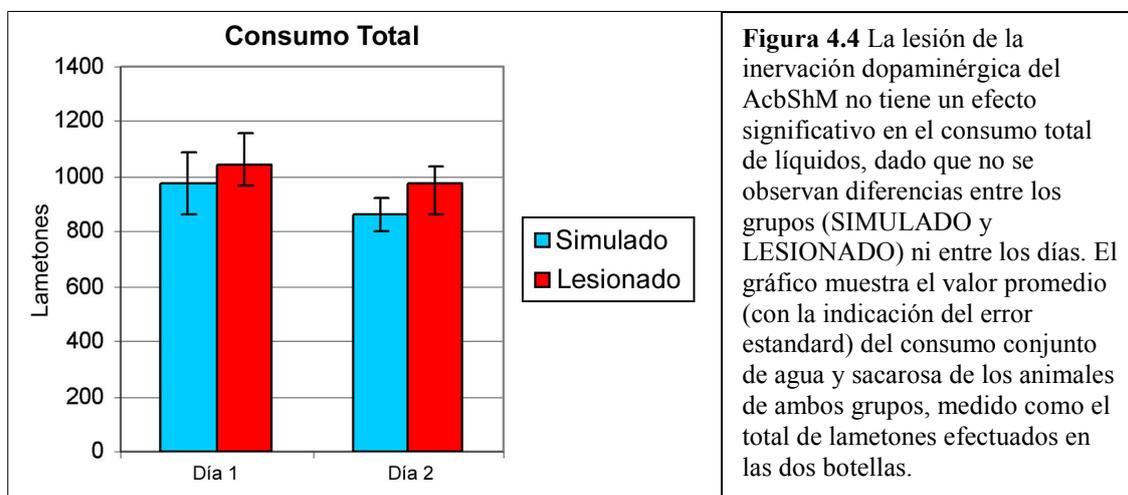
Para describir en detalle la dinámica de la preferencia por las feromonas de macho analizamos los 5 minutos del test C/M en 30 bloques de 10 segundos (Fig. 4.3), utilizando una ANOVA de tres vías con el TIEMPO (los intervalos de 10 segundos) y el LADO (izquierda, derecha) como factores intra-sujetos y el GRUPO (SIMULADO, LESIONADO) como factor entre sujetos. El análisis mostró que sólo había un efecto significativo del factor “LADO”, debido a que los animales pasaban significativamente más tiempo durante el test investigando el recipiente que contenía feromonas de macho ( $F_{1,15} = 5.378$ ;  $p < 0.05$ ). El resto de factores (tiempo,  $F < 1$ ;  $p > 0.5$ ; grupo,  $F = 1.04$ ;  $p > 0.3$ ) e interacciones no mostraron efectos significativos, ni la interacción “LADO x TIEMPO” ( $F_{1,15} = 0.907$ ;  $p > 0.5$ ) por lo que la preferencia por el lado no cambia a lo

largo de los 5 minutos. Tampoco la interacción “LADO x GRUPO” ( $F_{1,15} = 0.019$ ;  $p > 0.8$ ) ni la interacción de tercer orden “LADO x TIEMPO x GRUPO” ( $F_{1,15} = 0.803$ ;  $p > 0.6$ ) fueron significativas, por lo que la preferencia por feromonas masculinas no se ve afectada, como demostraba el análisis anterior, por la lesión. Por otra parte, la ausencia de interacción de tercer orden demuestra que en ambos grupos la preferencia por las feromonas de macho en la primera exposición a las mismas, muestra una dinámica lineal (Fig. 4.3) sin habituación ni sensibilización con el tiempo.

### Test de preferencia por sacarosa

Tras los tests de preferencia por feromonas de macho, estudiamos en los mismos animales la preferencia por otro refuerzo natural también de naturaleza química: el sabor dulce. Para ello utilizamos tests de preferencia de una solución de sacarosa frente a agua, un paradigma comportamental en el cual la preferencia por la solución azucarada depende de la vía tegmento-estriatal (Capítulo III; Shimura *et al.*, 2002).

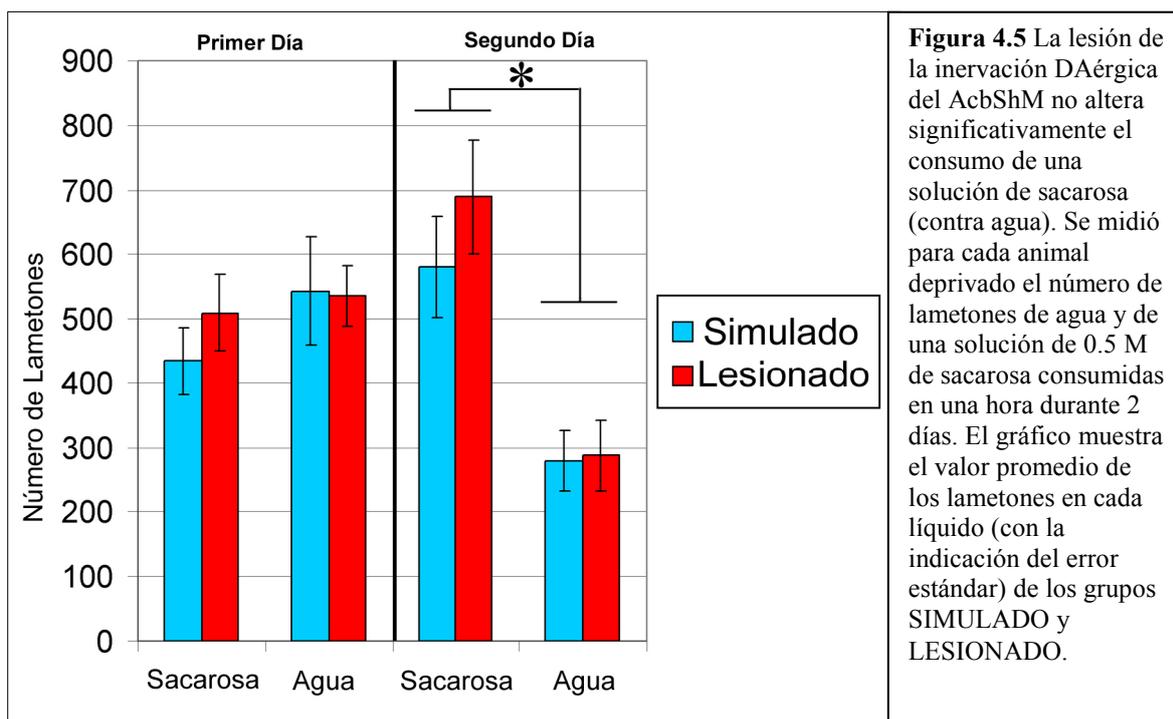
Para descartar que los animales tuviesen una preferencia previa por alguna de las dos botellas utilizadas en el test (debido por ejemplo a la posición respecto a la puerta de la caja experimental, a las condiciones de iluminación, etc.) analizamos el número de lametones que los animales realizaron en cada botella en el tercer día de habituación, cuando ambas contenían agua. Para ello realizamos un test t de Student para muestras relacionadas comparando el número de lametones en ambas botellas en cada grupo, lo que no dio un resultado significativo ni en el grupo SIMULADO ( $t_8 = -0.06$ ;  $p > 0.9$ ) ni en el grupo LESIONADO ( $t_8 = -0.23$ ;  $p > 0.8$ ). Por tanto, en nuestras condiciones experimentales partimos de una situación equilibrada en cuanto a la preferencia inicial



de los animales por las dos botellas utilizadas para presentar el estímulo reforzante.

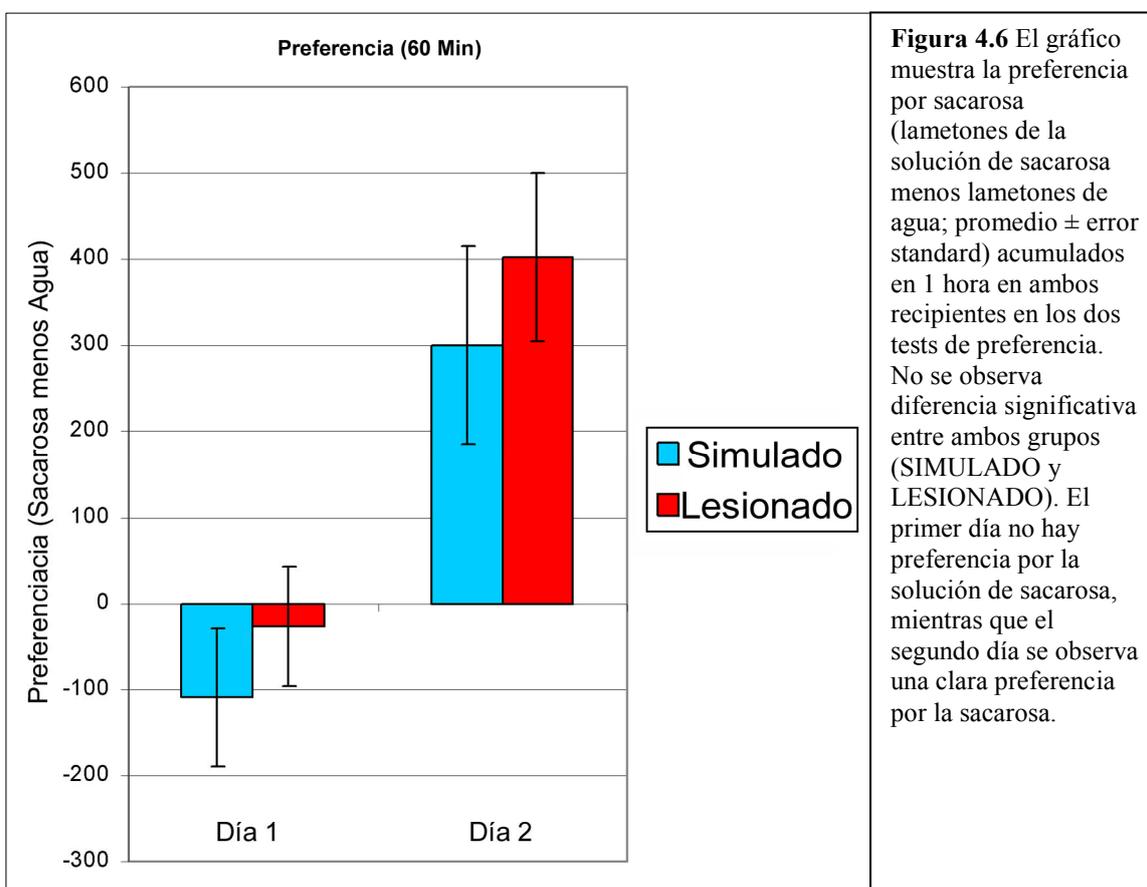
Para comprobar si las lesiones de la innervación dopaminérgica del núcleo accumbens afectaban al comportamiento de la ingesta de líquidos o a las capacidades motoras necesarias para realizar lametones en los dispensadores de las botellas, comparamos la suma total de lametones (en ambas botellas) de cada día en el grupo SIMULADO y en el LESIONADO (Fig. 4.4) mediante una ANOVA de dos vías. El resultado de este análisis mostró una falta de efectos significativos tanto del factor día ( $F_{1,15} = 1.21$ ;  $p > 0.2$ ) como del factor grupo ( $F_{1,15} = 0.8$ ;  $p > 0.3$ ), así como de la interacción entre ambos ( $F_{1,15} = 0.07$ ;  $p > 0.7$ ). Por tanto, como se aprecia claramente en la Fig. 4.4, no había ninguna diferencia en el consumo total de líquido debido a las lesiones ni diferencia entre los tests del primer y segundo día.

Para analizar si el consumo de agua o sacarosa (medido como el número de lametones en cada dispensador, Fig. 4.5) estaba afectado por las lesiones de los terminales dopaminérgicos del núcleo accumbens, realizamos una ANOVA de tres vías del número de lametones en cada botella utilizando el día del test (día 1 o día 2) y el líquido (agua o sacarosa) como factores intra-sujetos y el grupo (SIMULADO frente a LESIONADO) como factor inter-sujetos. Este análisis reveló un efecto significativo del líquido ( $F_{1,15} = 8.07$ ;  $p < 0.05$ ) y de la interacción de segundo orden “líquido x día” ( $F_{1,15} = 23.255$ ;  $p < 0.01$ ). Sin embargo, no resultó significativo el efecto del grupo ( $F_{1,15} = 0.844$ ;  $p > 0.3$ ), ni el efecto de las interacciones “líquido x grupo” ( $F_{1,15} = 0.846$ ;  $p >$



0.3) ni “líquido x grupo x día” ( $F_{1,15} = 0.012$ ;  $p > 0.9$ ). Por lo que podemos concluir que aunque existe una preferencia por la sacarosa ésta depende del día del test (si es la primera vez que prueban la sacarosa o no) y es, en cambio, independiente de si los animales han sido lesionados o no (Fig. 4.5). De hecho, un análisis post-hoc de la interacción “líquido x día” usando la comparación por pares (con la corrección de Bonferroni) mostraba que no había una diferencia significativa en el número de lametones en la botella de agua y en la de sacarosa en el primer día de test ( $p > 0.2$ ), pero sí la había el segundo día, en el cual la solución que contenía sacarosa era significativamente más consumida que el agua ( $p < 0.01$ ).

El análisis del índice de preferencia por sacarosa corrobora estos resultados (Fig. 4.6). La ANOVA de dos vías revela un efecto significativo del factor día ( $F_{1,15} = 23.25$ ;  $p < 0.01$ ), pero no del grupo ( $F_{1,15} = 0.8$ ;  $p > 0.3$ ) ni de la interacción "grupo x día" ( $F_{1,15} = 0.012$ ;  $p > 0.9$ ). Por tanto, la preferencia por el sabor dulce de la sacarosa sólo se manifestaba el segundo día, una vez que los animales ya tenían experiencia previa con el sabor dulce, y lo hacía por igual en el grupo de animales LESIONADO y en el grupo SIMULADO.

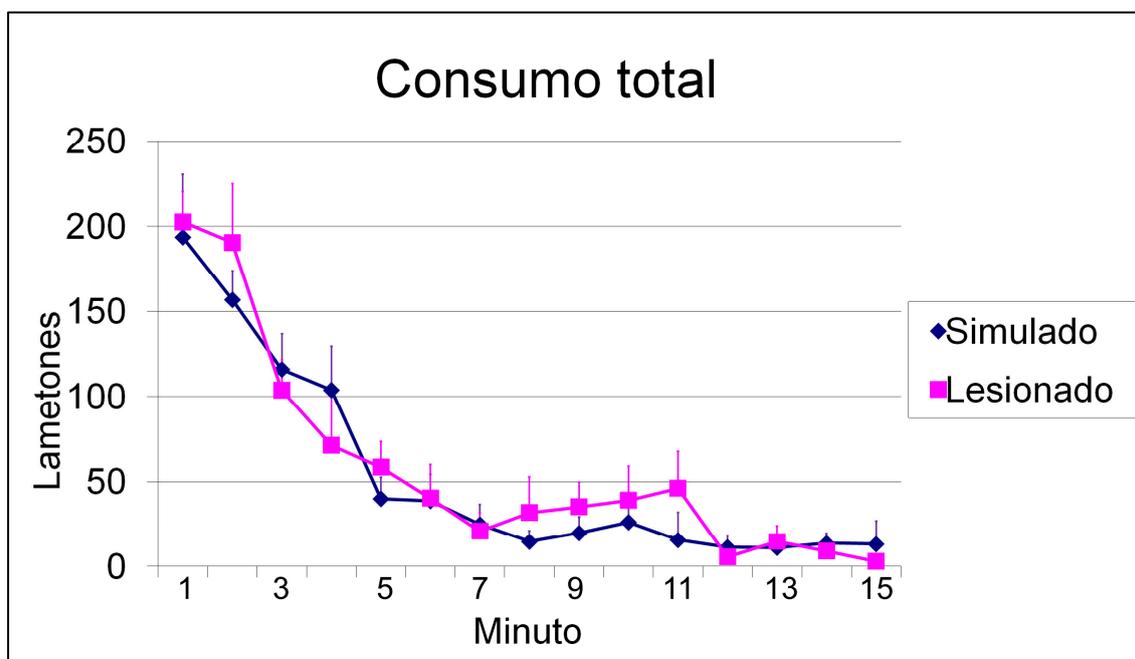


**Figura 4.6** El gráfico muestra la preferencia por sacarosa (lametones de la solución de sacarosa menos lametones de agua; promedio  $\pm$  error standard) acumulados en 1 hora en ambos recipientes en los dos tests de preferencia. No se observa diferencia significativa entre ambos grupos (SIMULADO y LESIONADO). El primer día no hay preferencia por la solución de sacarosa, mientras que el segundo día se observa una clara preferencia por la sacarosa.

### Dinámica de la preferencia por sacarosa en los tests del primer y segundo día

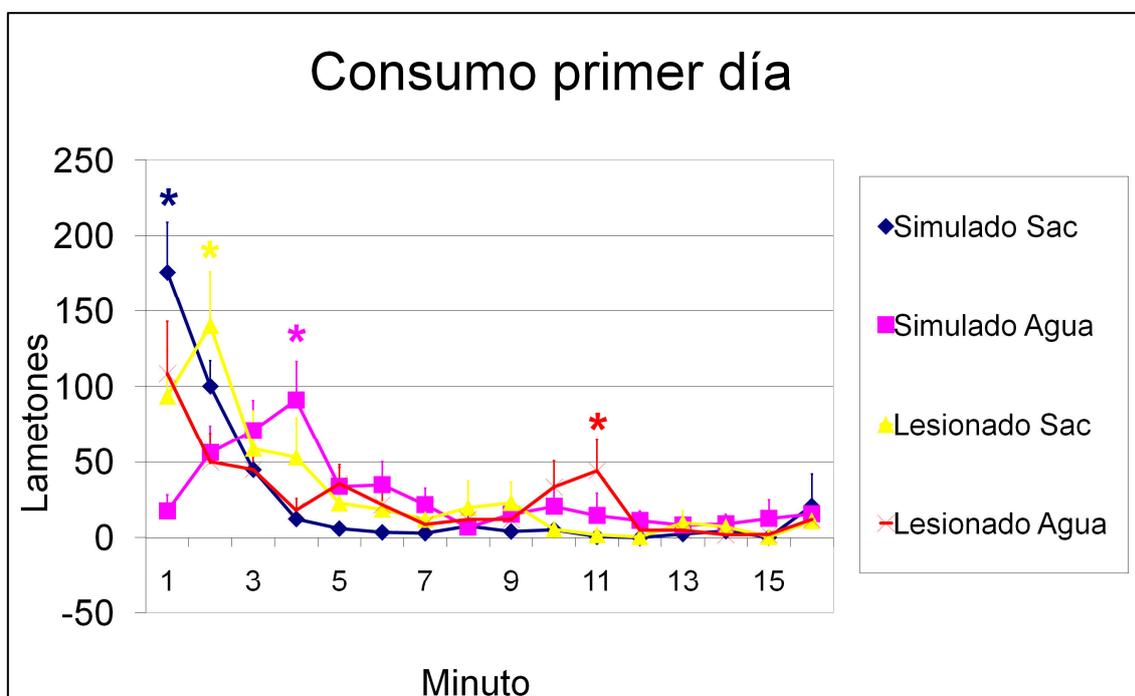
La primera experiencia con la solución de sacarosa (test del día 1) se revelaba crucial para el desarrollo de la preferencia que aparecía el segundo día del test. Por ello quisimos analizar la dinámica de los lametones efectuados en las botellas con agua y sacarosa durante los 15 minutos iniciales del test del primer día para entender porqué en esta primera experiencia no aparecía preferencia por la sacarosa. En primer lugar, para descartar posibles efectos de la lesión sobre el consumo global de líquido en estos primeros 15 minutos, realizamos una ANOVA de dos vías del número total de lametones en ambas botellas en cada minuto utilizando el tiempo (de minuto 1 a minuto 15) como medida repetida y el grupo (SIMULADO frente a LESIONADO) como factor intersujetos. El resultado mostró un efecto significativo del factor "tiempo" ( $F_{1,15} = 19.752$ ;  $p < 0.01$ ) pero no de la interacción "tiempo x grupo" ( $F_{1,15} = 0.619$ ;  $p > 0.6$ ). Podemos concluir, por tanto, que la ingestión global de líquido disminuía de manera significativa a lo largo de los 15 minutos (Fig. 4.7), pero lo hacía de manera similar en ambos grupos.

A continuación estudiamos el desarrollo de la preferencia por sacarosa analizando el número de lametones en cada botella en cada uno de los 15 primeros minutos del test (Fig. 4.8), mediante una ANOVA de tres vías con el líquido (agua o sacarosa) y el tiempo (minutos 1 a 15) como factores intrasujetos y el grupo (SIMULADO frente a



**Figura 4.7** El gráfico muestra la dinámica de consumo total de líquido (sacarosa más agua) representado como el número de lametones (promedio  $\pm$  error standard) en ambos recipientes en los primeros 15 minutos del test de preferencia del primer día, dividido en bloques de 1 minuto. No se observan diferencias significativas entre ambos grupos (SIMULADO y LESIONADO).

LESIONADO) como factor intersujeto. Este análisis reveló un efecto significativo del factor "tiempo" ( $F_{1,15} = 29.752$ ;  $p < 0.01$ ), de la interacción de segundo orden "líquido x tiempo" ( $F_{1,15} = 3.25$ ;  $p < 0.05$ ) y de la interacción de tercer orden "líquido x tiempo x grupo" ( $F_{1,15} = 3.235$ ;  $p < 0.05$ ). Por tanto, los animales no beben igual a lo largo de los 15 minutos, la evolución del consumo no es igual para ambos líquidos, y además esta evolución del consumo de ambos líquidos es diferente entre los animales del grupo LESIONADO y del grupo SIMULADO (Fig. 4.8). De hecho, un análisis post-hoc de la interacción "líquido x tiempo x grupo" usando la comparación por pares (con la corrección de Bonferroni) mostró que ambos líquidos sólo eran consumidos de manera significativamente diferente en el grupo SIMULADO en el primer minuto ( $p < 0.01$ ), en el que los animales consumían más sacarosa, y en el cuarto, en el que se invertía la preferencia y los animales consumían preferentemente agua ( $p < 0.01$ ). Aunque el consumo de agua se mantiene prácticamente el resto del test por encima del consumo de sacarosa, estas diferencias no son significativas (aunque en algún minuto, como el séptimo,  $p = 0.086$ , o el decimosegundo,  $p = 0.058$ , se acercan a serlo). En contraste, en el grupo LESIONADO el número de lametones en la sacarosa y en el agua sólo era significativamente diferente en el segundo minuto, en el que los animales preferían la sacarosa ( $p < 0.05$ ), y el decimoprimer minuto, en el que los animales preferían el agua

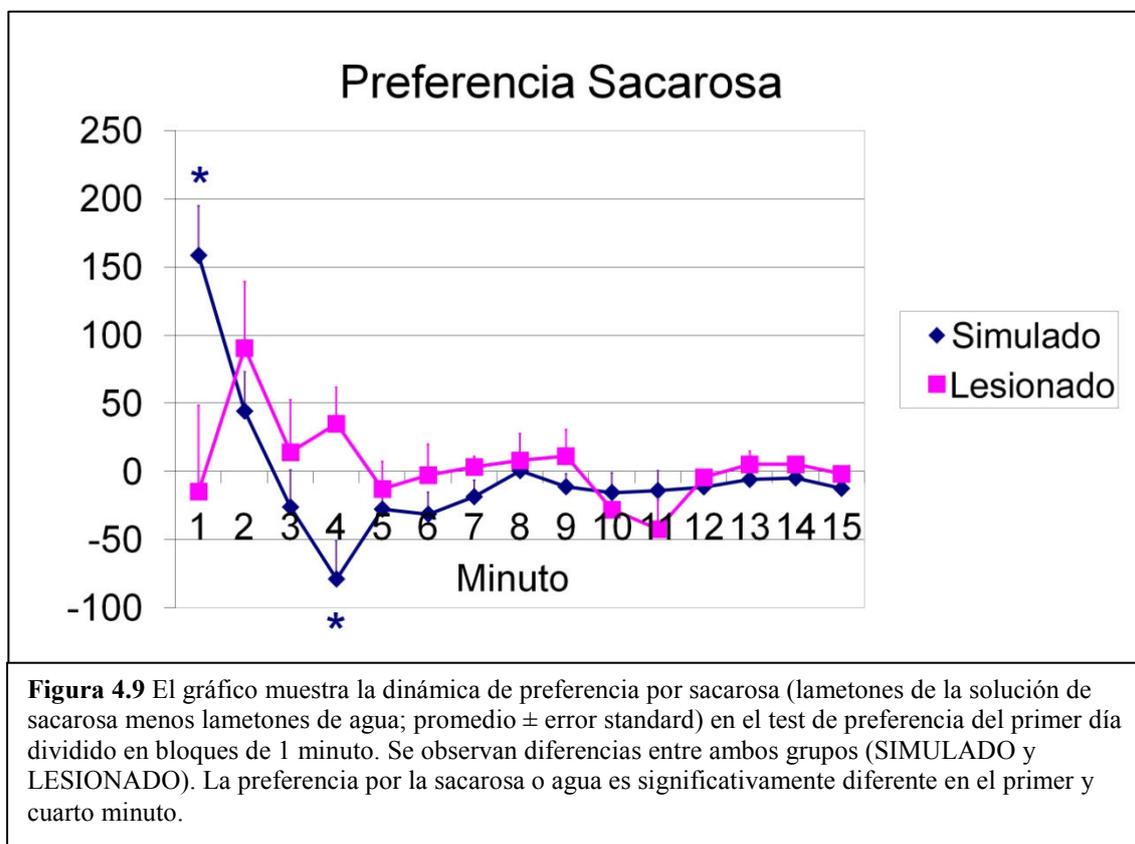


**Figura 4.8** El gráfico muestra la dinámica de consumo de cada líquido representado como el número de lametones (promedio  $\pm$  error standard) en cada recipiente en el test de preferencia dividido en bloques de 1 minuto. Se observan diferencias significativas entre ambos grupos (SIMULADO y LESIONADO). El grupo SIMULADO consume significativamente más de la solución de sacarosa 0.5 M en el primer minuto y agua en el cuarto. El grupo LESIONADO consume significativamente más en el segundo minuto y más agua en el decimoprimer.

( $p < 0.05$ ).

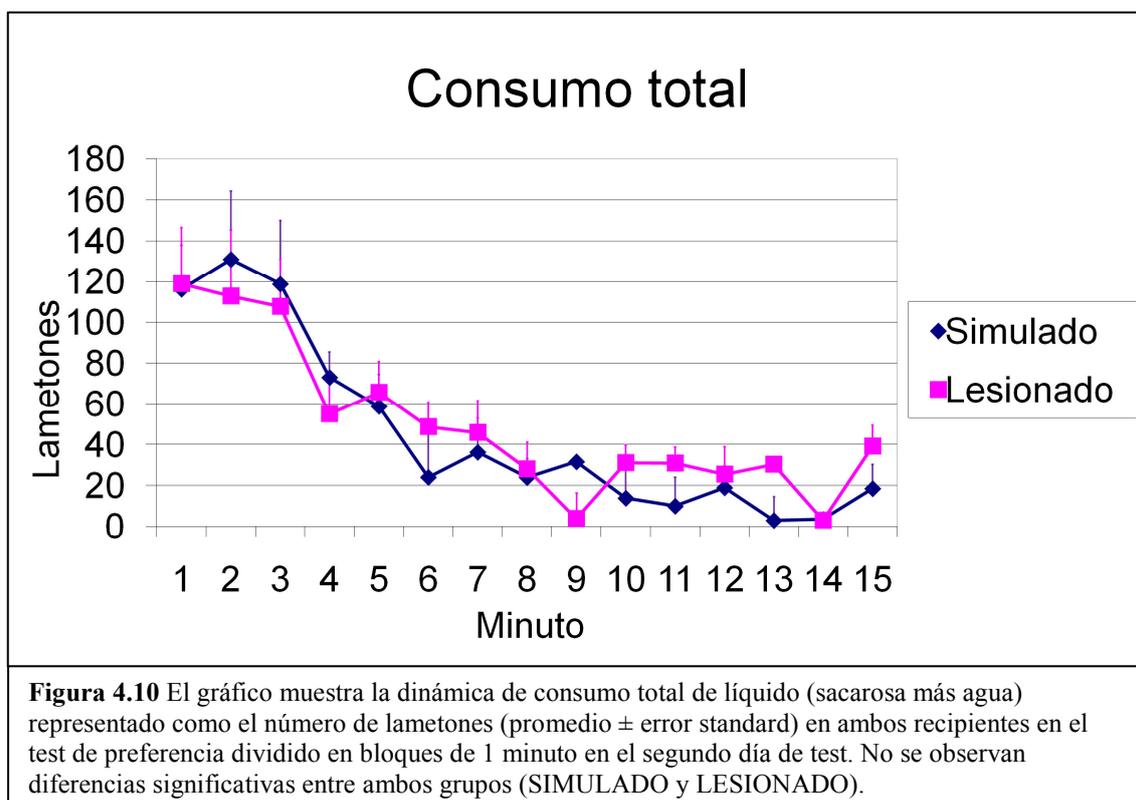
Estos resultados son corroborados por la ANOVA de dos vías del índice de preferencia por sacarosa (lametones de sacarosa menos lametones de agua, Fig. 4.9). Este análisis nos mostró un efecto significativo del factor tiempo ( $F_{1,15} = 3.25$ ;  $p < 0.05$ ), así como de la interacción de segundo orden “tiempo x grupo” ( $F_{1,15} = 3.235$ ;  $p < 0.05$ ). Por tanto, los animales no sólo beben de manera diferente a lo largo de los 15 minutos, sino que este consumo preferente depende del grupo al que pertenezcan. El análisis post-hoc de la interacción “tiempo x grupo” usando la comparación por pares (con la corrección de Bonferroni) mostró que ambos grupos (SIMULADO y LESIONADO) se diferenciaban en el primer ( $p < 0.05$ ) y cuarto minuto ( $p < 0.05$ ). Como se observa en la Fig. 4.9, en el primer minuto del test los animales del grupo SIMULADO expresan una preferencia por sacarosa que no se observa en los animales del grupo LESIONADO. En cambio, en el minuto cuatro los animales del grupo SIMULADO muestran una preferencia por agua, cosa que no ocurre en los animales del grupo LESIONADO.

A continuación estudiamos si estas diferencias entre ambos grupos en la dinámica de preferencia por sacarosa ocurrían también en los primeros 15 minutos del segundo



día del test, en el que como hemos visto ambos grupos mostraban una preferencia robusta por la solución dulce. Al igual que en el análisis de los datos del primer día de test, en primer lugar realizamos una ANOVA de dos vías para el consumo total (suma de lametones en ambas botellas) utilizando el tiempo (minutos 1 a 15) como medida repetida y el grupo (SIMULADO frente a LESIONADO) como factor intersujetos. El resultado mostró un efecto significativo del "tiempo" ( $F_{1,15} = 73.497$ ;  $p < 0.05$ ) pero no del factor grupo ( $F_{1,15} = 0.2$ ;  $p > 0.6$ ) ni de la interacción "tiempo x grupo" ( $F_{1,15} = 1.853$ ;  $p > 0.4$ ), por lo que podemos concluir que la suma de lametones disminuye a lo largo de los 15 minutos y lo hace por igual en ambos grupos (Fig. 4.10).

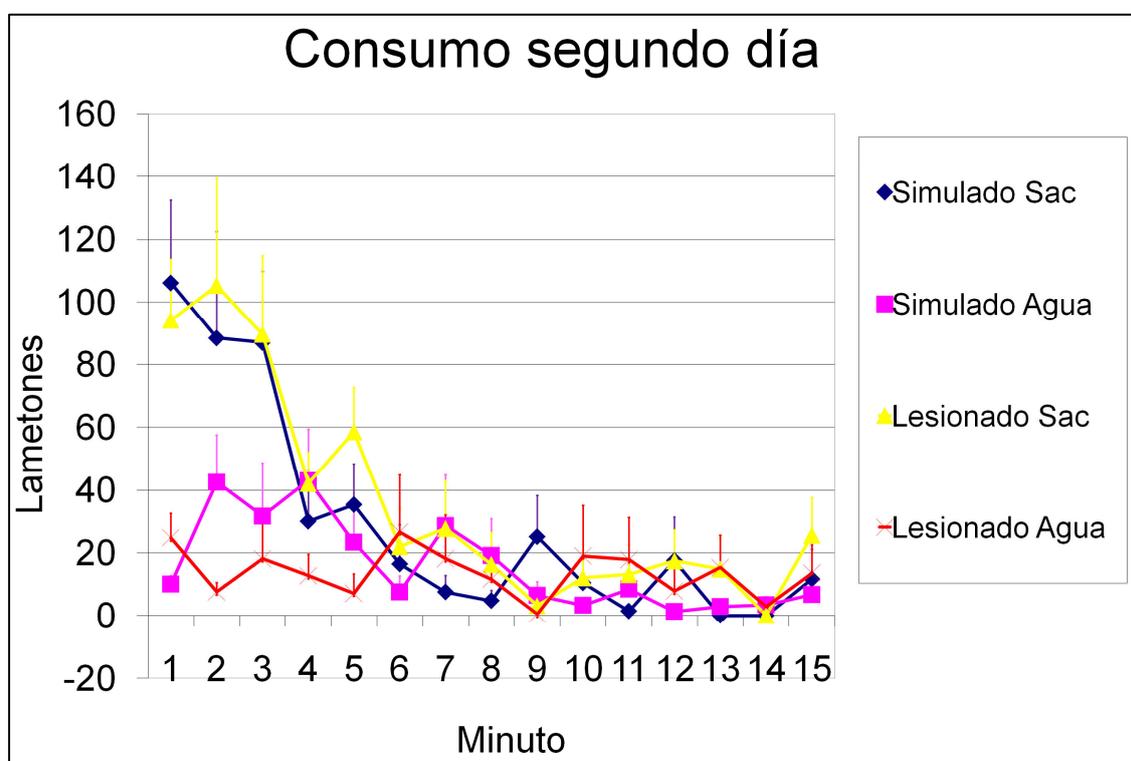
Para analizar el consumo de agua y de sacarosa a lo largo de los primeros 15 minutos del segundo día del test (Fig. 4.11), realizamos una ANOVA de tres vías comparando el número de lametones en cada botella utilizando el líquido (agua o sacarosa) y el tiempo (minuto 1 - minuto 15) como factores intrasujetos y el grupo (SIMULADO frente a LESIONADO) como factor intersujeto. Este análisis reveló un efecto significativo del factor "tiempo" ( $F_{1,15} = 11.5$ ;  $p < 0.01$ ), del factor "líquido" ( $F_{1,15} = 11.425$ ;  $p < 0.01$ ) y de la interacción de segundo orden "líquido x tiempo" ( $F_{1,15} = 5.365$ ;  $p < 0.01$ ) pero no del factor grupo ( $F_{1,15} = 0.71$ ;  $p > 0.4$ ), ni de la interacción de tercer orden "líquido x tiempo x grupo" ( $F_{1,15} = 0.829$ ;  $p > 0.5$ ). Por tanto, en el segundo día del test los animales no beben igual a lo largo de los quince primeros minutos de



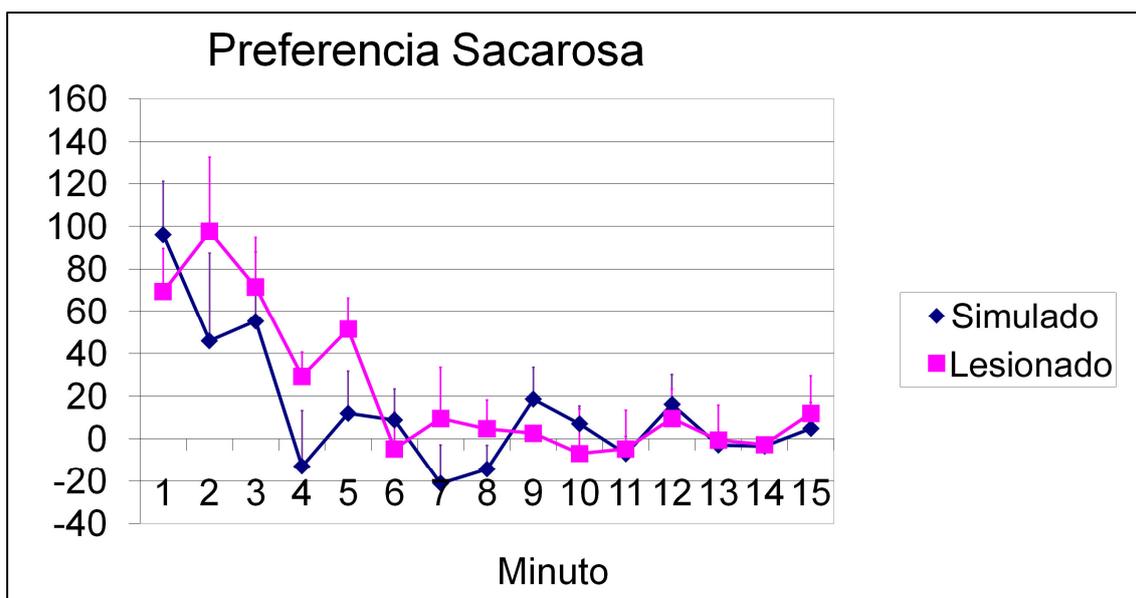
cada uno de los líquidos, pero este efecto no depende del grupo y por tanto de si tienen o no una lesión (Fig. 4.11). El análisis post-hoc de la interacción líquido x tiempo revela que el número de lametones al dispensador de sacarosa sólo es significativamente superior al número de lametones en el dispensador de agua en los 3 primeros minutos del test ( $p < 0.05$  en las tres comparaciones) y en el quinto minuto ( $p < 0.05$ ).

El análisis del índice de preferencia por sacarosa (lametones efectuados en el dispensador de sacarosa menos los efectuados en el dispensador de agua) a lo largo de estos primeros 15 minutos (Fig. 4.12), mediante una ANOVA de dos vías utilizando el tiempo (minuto 1-minuto 15) como medida repetida y el grupo (SIMULADO frente a LESIONADO) como factor intersujetos, nos reveló un efecto significativo del factor "tiempo" ( $F = 5.35$ ;  $p < 0.01$ ; corrección de Greenhouse-Geisser), pero no del grupo ( $F_{1,15} = 0.7$ ;  $p > 0.4$ ) ni de la interacción de segundo orden "tiempo x grupo" ( $F_{1,15} = 1.908$ ;  $p > 0.3$ ). Como se observa en la gráfica (Fig. 4.12), el índice de preferencia desciende a valores próximos a cero a los pocos minutos de comenzar el test, pero lo hace de igual manera en ambos grupos.

Por tanto, ni los animales lesionados ni los animales control muestran una preferencia por la sacarosa el primer día del test, pero los animales de ambos grupos la adquieren por igual de manera que en el segundo día esta preferencia aparece desde el



**Figura 4.11** El gráfico muestra la dinámica de consumo de líquido representado como el número de lametones (promedio  $\pm$  error standard) de cada grupo en cada dispensador en los primeros 15 minutos del test de preferencia del segundo día, dividido en bloques de 1 minuto. No se observan diferencias significativas entre ambos grupos (SIMULADO y LESIONADO).



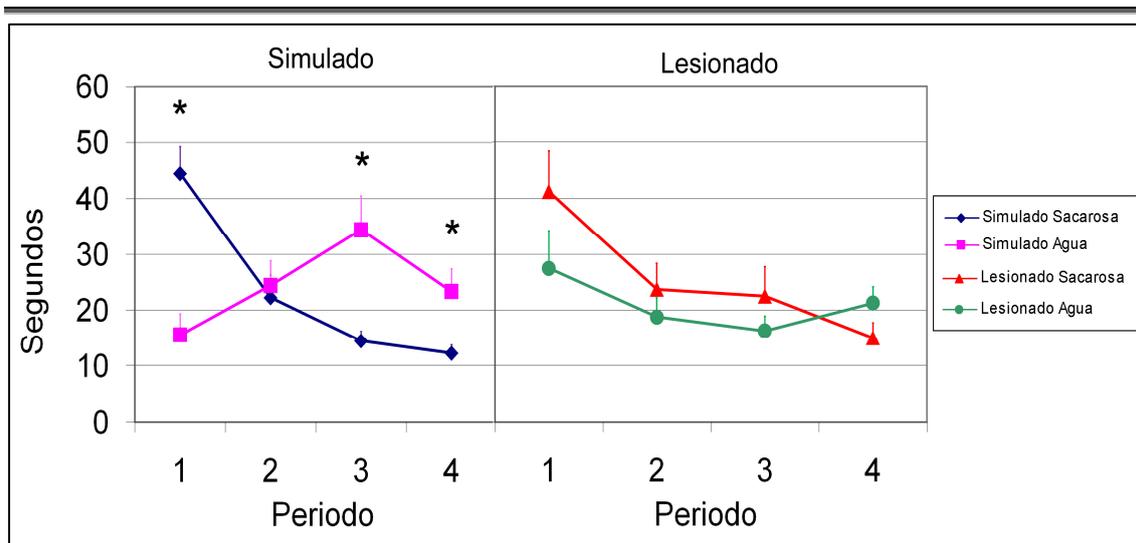
**Figura 4.12** El gráfico muestra la dinámica de preferencia por sacarosa (lametones de la solución de sacarosa menos los lametones de agua; promedio  $\pm$  error standard) de las hembras en los primeros 15 minutos del segundo test de preferencia dividido en bloques de 1minuto. No se observan diferencias significativas entre ambos grupos (SIMULADO y LESIONADO).

primer momento.

#### Dinámica inicial: ¿wanting o liking?

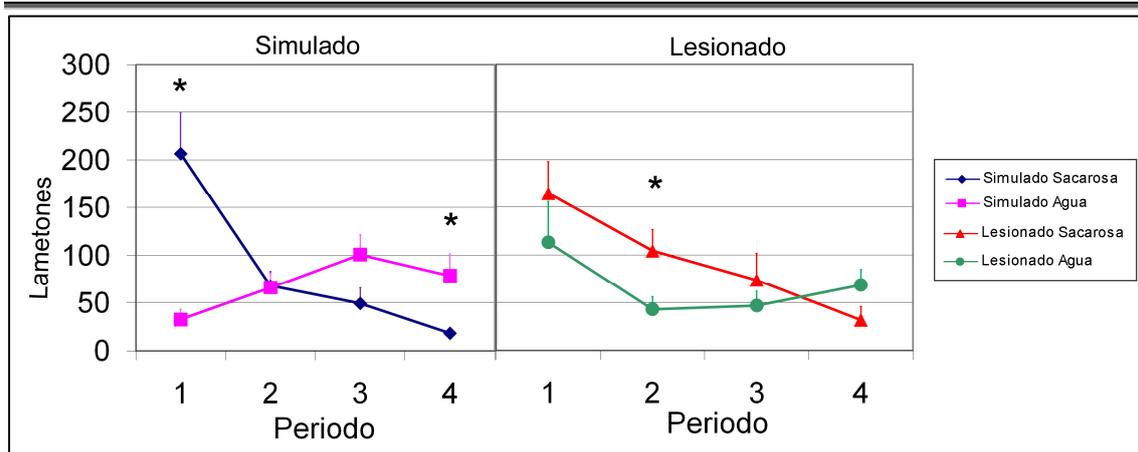
Para comprobar si los efectos de las lesiones pueden interpretarse como déficits en el procesamiento del valor hedónico ("*liking*") de la sacarosa o por el contrario una falta de motivación ("*wanting*") por obtenerla, analizamos en mayor detalle el consumo de sacarosa en los primeros minutos del primer día en los que, en ausencia de experiencia previa, la hedonia contribuye significativamente al refuerzo de la sacarosa, mientras que el desarrollo de la motivación es incipiente. Para ello decidimos cuantificar los periodos de tiempo en los que se observaron lametones continuados (sin interrupción) en la botella de sacarosa o de agua mediante dos variables: por un lado analizamos la duración de los cuatro primeros periodos de lametones ininterrumpidos, y por otro el número de lametones por periodo en estos cuatro primeros periodos. La hipótesis de partida era que la hedonia de la sacarosa comportaría que los animales, que se habrían aproximado a una u otra botella de forma aleatoria, mostrarían una tendencia mayor a continuar bebiendo de la botella cuyo contenido tuviese mayor valor hedónico (sacarosa). Por su parte, a medida que se desarrollara la motivación por la sacarosa, ésta se apreciaría como una mayor frecuencia de lametones.

Para realizar el análisis de la duración media (en segundos) de cada periodo de lametones ininterrumpidos utilizamos una ANOVA de tres vías con el líquido (agua o sacarosa) y el periodo (periodos 1 a 4) como factores intrasujetos y el grupo



**Figura 4.13** El gráfico muestra la duración en segundos (promedio  $\pm$  error standard) de los cuatro primeros periodos en que los animales beben sin interrupción de cada líquido en el primer test de preferencia. En el grupo SIMULADO existen diferencias significativas: en el primer periodo a favor de la sacarosa y en el tercer y cuarto a favor del agua. En el grupo LESIONADO no se observan diferencias significativas entre periodos ni entre el agua y la sacarosa en cada período.

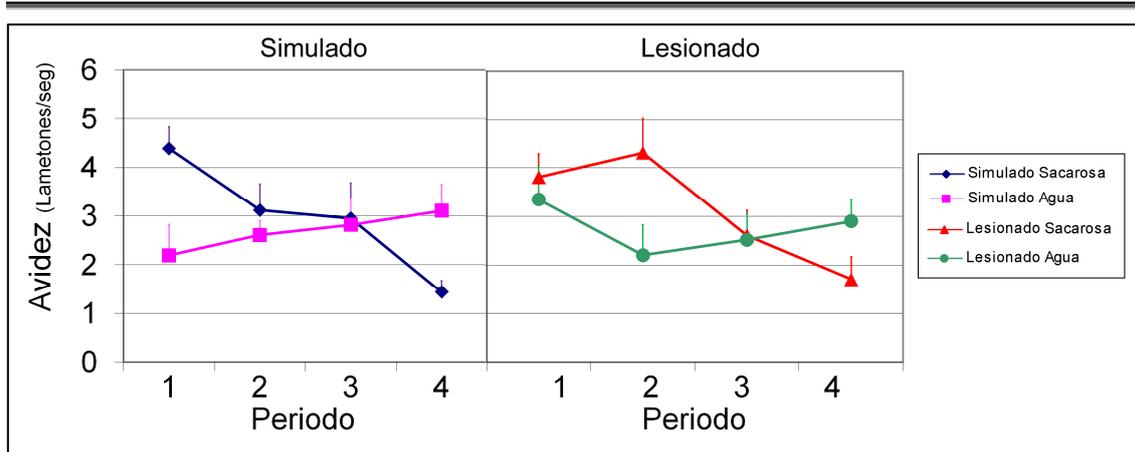
(SIMULADO frente a LESIONADO) como factor intersujetos. Esta ANOVA reveló un efecto significativo del factor "periodo" ( $F_{3,45} = 7.645$ ;  $p < 0.01$ ), de la interacción de segundo orden "líquido x periodo" ( $F_{3,45} = 9.04$ ;  $p < 0.01$ ) y de la interacción de tercer orden "líquido x periodo x grupo" ( $F_{3,45} = 3.43$ ;  $p < 0.05$ ) pero no de los factores grupo ( $F_{1,15} = 0.076$ ;  $p > 0.7$ ) y líquido ( $F_{3,45} = 0.909$ ;  $p > 0.3$ ), ni de las interacciones de segundo orden "periodo x grupo" ( $F_{3,45} = 0.829$ ;  $p > 0.4$ ) ni "líquido x grupo" ( $F_{3,45} = 2.388$ ;  $p > 0.1$ ). Un análisis post-hoc de la interacción "líquido x periodo x grupo" usando la comparación por pares (con la corrección de Bonferroni) mostró que la duración del primer periodo de consumo de sacarosa es significativamente superior a la del primer periodo de consumo de agua en los animales del grupo SIMULADO ( $p < 0.01$ ) pero no en los del grupo LESIONADO ( $p > 0.05$ ) (Fig. 4.13). No se observan diferencias entre grupos en la duración del segundo periodo de consumo, mientras que la duración del tercer y cuarto periodo de consumo de agua es significativamente superior a la duración de los mismos periodos de consumo de sacarosa en los animales del grupo SIMULADO (pasan más tiempo bebiendo de la botella que contiene agua,  $p < 0.05$ ) pero no en los del grupo LESIONADO ( $p > 0.05$ ). Por tanto, mientras que en los animales control la duración de los periodos de consumo varía mucho y muestra diferencias entre la sacarosa y el agua (a favor de la sacarosa en primera instancia y a favor del agua posteriormente), en los animales lesionados la duración de los periodos de consumo de agua y sacarosa no difieren significativamente.



**Figura 4.14** El gráfico muestra el número de lametones (promedio ± error standard) en los cuatro primeros periodos en que los animales beben sin interrupción de cada líquido en el primer test de preferencia. En el grupo SIMULADO existen diferencias significativas: en el primer periodo a favor de la sacarosa y en el cuarto a favor del agua. En el grupo LESIONADO hay diferencia significativa en el segundo periodo a favor de la sacarosa. Hay que resaltar en este grupo el cruce de tendencias ocurre entre el tercer y cuarto periodo, mientras que en el grupo SIMULADO ocurre en el segundo periodo.

El análisis del número de lametones en cada uno de estos periodos lo realizamos mediante una ANOVA de tres vías, comparando el líquido (agua o sacarosa) y el periodo (periodo 1 - periodo 4) como factores intrasujetos y el grupo (SIMULADO frente a LESIONADO) como factor intersujeto. Este análisis reveló un efecto significativo del factor "periodo" ( $F_{3,45} = 10.158$ ;  $p < 0.01$ ), de la interacción de segundo orden "líquido x periodo" ( $F_{3,45} = 9.312$ ;  $p < 0.01$ ) y de la interacción de tercer orden "líquido x periodo x grupo" ( $F_{3,45} = 4.018$ ;  $p < 0.05$ ) pero no se observó efecto significativo de los factores grupo ( $F_{1,15} = 0.05$ ;  $p > 0.8$ ) ni líquido ( $F_{1,15} = 3.915$ ;  $p > 0.067$ ), ni de las interacciones de segundo orden "periodo x grupo" ( $F_{3,45} = 0.42$ ;  $p > 0.7$ ) ni "líquido x grupo" ( $F_{1,15} = 0.21$ ;  $p > 0.6$ ). Un análisis post-hoc de la interacción "líquido x periodo x grupo" usando la comparación por pares (con la corrección de Bonferroni) mostró que ambos líquidos sólo eran consumidos de manera significativamente diferente en el grupo SIMULADO en el primer periodo ( $p < 0.01$ ), en el que los animales consumían más sacarosa (como ocurría al analizar los minutos sueltos), y en el cuarto, en el que se invertía la preferencia y los animales consumían preferentemente agua ( $p < 0.01$ ) (Fig. 4.14). En contraste, en el grupo LESIONADO el número de lametones en la sacarosa y en el agua sólo era significativamente diferente en el segundo periodo, en el que los animales preferían la sacarosa ( $p < 0.05$ ), y en ninguno de los otros tres periodos llegaba a ser significativamente diferente.

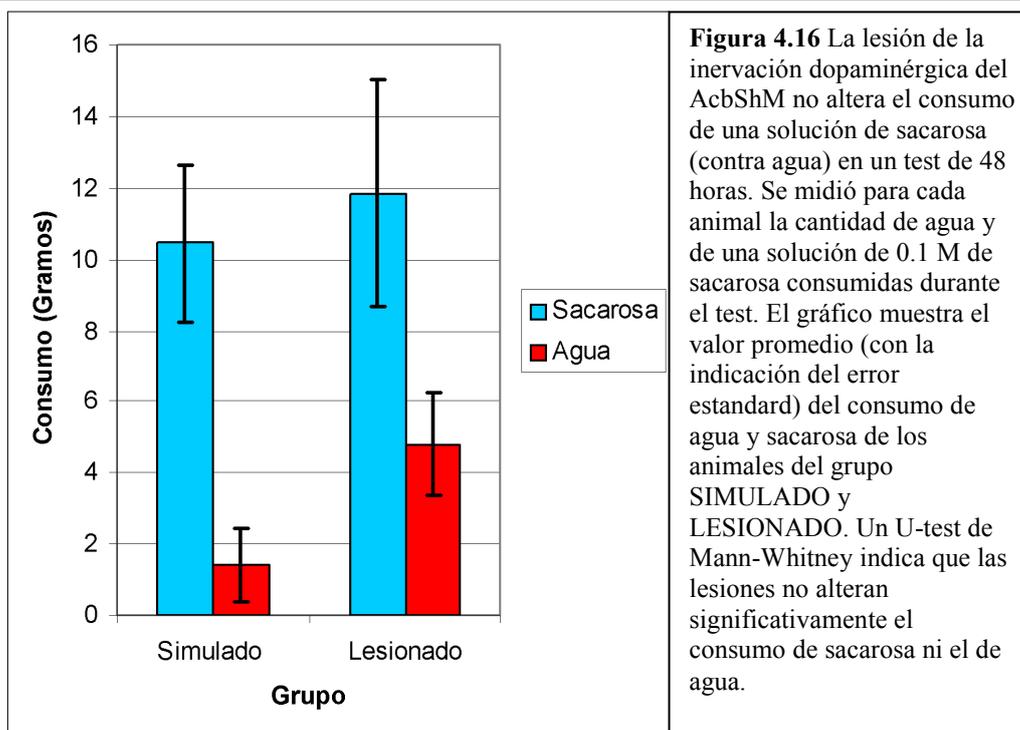
Los análisis de la duración de los periodos de consumo y de los lametones realizados durante estos periodos sugieren que los animales control consumen sacarosa fundamentalmente en los primeros momentos del test y pasan después a consumir



**Figura 4.15** El gráfico muestra la avidez (número de lametones por segundo; promedio  $\pm$  error standard) de los cuatro primeros periodos en que los animales beben sin interrupción de ambos líquidos en el primer test de preferencia. No se observan diferencias significativas entre grupos.

preferentemente agua. En cambio, los animales lesionados consumen sacarosa de manera más homogénea a lo largo de los 4 primeros periodos de consumo. Vistos estos resultados, decidimos analizar la avidez (número de lametones por segundo) con que estos animales beben ambos líquidos en estos periodos, y saber así si la diferencia en el número de lametones por periodo según el líquido y grupo se debe sólo a un mayor tiempo bebiendo de la botella, o si se encuentra también un incremento de la tasa de lametones. Para analizar la avidez utilizamos una ANOVA de tres vías con el líquido (agua o sacarosa) y el periodo (periodos 1 a 4) como factores intrasujetos y el grupo (SIMULADO frente a LESIONADO) como factor intersujeto. Esta ANOVA reveló un efecto significativo del factor "periodo" ( $F_{1,15} = 4.491$ ;  $p < 0.05$ ) y de la interacción de segundo orden "líquido x periodo" ( $F_{3,45} = 6.091$ ;  $p < 0.05$ ), pero no mostró efectos significativos del líquido ( $F_{1,15} = 1.081$ ;  $p > 0.3$ ), ni del grupo ( $F_{1,15} = 0.09$ ;  $p > 0.7$ ) ni de las interacciones de segundo orden "periodo x grupo" ( $F_{3,45} = 0.479$ ;  $p > 0.6$ ) y "líquido x grupo" ( $F_{1,15} = 0.014$ ;  $p > 0.9$ ). De la misma manera, tampoco es significativa la interacción de tercer orden "líquido x periodo x grupo" ( $F_{3,45} = 1.724$ ;  $p > 0.1$ ). Por lo que podemos concluir que la avidez con que beben los animales no es la misma en cada periodo, y varía en función del líquido que están bebiendo, pero no depende si los animales han sufrido una lesión o no (falta de efecto del factor grupo y de las interacciones con este factor) (Fig. 4.15). El análisis de la interacción "líquido x periodo" muestra que los animales de ambos grupos beben con mayor avidez sacarosa durante los dos primeros periodos ( $p < 0.05$ ) mientras que beben con mayor avidez agua en el cuarto periodo ( $p < 0.05$ ).

A continuación las mismas hembras fueron testadas durante 48 horas con acceso libre a dos botellas, conteniendo agua una de ellas y una solución 0.1 M de sacarosa la



**Figura 4.16** La lesión de la innervación dopaminérgica del AcbShM no altera el consumo de una solución de sacarosa (contra agua) en un test de 48 horas. Se midió para cada animal la cantidad de agua y de una solución de 0.1 M de sacarosa consumidas durante el test. El gráfico muestra el valor promedio (con la indicación del error estandar) del consumo de agua y sacarosa de los animales del grupo SIMULADO y LESIONADO. Un U-test de Mann-Whitney indica que las lesiones no alteran significativamente el consumo de sacarosa ni el de agua.

otra (de manera similar a los experimentos de preferencia por sacarosa del Capítulo III). Como los valores de consumo de agua y el índice preferencia (en el grupo SIMULADO) y el consumo total (en el LESIONADO) no siguen una distribución normal usamos un test no paramétrico (test U de Mann-Whitney) para analizar las posibles diferencias entre los grupos SIMULADO y LESIONADO en la preferencia por el sabor dulce. Este test se aplicó al consumo total de líquido (agua más sacarosa), al consumo de sacarosa y de agua, y a la preferencia por la sacarosa (sacarosa menos agua). Los resultados de estos análisis no revelaron ninguna diferencia significativa entre grupos en ninguno de los factores analizados. El consumo de sacarosa ( $U = 35, Z = -0.096, p > 0.9$ ), el consumo total ( $U = 31, Z = -0.481, p > 0.6$ ), y la preferencia por sacarosa ( $U = 30, Z = -0.577, p > 0.5$ ) no resultaron significativamente diferentes, mientras que el consumo de agua se observó una diferencia que no llegó a ser significativa ( $U = 16.5, Z = -1.889, p = 0.059$ ; Fig. 4.16).

## **Discusión**

Se ha postulado que la proyección dopaminérgica tegmento-estriatal forma parte del sistema neural implicado en la expresión de comportamientos apetitivos (dirigidos por la búsqueda de recompensa), como el consumo de comida, el consumo de agua o el sexo (ver Wise & Rompre, 1989). De hecho, tal como observamos en el capítulo III después de las lesiones específicas dopaminérgicas del VTA, también las inyecciones del agente neurotóxico (6-OHDA) en el área periférica medial del núcleo accumbens dieron lugar, en algunos animales, a fenómenos de hipofagia e hipodipsia inmediatamente después de la inyección. Este hecho confirma que las proyecciones dopaminérgicas del VTA específicas al AcbShM, independientemente de otras áreas receptoras de proyecciones del VTA como la amígdala y el cortex prefrontal, participan sustancialmente en el mantenimiento de una conducta normal de alimentación e ingesta de líquidos. Es destacable el hecho de que, pocos días después de la lesión, los animales recuperan el comportamiento de ingesta normal, tanto de alimento sólido como de líquidos, lo que sugiere que existen mecanismos compensatorios que pueden suplir la falta de dopamina en el AcbShM.

### **La atracción innata por feromonas presenta una dinámica lineal y no requiere dopamina en el AcbShM**

El análisis de la actividad locomotora, así como del tiempo total utilizado investigando los recipientes con viruta limpia en el test control post-quirúrgico, muestra que las lesiones no afectan a la capacidad motora del animal ni a la ejecución del comportamiento exploratorio. Esta falta de efecto de la depleción dopaminérgica contrasta con resultados previos que mostraron que las lesiones con 6-OHDA en el Acb reducen la actividad locomotora desarrollada en un ambiente novedoso (Koob *et al.*, 1978), aunque las lesiones de este estudio previo eran substancialmente más grandes que las nuestras. Respecto a la quimioinvestigación preferente de las feromonas de ratones macho, los resultados expuestos indican que los ratones hembra sin ninguna experiencia previa con señales químicas derivadas de machos, con una depleción promedio del 82% de las fibras dopaminérgicas que inervan el área periférica medial del núcleo accumbens (y con una fracción mínima del caudatus putamen afectado) mantienen la preferencia por las feromonas de macho (Fig. 4.2), al igual que ocurría en ratones hembra con lesiones dopaminérgicas del VTA (Martínez-Hernández *et al.*,

2006). Sin embargo, Mitchell & Gratton (1991, 1992) demostraron que señales químicas procedentes de hembras de rata en estro (y no de machos ni hembras ovariectomizadas) provocaban la liberación de DA en el Acb de ratas macho. Esta aparente incongruencia entre experimentos tiene varias posibles explicaciones. Mitchell y Gratton registraban mediante cronoamperometría en el área central del Acb de ratas machos con experiencia, mientras que nosotros realizamos nuestros experimentos con hembras de ratón "químicamente vírgenes" a las que lesionamos específicamente las células DAérgicas del VTA (en el Capítulo III) o las fibras DAérgicas del AcbShM. Además, nuestros resultados no demuestran que la DA no se libere tras la detección de las feromonas sexuales y tenga una función relacionada con el refuerzo en el cerebro normal de un ratón, pero sí demuestran que ésta no es necesaria para la expresión de la atracción innata que las feromonas sexuales ejercen en los individuos.

Al estudiar detenidamente la dinámica de la exploración del sustrato, se observa en todos los casos que la exploración sigue una dinámica lineal con una preferencia por la viruta ensuciada por machos constante durante los 5 minutos del test (Fig. 4.3). Esta dinámica refuerza la idea de que el test de preferencia no está revelando un efecto novedad, puesto que en ese caso la preferencia por feromonas masculinas sería mayor al principio y decaería a medida que pasara el tiempo, como ocurre en los tests de habituación-deshabitación (Baum & Keverne, 2002). Por el contrario, la preferencia por las feromonas se mantiene estable a lo largo de los 5 min, demostrando que el estímulo mantiene su valor atractivo durante todo el período. Este resultado es consistente con la detección de las feromonas sexuales masculinas por el órgano vomeronasal (Halpern, 1987; Keverne, 1999; Martínez-Ricós *et al.*, 2008). A diferencia del sistema olfativo, en el que la sensibilidad a un determinado estímulo va decayendo en el tiempo a medida que las neuronas sensoriales del epitelio olfativo se habitúan (Mashukova *et al.*, 2006), en el órgano vomeronasal no hay habituación sensorial (al menos a corto plazo, Holy *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2003) por lo que las feromonas sexuales son detectadas del mismo modo a lo largo del tiempo. Esta dinámica de exploración sugiere que las feromonas sexuales no provocan un efecto de saciedad en el animal, lo que es razonable puesto que no varían el estado homeostático del animal, como ocurre con otros estímulos apetitivos (como la sacarosa; ver más adelante).

### **La depleción dopaminérgica del AcbShM altera la dinámica de adquisición de preferencia por sacarosa**

En contraposición a la preferencia por feromonas, que como hemos visto aparece desde el primer momento y sigue una dinámica lineal, la preferencia por sacarosa no aparece en el primer día del test, cuando el animal se enfrenta por primera vez a este estímulo reforzante. El análisis del consumo de sacarosa y de agua revela que ambos líquidos se consumen por igual durante el primer día, mientras que el segundo día aparece, en ambos grupos, una robusta preferencia por el líquido azucarado. Ni en la falta de preferencia del primer día ni en la preferencia observada el segundo día aparecen diferencias significativas provocadas por la lesión (Fig. 4.5).

La falta de preferencia por la solución dulce observada en el test del primer día es consistente con los resultados previos obtenidos por diversos laboratorios (Mason *et al.*, 1978; Stewart & Reidinger, 1984; Amico *et al.*, 2005; Minasyan *et al.*, 2007). Esta falta de preferencia es interpretada como un fenómeno de neofobia, fenómeno que ha sido descrito también con otros estímulos (Cigrang *et al.*, 1986; Griebel *et al.*, 1993; Kopp *et al.*, 1999; File, 2001; Pascual & Heinrichs, 2007). Precisamente por ser la sacarosa un estímulo que se ingiere, los roedores presentan un cierto rechazo en la primera experiencia debido a que el sabor es nuevo (Amico *et al.*, 2005). Los ratones carecen del reflejo del vómito (Hatcher, 1924), por lo que la ingesta masiva de un alimento nuevo, potencialmente tóxico podría ser letal al no poder interrumpir su digestión. El mecanismo de neofobia protege al animal de la ingestión excesiva de alimentos nuevos que pueden constituir una amenaza por su potencial toxicidad. Así pues, como consecuencia de la neofobia, los animales consumen una cantidad mínima de nuevos alimentos. Si esta ingesta tuviera efectos perjudiciales para su salud, el animal desarrollaría aversión condicionada por este sabor (Poulton, 1887; Garcia *et al.*, 1955; Garcia *et al.*, 1966; Touzani & Sclafani, 2001). Si, por el contrario, no aparecen efectos tóxicos del alimento nuevo, los efectos post-ingestivos serán reforzantes (Puerto *et al.*, 1976; Touzani & Sclafani, 2001; Touzani & Sclafani, 2002; Zafra *et al.*, 2007) y facilitarán el consumo de ese alimento en el futuro, que quedaría así incorporado a la dieta del animal.

Se ha descrito que en el fenómeno de la neofobia participa el Acb (Burns *et al.*, 1996), puesto que lesiones excitotóxicas (mediante ácido iboténico) del mismo disminuyen la neofobia por un alimento apetecible (queso) ofrecido como alternativa al

pienso habitual. Consistente con estos datos, nuestros resultados muestran que la pérdida de terminales DAérgicos en el AcbShM parece alterar la neofobia (mostrada en el primer día del test) retrasando su aparición hasta que el animal casi se encuentra saciado; pero no la superación de la misma, puesto que el segundo día del test de preferencia por sacarosa ambos grupos presentaron la misma dinámica, una curva asintótica, y un consumo total similar. Por tanto, podemos concluir que en ambos grupos se había aprendido que el sabor dulce de la sacarosa era inocuo sin importar la falta de DA. En el caso de la neofobia por sacarosa, se ha sugerido que una reducción de la misma puede deberse a un descenso en la ansiedad del animal (se ha demostrado que la ansiedad está relacionada con la neofobia, Hall *et al.*, 1997) al enfrentarse a un nuevo sabor, y no a un aumento de la palatabilidad de la sacarosa (Fudge *et al.*, 2006). Este grupo demostró que la alopregnanolona reduce la neofobia a sacarosa en ratas sin privar, provocando el incremento en el número de lametones de una solución de sacarosa 0.3 M hasta niveles normales, a pesar de ser la primera vez que la prueban. Desde el punto de vista neuroquímico, este efecto ansiolítico puede deberse a que la alopregnanolona actúa como modulador de receptor de GABA A, lo que puede ocurrir directamente en las neuronas del Acb. Otros datos refuerzan la relación entre el Acb, la ansiedad y la neofobia derivan del trabajo de Green *et al.* (2006), quienes demostraron que la sobreexpresión de la proteína ICER (*Inducible cAMP Early Repressor*) en el Acb aumentaba las respuestas ansiogénicas disminuyendo el tiempo que los animales pasaban en los brazos abiertos de un laberinto elevado y disminuyendo el consumo de sabores nuevos, tanto líquidos como sólidos. Aunque esta misma sobreexpresión aumenta el consumo de sacarosa frente al grupo control, cuando no es la primera vez que consumen ese sabor.

El análisis de la dinámica de consumo de la sacarosa reveló, por un lado, que el consumo de sacarosa sigue una dinámica muy diferente a la observada en la exploración de feromonas. Por otro lado, la dinámica de consumo de sacarosa también difiere entre el primer y el segundo día del test, y sólo en la primera exposición de los animales a la solución dulce es observable un efecto de las lesiones de los terminales dopaminérgicos del AcbShM.

Al analizar el consumo total de líquido (suma de lametones en ambas botellas) a lo largo de los primeros 15 minutos del test se observa que existen diferencias en el tiempo, puesto que a medida que pasa más tiempo los animales consumen menos, como es lógico que ocurra ya que los animales se sacian, pero no existen diferencias entre

grupos, por lo que podemos descartar efectos debidos a una dificultad motora para beber por parte del grupo lesionado o a un déficit global en el comportamiento de ingesta de líquidos (recuérdese la hipodipsia post-lesión).

Cuando estudiamos la dinámica de la preferencia por la sacarosa, considerando ésta como el consumo de sacarosa menos el consumo de agua, obtenemos de nuevo diferencias en el tiempo, pero esta vez los dos grupos no se comportan igual a lo largo del tiempo. El grupo SIMULADO muestra una clara preferencia por la solución de sacarosa en el primer minuto, preferencia que se pierde rápidamente ya en el segundo minuto, llegando a invertirse en el cuarto minuto apareciendo una preferencia por el agua. Es importante hacer notar en este punto que a partir del quinto minuto se produce un consumo muy bajo (el consumo total por minuto desciende por debajo de los 50 lametones), dificultando así la detección de diferencias entre líquidos. Sin embargo, en el grupo LESIONADO los animales no muestran en el primer minuto diferencias significativas entre ambos líquidos, por lo que al empezar no tienen preferencia por ninguna de las dos botellas. Pero en el segundo minuto cae el consumo por el agua y aumenta el de sacarosa, apareciendo así la una diferencia inicial a favor de la sacarosa, aunque con un ligero retraso. El consumo preferente de sacarosa desciende rápidamente, pero tan sólo se produce una inversión del mismo (preferencia significativa por el agua) en el minuto once.

Los resultados anteriormente descritos sugieren que los animales lesionados desarrollan la preferencia por la sacarosa de manera más lenta que los animales control. En el capítulo anterior hemos discutido la posibilidad de que la preferencia por sacarosa mostrada por los animales deficientes en dopamina analizados por Canon y Palmiter (2003) pudiera deberse a que estos animales, cuando encuentran el dispensador que contiene sacarosa, realizan largos periodos de lametones continuados puesto que encuentran placentero el sabor dulce, y por tanto no mostrarían déficits en la capacidad de procesar el valor hedónico ("*liking*") del sabor dulce. Sin embargo, o bien no aprenden a reconocer la localización del dispensador de sacarosa (déficit en la capacidad de aprendizaje asociado a recompensa), o bien no desarrollan la motivación para acercarse a buscar este dispensador (déficit en motivación para obtener la recompensa).

El análisis de los cuatro primeros periodos ininterrumpidos en los que los animales consumen sacarosa nos confirman las ideas extraídas de la dinámica de consumo y descartan la hipótesis de los largos periodos de lametones de sacarosa. Las primeras

diferencias se establecen en el tiempo que duran estos períodos. Mientras que en los animales del grupo SIMULADO se observa una diferencia inicial a favor del consumo de sacarosa y una rápida inversión a partir del tercer período, los animales del grupo LESIONADO tienen tiempos de consumo ininterrumpidos sin diferencias entre ambos estímulos. En cuanto al número de lametones efectuados en cada período observamos la misma situación que en la dinámica por minutos. Los animales del grupo SIMULADO consumen inicialmente más sacarosa, efectuando un número significativamente mayor en el primer período, pero esta diferencia se acaba invirtiendo en el cuarto período donde los animales realizan un número mayor de lametones al agua. En contraste, en los animales del grupo LESIONADO vemos una diferencia significativa en el segundo período a favor de la sacarosa, el equivalente al primer período pero desplazada en el tiempo, sin que se observe la inversión de preferencia debida a la neofobia, que probablemente no podemos apreciar en el grupo LESIONADO al quedar fuera de la ventana temporal analizada.

Por último, el análisis de la avidez (número de lametones por período) nos muestra que no existen diferencias este parámetro entre ambos grupos. Los dos muestran una avidez diferente en cada período y según de que líquido estén bebiendo, pero no existen diferencias atribuibles a la lesión.

### **Estímulos apetitivos diferentes tienen dinámicas de obtención diferentes**

Las diferencias entre ambos tipos de estímulos quimiosensoriales reforzantes (las feromonas y la sacarosa) se deben probablemente a varios factores. Por un lado, a pesar de que ambos estímulos son apetitivos, tienen una obtención y “consumo” bien diferente. Las feromonas actúan de señalizador de un congénere adulto del otro sexo (Dulac, 2000), lo cual resulta atractivo de manera innata (Moncho-Bogani *et al.*, 2002), y no cambian sustancialmente el estado homeostático del organismo. Además, su exploración se realiza in vitro, el mismo medio en el que viven y están habituadas, y el animal no ha tenido que ser privado de ninguna manera para facilitar su exploración. En cambio, la sacarosa se presenta diluida en agua, por lo que el comportamiento que realmente se estudia es el de ingesta de un líquido de alto valor calórico, el cual depende en gran medida del estado homeostático del animal. Un animal saciado tiene una retroalimentación inhibitoria que hace que deje de beber (Ramsay *et al.*, 1977), ya que continuar haciéndolo puede ser perjudicial para el organismo. Por tanto, el consumo no sólo depende del valor hedónico y el poder atractivo de la sacarosa, sino también del

estado hídrico del animal. De hecho, los animales fueron privados de agua 24 h antes del inicio de la prueba. Esta dependencia del estado homeostático, junto a la inhibición del comportamiento por su propia ejecución (fenómeno de saciedad), hace que el consumo de sacarosa tenga una dinámica muy diferente de la exploración de las feromonas y da como resultado una curva asintótica, con una tasa muy alta de consumo en los primeros momentos, que rápidamente desciende conforme el animal se va saciando, hasta ser casi mínimo a partir de los 15 minutos del tiempo del test (Fig.4.7).

Otra diferencia muy relevante entre las feromonas sexuales y la sacarosa es que las primeras dan lugar a una respuesta innata de atracción, mientras que la segunda da lugar, en la primera experiencia, a una respuesta innata de atracción seguida de una marcada neofobia, como se ha discutido anteriormente.

### **¿Cuál es la función de la dopamina en el AcbShM?**

Como hemos comentado en diversas ocasiones a lo largo de esta tesis, Berridge y Robinson (2003) han propuesto que el refuerzo es un fenómeno psicológico complejo que puede parcelarse en tres componentes que, aunque interrelacionados, pueden modularse independientemente: hedonia (*liking*, gustar), adquisición de motivación (*wanting*, querer o desear) y aprendizaje (asociaciones estímulo-estímulo y estímulo respuesta). Se ha postulado que la dopamina de las vías tegmento-estriatales participa en algunos de estos componentes del refuerzo (Berridge & Robinson, 1998; Spanagel & Weiss, 1999; Schultz, 2002; Wise, 2004, Berridge, 2007) y, como hemos discutido en el Capítulo II el papel de la dopamina en los diferentes componentes del refuerzo podría tener lugar en diferentes vueltas de la espiral tegmento-estriatal. En este sentido, diversos autores sitúan la hedonia al inicio de la espiral (lógicamente, dado que la hedonia es factor causal de los demás componentes del refuerzo) en el AcbShM. Sin embargo, la hedonia parece ser un fenómeno independiente de la DA, y al menos en el caso de la ingesta de soluciones edulcoradas dependiente de opioides. Así Pecina & Berridge (2000) observaron que la microinyección de agonistas de opioides mu en el AcbShM aumenta la expresión facial de hedonia en la rata frente al sabor dulce. Los opiáceos actuarían sobre las interneuronas espinosas GABAérgicas del AcbShM (Kelley *et al.*, 2002) facilitando la hedonia y las expresiones faciales innatas asociadas a la misma.

Por el contrario, hay evidencia que sugiere que la motivación para realizar comportamientos que desembocarán en la obtención de un estímulo reforzante depende

de la neurotransmisión dopaminérgica en el AcbC. Así, los condicionamientos instrumentales (donde el animal necesita realizar algún tipo de acción compleja) desaparecen o se reducen tras lesiones del AcbC. Esto no se debe a una incapacidad para aprender (ya que a veces es dependiente de la dosis) sino que parece deberse a una falta de motivación por obtener el refuerzo (Berridge & Robinson, 1998; Ikemoto & Panksepp, 1999; Wyvell & Berridge, 2000; Kaczmarek & Kiefer, 2000; Alderson *et al.*, 2001a; Dayan & Balleine, 2002).

En este contexto, el hecho de que nuestros ratones lesionados no muestren preferencia por la sacarosa en el primer minuto, ni beban durante más tiempo ni con más avidez la solución de sacarosa en el primer periodo, podría interpretarse como un déficit de “liking”. Sin embargo, si la lesión hubiera disminuido la hedonia del sabor dulce cabría esperar que no apareciera la preferencia posteriormente, o que ésta estuviera claramente disminuida (sin un procesamiento correcto del valor hedónico del estímulo no debería aparecer motivación por obtener el mismo). Por ello, consideramos que nuestros datos avalan la idea de que la transmisión dopaminérgica en el AcbShM no está implicada en la hedonia del sabor dulce.

La comparación de las dinámicas de consumo de ambos grupos revela perfiles similares, pero desplazados en el tiempo (retrasados) en el caso del grupo LESIONADO. Una explicación posible es que los animales lesionados no tengan la misma motivación que los animales control o que tarden más en desarrollarla. De manera consistente con esta idea, Peciña *et al.* (2003) observaron en un ratón hiperdopaminérgico (mutante afuncional del DAT, en el que el tiempo de acción de la DA era hasta un 70% mayor que en sus congéneres silvestres), que aunque los ratones mutantes mostraban el mismo número de respuestas orofaciales placenteras frente a una solución de sacarosa que los animales silvestres (el incremento de neurotransmisión DAérgica no aumentaba el valor hedónico de la sacarosa), en las pruebas para conseguir sacarosa los ratones mutantes hiperdopaminérgicos mostraban mayor motivación por obtener la sacarosa, observable en una menor latencia al aproximarse a la misma, mayor velocidad de carrera en la aproximación y menor número de distracciones. Por ello es posible que el retraso de la dinámica en nuestros animales se deba a las dificultades para adquirir motivación en los primeros momentos debido a un procesado del valor incentivo más lento. El efecto de la lesión en el comportamiento de adquisición de la sacarosa en nuestros experimentos parece ser relativamente menor, probablemente

debido a que esta adquisición es sencilla, no requiere gran esfuerzo, y por lo tanto no es muy sensible a defectos en la motivación.

Dado que el día 2 ya no se observa efecto de las lesiones, y teniendo en cuenta que la disposición de las botellas de agua y sacarosa fue intercambiada, podemos concluir que la depleción de dopamina del AcbShM no afecta al aprendizaje asociado al refuerzo. En efecto, todo sugiere que la asociación del sabor dulce con una de las botellas en el contexto de la caja de test se produce rápidamente en ambos grupos experimentales. Según Schultz (1997, 2001) la liberación de DA en el estriado se produce ante estímulos reforzantes naturales, como la comida y la bebida, en las primeras experiencias con los mismos, mientras que después de un aprendizaje esta liberación de DA se produce previamente, asociada a la detección de estímulos predictores de naturaleza visual, auditiva o somatosensorial, y el estímulo reforzante natural deja de desencadenar liberación de DA. Serían estas secuencias de liberación de DA ante estímulos novedosos reforzantes (o su retención en los estímulos de índole aversiva) las que permitirían la transferencia del valor reforzante a los estímulos predictores, produciéndose así el aprendizaje. En consecuencia, la denervación parcial (extensa, pero no completa) de los terminales DAérgicos del AcbShM provoca que la dinámica del grupo LESIONADO se observe desplazada en el tiempo, ya que la transferencia del valor reforzante del estímulo novedoso (sacarosa) a estímulos predictores pudo darse (al quedar DA) pero necesitó de más tiempo.

Así pues, nuestros datos encajan mejor con la hipótesis de que la función de la DA en el AcbShM esté relacionada con el procesamiento del valor motivacional del reforzante (*wanting*) y la adquisición de la motivación por su consumo.

Esta interpretación no explica porqué, una vez se ha establecido la preferencia por el consumo de sacarosa, ésta se produce igual que en el grupo de animales sin lesionar, resultando en la ausencia de diferencias significativas entre ambos grupos tanto en la dinámica de consumo del segundo día como en el consumo total de sacarosa en 48 horas. Estos resultados parecen contradecir los resultados del Capítulo III, en el que lesiones restringidas a las células DAérgicas de la VTA producen disminuciones en el consumo preferente de sacarosa en un plazo de 48 horas. El hecho de que las diferencias de consumo entre ambos grupos del experimento del capítulo IV desaparezcan en un plazo de 24 horas puede tener dos explicaciones posibles, que son complementarias.

Por un lado, en las 24 horas que pasan entre el primer y el segundo día del test el valor post-ingestivo de la sacarosa consumida puede jugar un papel relevante, actuando

como reforzante (Sclafani, 2004; Wise, 2006). Podría ocurrir que el refuerzo de los efectos postingestivos de la sacarosa fuera independiente de la inervación DAérgica del AcbShM. Sin embargo, de Araujo *et al.* (2008) han descrito mediante microdialisis el aumento de DA en el Acb tras la ingesta de sacarosa en ratones sin la capacidad de detectar el sabor dulce (mutantes  $trpm5^{-/-}$ ). Mientras que los ratones silvestres (no mutantes) desarrollan una preferencia por soluciones dulces y calóricas o edulcoradas sin valor nutritivo, los ratones  $trpm5^{-/-}$  tan solo desarrollan preferencia por la solución calórica, ya que el único efecto que son capaces de detectar es el postingestivo. Desafortunadamente, los autores no muestran el lugar de microdialisis, y lo único que sabemos es que hay un incremento de DA en el estriado ventral, no sabemos si incluyen el AcbShM y si se da en éste el incremento. Además Araujo *et al.* (2008) realizaron sus experimentos con animales deprivados, en los que la ingesta (independiente de su sabor o de su valor calórico) puede resultar reforzante por si misma (Andrews & Horvath, 2008). Se ha observado en animales deprivados un fuerte aumento de la hormona grelina, que es liberada por el estomago. Se sabe que la grelina activa el sistema DAérgico mesolímbico y produce la liberación de DA en el Acb (Abizaid *et al.*, 2006). Por lo que podría ser que este aumento en la DA liberada en el estriado ventral que detectan de Araujo *et al.* (2008) en sus experimentos se deba a la ingesta de líquidos, aunque dejaría por explicar porqué los ratones mutantes  $trpm5^{-/-}$  prefieren las bebidas calóricas.

Por otro lado, es posible que el papel del AcbShM sea relevante en el desarrollo de la motivación cuando el estímulo reforzante es novedoso, pero no cuando ya se ha adquirido experiencia con éste. La experiencia previa haría que jugasen un papel más relevante otras estructuras como el AcbC (véase Discusión general).

En cuanto a los diferentes resultados observados en los tests de 48 horas entre los capítulos III y IV, hay dos diferencias en las condiciones experimentales a tener en cuenta. En primer lugar existe una diferencia de experiencia previa entre ambos grupos de animales lesionados. En los experimentos del Capítulo III los animales probaban por primera vez la sacarosa durante el test de 48 horas, mientras que en el presente experimento los animales ya han pasado por dos sesiones de 1 hora a concentraciones mayores de sacarosa y cuando realizan el test de 48 horas ya está establecida su preferencia. En segundo lugar, la extensión de la lesión es diferente, en el Capítulo III la inyección de 6-OHDA en el VTA causaba en el Acb una falta de terminales DAérgicos más extensa que la obtenida centrandó las lesiones en el AcbShM. Por lo que es posible

que las lesiones en el VTA tengan un efecto mayor o en más de un proceso relacionado con el refuerzo. Ambos factores, la mayor extensión de la lesión (experimentos del Cap. III) y la mayor experiencia previa (experimentos del Cap. IV) pueden explicar que hayamos observado un efecto más notable sobre la preferencia en el test de 48 horas del Cap. III.

## **Bibliografía**

- Abizaid, A., Liu, Z.W., Andrews, Z.B., Shanabrough, M., Borok, E., Elsworth, J.D., Roth, R.H., Sleeman, M.W., Picciotto, M.R., Tschoop, M.H., Gao, X.B. & Horvath, T.L. (2006) Ghrelin modulates the activity and synaptic input organization of midbrain dopamine neurons while promoting appetite. *J. Clin. Invest.*, 116, 3229-3239.
- Alderson, H. L., Jenkins, T.A., Kozak, R., Latimer, M.P. & Winn, P. (2001a) The effects of excitotoxic lesions of the pedunculo-pontine tegmental nucleus on conditioned place preference to 4%, 12% and 20% sucrose solutions. *Brain Res. Bull.*, 56, 599-605.
- Alderson, H. L., Parkinson, J.A., Robbins, T.W. & Everitt, B.J. (2001b) The effects of excitotoxic lesions of the nucleus accumbens core or shell regions on intravenous heroin self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 153, 455-463.
- Amico, J. A., Vollmer, R.R., Cai, H.M., Miedlar, J.A. & Rinaman, L. (2005) Enhanced initial and sustained intake of sucrose solution in mice with an oxytocin gene deletion. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 289, R1798-806.
- Andrews, Z. B. & Horvath, T.L. (2008) Tasteless food reward. *Neuron*, 57, 806-808.
- 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, 324-336.
- Baum, M. J. & Keverne, E.B. (2002) Sex difference in attraction thresholds for volatile odors from male and estrous female mouse urine. *Horm. Behav.*, 41, 213-219.
- Baxter, M. G. & Murray, E.A. (2002) The amygdala and reward. *Nat. Rev. Neurosci.*, 3, 563-573.
- Berridge, K. C. & Robinson, T.E. (1998) What is the role of dopamine in reward: Hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 28, 309-369.
- Berridge, K. C. & Robinson, T.E. (2003) Parsing reward. *Trends Neurosci.*, 26, 507-513.
- Berridge, K. C. (2007) The debate over dopamine's role in reward: The case for incentive salience. *Psychopharmacology (Berl)*, 191, 391-431.
- Burns, L. H., Annett, L., Kelley, A.E., Everitt, B.J. & Robbins, T.W. (1996) Effects of lesions to amygdala, ventral subiculum, medial prefrontal cortex, and nucleus accumbens on the reaction to novelty: Implication for limbic-striatal interactions. *Behav. Neurosci.*, 110, 60-73.

- Cannon, C. M. & Palmiter, R.D. (2003) Reward without dopamine. *J. Neurosci.*, 23, 10827-10831.
- Cigrang, M., Vogel, E. & Misslin, R. (1986) Reduction of neophobia in mice following lesions of the caudate-putamen. *Physiol. Behav.*, 36, 25-28.
- Dayan, P. & Balleine, B.W. (2002) Reward, motivation, and reinforcement learning. *Neuron*, 36, 285-298.
- de Araujo, I. E., Oliveira-Maia, A.J., Sotnikova, T.D., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G., Nicolelis, M.A. & Simon, S.A. (2008) Food reward in the absence of taste receptor signaling. *Neuron*, 57, 930-941.
- Di Chiara, G., Bassareo, V., Fenu, S., De Luca, M.A., Spina, L., Cadoni, C., Acquas, E., Carboni, E., Valentini, V. & Lecca, D. (2004) Dopamine and drug addiction: The nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology*, 47 Suppl 1, 227-241.
- Dulac, C. (2000) Sensory coding of pheromone signals in mammals. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 10, 511-518.
- Everitt, B. J. & Robbins, T.W. (2005) Neural systems of reinforcement for drug addiction: From actions to habits to compulsion 6596. *Nat. Neurosci.*, 8, 1481-1489.
- File, S. E. (2001) Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav. Brain Res.*, 125, 151-157.
- Fudge, M. A., Kavaliers, M. & Ossenkopp, K.P. (2006) Allopregnanolone produces hyperphagia by reducing neophobia without altering food palatability. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 16, 272-280.
- Garcia, J., Ervin, F.R. & Koelling, R.A. (1966) Learning with prolonged delay of reinforcement. *Psychonomic Science.*, Vol 5(3), 121-122.
- Garcia J, Kimeldorf DJ, Koelling RA. (1955) Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science*, 122, 157-158.
- Green, T. A., Alibhai, I.N., Hommel, J.D., DiLeone, R.J., Kumar, A., Theobald, D.E., Neve, R.L. & Nestler, E.J. (2006) Induction of inducible cAMP early repressor expression in nucleus accumbens by stress or amphetamine increases behavioral responses to emotional stimuli. *J. Neurosci.*, 26, 8235-8242.
- Griebel, G., Belzung, C., Misslin, R. & Vogel, E. (1993) The free-exploratory paradigm: An effective method for measuring neophobic behaviour in mice and testing potential neophobia-reducing drugs. *Behav. Pharmacol.*, 4, 637-644.

- Hajnal, A. & Norgren, R. (2001) Accumbens dopamine mechanisms in sucrose intake. *Brain Res.*, 904, 76-84.
- Hall, F. S., Humby, T., Wilkinson, L.S. & Robbins, T.W. (1997) The effects of isolation-rearing on preference by rats for a novel environment. *Physiol. Behav.*, 62, 299-303.
- Halpern, M. (1987) The organization and function of the vomeronasal system. *Annu. Rev. Neurosci.*, 10, 325-362.
- Hatcher, R. A. (1924) The mechanism of vomiting. *Physiol. Rev.*, 4, 479-504.
- Holy, T. E., Dulac, C. & Meister, M. (2000) Responses of vomeronasal neurons to natural stimuli. *Science*, 289, 1569-1572.
- Ikemoto, S. & Panksepp, J. (1999) The role of nucleus accumbens dopamine in motivated behavior: A unifying interpretation with special reference to reward-seeking. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, 31, 6-41.
- Ikemoto, S. (2003) Involvement of the olfactory tubercle in cocaine reward: Intracranial self-administration studies. *J. Neurosci.*, 23, 9305-9311.
- Ikemoto, S., Qin, M. & Liu, Z.H. (2005) The functional divide for primary reinforcement of D-amphetamine lies between the medial and lateral ventral striatum: Is the division of the accumbens core, shell, and olfactory tubercle valid? *J. Neurosci.*, 25, 5061-5065.
- Kaczmarek, H. J. & Kiefer, S.W. (2000) Microinjections of dopaminergic agents in the nucleus accumbens affect ethanol consumption but not palatability. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 66, 307-312.
- Kelley, A. E., Bakshi, V.P., Haber, S.N., Steininger, T.L., Will, M.J. & Zhang, M. (2002) Opioid modulation of taste hedonics within the ventral striatum. *Physiol. Behav.*, 76, 365-377.
- Kelley, A. E. & Berridge, K.C. (2002) The neuroscience of natural rewards: Relevance to addictive drugs. *J. Neurosci.*, 22, 3306-3311.
- Kelley, A. E. (2004) Ventral striatal control of appetitive motivation: Role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 27, 765-776.
- Keverne, E. B. (1999) The vomeronasal organ. *Science*, 286, 716-720.
- Koob, G. F., Riley, S.J., Smith, S.C. & Robbins, T.W. (1978) Effects of 6-hydroxydopamine lesions of the nucleus accumbens septi and olfactory tubercle on feeding, locomotor activity, and amphetamine anorexia in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 92, 917-927.

- Kopp, C., Vogel, E., Rettori, M.C., Delagrangé, P., Guardiola-Lemaitre, B. & Misslin, R. (1999) Effects of melatonin on neophobic responses in different strains of mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 63, 521-526.
- Luo, M., Fee, M.S. & Katz, L.C. (2003) Encoding pheromonal signals in the accessory olfactory bulb of behaving mice. *Science*, 299, 1196-1201.
- Martinez-Hernandez, J., Lanuza, E. & Martinez-Garcia, F. (2006) Selective dopaminergic lesions of the ventral tegmental area impair preference for sucrose but not for male sexual pheromones in female mice. *Eur. J. Neurosci.*, 24, 885-893.
- Martinez-Ricos, J., Agustin-Pavon, C., Lanuza, E. & Martinez-Garcia, F. (2007) Intraspecific communication through chemical signals in female mice: Reinforcing properties of involatile male sexual pheromones. *Chem. Senses*, 32, 139-148.
- Martinez-Ricos, J., Agustin-Pavon, C., Lanuza, E. & Martinez-Garcia, F. (2008) Role of the vomeronasal system in intersexual attraction in female mice. *Neuroscience*, 153, 383-395.
- Mashukova, A., Spehr, M., Hatt, H. & Neuhaus, E.M. (2006) Beta-arrestin2-mediated internalization of mammalian odorant receptors. *J. Neurosci.*, 26, 9902-9912.
- Mason, S. T., Roberts, D.C. & Fibiger, H.C. (1978) Noradrenaline and neophobia. *Physiol. Behav.*, 21, 353-361.
- Minasyan, A., Keisala, T., Lou, Y.R., Kalueff, A.V. & Tuohimaa, P. (2007) Neophobia, sensory and cognitive functions, and hedonic responses in vitamin D receptor mutant mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 104, 274-280.
- Mitchell, J. B. & Gratton, A. (1991) Opioid modulation and sensitization of dopamine release elicited by sexually relevant stimuli: A high speed chronoamperometric study in freely behaving rats. *Brain Res.*, 551, 20-27.
- Mitchell, J. B. & Gratton, A. (1992) Mesolimbic dopamine release elicited by activation of the accessory olfactory system: A high speed chronoamperometric study. *Neurosci. Lett.*, 140, 81-84.
- Moncho-Bogani, J., Lanuza, E., Hernandez, A., Novejarque, A. & Martinez-Garcia, F. (2002) Attractive properties of sexual pheromones in mice. innate or learned? *Physiol. Behav.*, 77, 167-176.
- Norgren, R., Hajnal, A. & Mungarndee, S.S. (2006) Gustatory reward and the nucleus accumbens. *Physiol. Behav.*, 89, 531-535.

- Pascual, J. & Heinrichs, S.C. (2007) Olfactory neophobia and seizure susceptibility phenotypes in an animal model of epilepsy are normalized by impairment of brain corticotropin releasing factor. *Epilepsia*, 48, 827-833.
- Paxinos, G. & Franklin, K. B. J. (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.
- Pecina, S. & Berridge, K.C. (2000) Opioid site in nucleus accumbens shell mediates eating and hedonic 'liking' for food: Map based on microinjection fos plumes 6602. *Brain Res.*, 863, 71-86.
- Pecina, S., Cagniard, B., Berridge, K.C., Aldridge, J.W. & Zhuang, X. (2003) Hyperdopaminergic mutant mice have higher "wanting" but not "liking" for sweet rewards. *J. Neurosci.*, 23, 9395-9402.
- Poulton, E. B. (1887) The experimental proof of the protective value of colours and markings in insects. *Proc. Zool. Soc.*, 1887: 191-274.
- Puerto A, Deutsch JA, Molina F, Roll P. (1976) Rapid rewarding effects of intragastric injections. *Behav Biol*, 18, 123-134.
- Ramsay, D. J., Rolls, B.J. & Wood, R.J. (1977) Body fluid changes which influence drinking in the water deprived rat. *J. Physiol.*, 266, 453-469.
- Salamone, J. D. (2007) Functions of mesolimbic dopamine: Changing concepts and shifting paradigms. *Psychopharmacology (Berl)*, 191, 389.
- Salamone, J. D., Correa, M., Farrar, A. & Mingote, S.M. (2007) Effort-related functions of nucleus accumbens dopamine and associated forebrain circuits. *Psychopharmacology (Berl)*, 191, 461-482.
- Schultz, W. (1997) Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 7, 191-197.
- Schultz, W. (2001) Reward signaling by dopamine neurons. *Neuroscientist*, 7, 293-302.
- Schultz, W. (2002) Getting formal with dopamine and reward. *Neuron*, 36, 241-263.
- Schultz, W. (2007) Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu. Rev. Neurosci.*, 30, 259-288.
- Sclafani, A. (2004) Oral and postoral determinants of food reward. *Physiol. Behav.*, 81, 773-779.
- Shimura, T., Kamada, Y. & Yamamoto, T. (2002) Ventral tegmental lesions reduce overconsumption of normally preferred taste fluid in rats. *Behav. Brain Res.*, 134, 123-130.

- Spanagel, R. & Weiss, F. (1999) The dopamine hypothesis of reward: Past and current status. *Trends Neurosci.*, 22, 521-527.
- Stewart, C. N. & Reidinger, R.F., Jr (1984) Disparity between formation of conditioned flavor aversions and neophobia during grooming in rats and mice. *Physiol. Behav.*, 32, 955-959.
- Touzani, K. & Sclafani, A. (2001) Conditioned flavor preference and aversion: Role of the lateral hypothalamus. *Behav. Neurosci.*, 115, 84-93.
- Touzani, K. & Sclafani, A. (2002) Lateral hypothalamic lesions impair flavour-nutrient and flavour-toxin trace learning in rats. *Eur. J. Neurosci.*, 16, 2425-2433.
- Wise, R. A. (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nat. Rev. Neurosci.*, 5, 483-494.
- Wise, R. A. (2006) The parsing of food reward. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 291, R1234-5.
- Wise, R. A. & Rompre, P.P. (1989) Brain dopamine and reward. *Annu. Rev. Psychol.*, 40, 191-225.
- Wyvell, C. L. & Berridge, K.C. (2000) Intra-accumbens amphetamine increases the conditioned incentive salience of sucrose reward: Enhancement of reward "wanting" without enhanced "liking" or response reinforcement. *J. Neurosci.*, 20, 8122-8130.
- Zaborszky, L., Alheid, G.F., Beinfeld, M.C., Eiden, L.E., Heimer, L. & Palkovits, M. (1985) Cholecystikinin innervation of the ventral striatum: A morphological and radioimmunological study. *Neuroscience*, 14, 427-453.
- Zafra, M. A., Molina, F. & Puerto, A. (2007) Learned flavor preferences induced by intragastric administration of rewarding nutrients: Role of capsaicin-sensitive vagal afferent fibers. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 293, R635-41.
- Zhang, M. & Kelley, A.E. (2000) Enhanced intake of high-fat food following striatal mu-opioid stimulation: Microinjection mapping and fos expression. *Neuroscience*, 99, 267-277



## **Discusión general**



## **Discusión general**

Este trabajo constituye la primera descripción detallada de los sistemas dopaminérgicos del encéfalo del ratón. Por ello, nuestros resultados nos permiten discutir, en primer lugar, las diferencias y similitudes de los sistemas DAérgicos, y en especial la vía tegmento-estriatal, entre los distintos vertebrados. En segundo lugar, el trazado neuroanatómico realizado en el segundo Capítulo de la tesis, nos permitirá analizar la espiral tegmento-estriatal en ratones y en otros mamíferos y discutir su posible función y la de sus componentes, así como la de otras áreas afines que podrían ser incluidas en el sistema cerebral del refuerzo y el comportamiento motivado.

En este contexto, analizaremos las vías por las cuales acceden a este sistema los estímulos que hemos utilizado como apetitivos en nuestros experimentos subsiguientes, a saber, el sabor dulce de la sacarosa y las feromonas sexuales masculinas y discutiremos la posibilidad de que ambos estímulos utilicen mecanismos diferentes de refuerzo. Y finalmente discutiremos los diferentes componentes del refuerzo y el posible papel que la DA de la vía tegmento-estriatal, y otros neurotransmisores, puede jugar en cada uno de ellos, en función de los resultados de nuestros experimentos de lesión de esta vía a diferentes niveles.

### **El sistema tegmento estriatal: un caso de evolución conservadora**

Nuestros resultados acerca de la distribución de TH y DAT confirman que los roedores poseen sistemas DAérgicos muy similares, que por otra parte son muy parecidos a los de los restantes mamíferos estudiados (Smeets & Reiner, 1994; Tillet & Kitahama, 1998; Verney, 1999; Kapsimali *et al.*, 2000). Así, en ratones, como en otros mamíferos, los somas DAérgicos se consideran distribuidos en 17 grupos más o menos bien definidos, de los cuales tres grupos del tegmento del mesencéfalo generan proyecciones ascendentes a centros corticales y subcorticales del telencéfalo. Cabe preguntarse, por tanto, si esta característica es exclusiva de los mamíferos o se encuentra también en otros vertebrados. Esta comparación se ve dificultada por la clasificación artificial de los grupos dopaminérgicos y lo difuso de sus límites (ver Capítulo I) especialmente a nivel hipotalámico. A pesar de ello, se han descrito grupos equivalentes a los diencefálicos en aves (Kiss & Peczely, 1987; Reiner *et al.*, 1994; Kang *et al.*, 2007; Sartsoongnoen *et al.*, 2008), y neuronas DAérgicas a lo largo de todo

el hipotálamo en reptiles (Smeets *et al.*, 1986, 1987; Smeets, 1988; Brauth, 1988) y anfibios (Gonzalez & Smeets, 1991; Gonzalez *et al.*, 1993).

No obstante, los grupos celulares dopaminérgicos mejor estudiados en vertebrados son los que originan la vía tegmento-estriatal. En los años 1980 y 1990 se describió que reptiles y aves compartían con los mamíferos un fuerte *input* DAérgico al estriado desde el tegmento del mesencéfalo. Como en los mamíferos, en reptiles y aves las neuronas DAérgicas tegmentales se agrupan en dos poblaciones, dorsal y ventral (como se puede observar en la SN, donde forman la SNC y SNR), que proyectan al subpallium y existe una proyección de retorno desde el estriado y el pálido al tegmento del mesencéfalo (Smeets, 1991; Russchen *et al.*, 1987; Medina & Reiner, 1995; Parent, 1986). Esta conexión recíproca constituye el esqueleto del circuito de los ganglios basales.

Durante años se pensaba que la aparición de los ganglios basales ocurrió en la transición entre amniotas y anamniotas (Parent, 1986). Sin embargo, Smeets *et al.* (2000) demostraron que los ganglios basales ya existían en anamniotas, con todas las características que los definen, entre ellas el *input* DAérgico desde el mesencéfalo, principalmente desde grupos celulares que serían equivalentes a la VTA y SN. No obstante, en anfibios estas neuronas DAérgicas forman parte de un grupo celular único que se extiende de manera continua rostro-caudalmente a lo largo de la placa basal del diencefalo y mesencéfalo. Esta aparente diferencia en la organización de los grupos DAérgicos entre anfibios y amniotas (fundamentalmente mamíferos) ha sido un fuerte argumento en contra de la homología de estos grupos celulares entre ambos grupos. Sin embargo, la interpretación segmental de la estructura del encéfalo anterior de Puelles (Puelles *et al.*, 1999) permite entender estas aparentes diferencias y sugiere una homología entre los grupos DAérgicos de todos los tetrápodos. El estudio del desarrollo embrionario de los grupos DAérgicos tegmentales indica que éstos no tienen un origen exclusivamente mesencefálico. El grupo A10, por ejemplo, se origina en los prosómeros 1-3, el mesencéfalo y el istmo, y el A9, deriva de al menos tres de ellos (mesencéfalo y prosómeros 1 y 2). En anfibios, el conjunto de células DAérgicas se origina en los tres primeros prosómeros y en el mesencéfalo. Además, durante el desarrollo embrionario de los amniotas y de los anfibios, la aparición de neuronas dopaminérgicas sigue una dinámica similar, siendo las primeras neuronas en diferenciarse las diencefálicas, seguidas por las mesencefálicas. La diferencia entre ambos grupos es que las neuronas mesencefálicas de amniotas aumentan mucho su número y se extienden más en

dirección caudal y lateral, probablemente en relación con al aumento en tamaño de los territorios estriatales que inervan (Smeets *et al.*, 1999).

Así que, como podemos ver, los tres grupos DAérgicos que proyectan desde el mesencéfalo al prosencéfalo están altamente conservados entre los diferentes tetrápodos. El principal cambio ha sido un incremento en el número de neuronas en las aves y los mamíferos, pero en todos los tetrápodos se observan tres grupos celulares con proyecciones similares hacia el telencéfalo. Así observamos, ya en reptiles, que aparece una densa inervación DAérgica de estructuras estriatales como el septum lateral, el OT y el estriado ventral y dorsal (Smeets, 1994). También se observa inervación en el complejo amigdalino, estructura de origen mixto palial y subpalial, tanto en el núcleo amigdalino dorsolateral como, en menor medida, en el núcleo esférico (ver Martínez-García *et al.* 2007; 2008a). Por último, en la corteza de reptiles ya se observa inervación DAérgica en la corteza lateral, que recuerda a la inervación del en paleocortex o corteza piriforme que se observa en ratones y en los demás mamíferos. Por último, se ha sugerido una posible homología entre la inervación DAérgica de los hemisferios cerebrales caudolaterales de las aves (el área temporo-parieto-occipitalis o TPO, parte del nidopalio caudolateral o NCL, y el arcopalio dorsal AD) y la del cortex prefrontal de los mamíferos (Divac & Mogensen, 1985; Divac *et al.*, 1985; Waldmann & Gunturkun, 1993; Wynne & Gunturkun, 1995), puesto que en ambos caso la inervación se origina fundamentalmente de la VTA (grupo A10) (Metzger *et al.*, 1996). Sin embargo, como discutieron en detalle Martínez-García *et al.* (2007), esta propuesta no se sostiene desde el punto de vista topológico: el córtex prefrontal de los mamíferos es un derivado del palio medial y/o dorsal mientras que las estructuras aviares mencionadas (TPO, NCL y AD) son lateropaliales. Por el contrario, los datos conectivos, histoquímicos y embriológicos que el campo dopaminérgico en el TPO, NCL y AD de las aves sería homólogo de la amígdala lateropalial profunda de otros vertebrados, en concreto el núcleo basolateral de la amígdala de los mamíferos (que también en ratones presenta una densa inervación dopaminérgica) y la amígdala dorsolateral de los reptiles (ver Martínez-García *et al.*, 2008).

En conclusión, tanto los grupos celulares del mesencéfalo como la mayoría de sus proyecciones al telencéfalo observadas en los mamíferos, están presentes sin grandes cambios en el encéfalo de los amniotas y, en algunos casos, de los anfibios. Esta evolución conservadora de las vías DAérgicas tegmento-telencefálicas sugiere que estas

vías ejercen una función fundamental en la biología de los organismos, cuya alteración disminuye notablemente la eficacia reproductora haciendo la mutación poco exitosa.

### **Las vías dopamiérgicas y la espiral tegmento-estriado-tegmental**

Como ya discutimos en el Capítulo II, las diferentes partes de la VTA del ratón comparten una serie de aferencias comunes, similares a las descritas anteriormente en la literatura en otras especies de mamíferos (Phillipson, 1979; Oades & Halliday, 1987; Swanson, 1982; Geisler & Zahm, 2005; Del Fava *et al.*, 2007; Ikemoto, 2007). Se trata de aferencias desde diversos centros rombencefálicos, reticulares, talámicos e hipotalámicos que permiten al VTA ejercer un papel como centro integrador de información de diversas naturalezas.

Sin embargo, los datos anatómicos del Capítulo II indican que la vía tegmento-estriatal presenta una organización topográfica mediolateral (Fig. 2.19). Las partes mediales del tegmento proyectan a las partes mediales del estriado y las laterales de la VTA al estriado lateral. Además la proyección de vuelta, la vía estriado-tegmental, también muestra una organización topográfica similar, pero con una cierta divergencia al extenderse más lateralmente de lo que supondría una mera conexión recíproca. De ello se deriva que las vías tegmento-estriado-tegmentales formen en ratones una “espiral” como ocurre en otras especies de mamíferos (Haber *et al.*, 2000; Ikemoto, 2007). Nuestros resultados sugieren que esta espiral incluiría territorios estriatales que previamente no considerados. Así, la VTA y las células adyacentes rostro-medialmente que se extienden en la sustancia gris periacueductal proyectan al septum lateral que puede considerarse el estriado medial (ver Lanuza *et al.*, 2002). Además, nuestros datos indican que la VTA también proyecta sobre la amígdala central, proyección que se originaría en porciones de la VTA caudal y dorsomedial), tal y como ocurre en ratas en donde las neuronas dopaminérgicas de esta proyección parecen situarse dentro de los límites arquitectónicos del núcleo del rafe dorsal y la sustancia gris periacueductal (Hasue and Shammah-Lagnado, 2002).

Como hemos discutido en el Capítulo II, la espiral tegmento-estriado-tegmental permitiría transmitir la estimulación desde las porciones mediales del estriado a las laterales gracias a una proyección estriado-tegmental recíproca inhibitoria y a una proyección descendente no recíproca que activaría porciones más laterales de los grupos tegmentales inhibiendo las interneuronas inhibitorias (por desinhibición; Steffensen *et al.*, 1998; Haber *et al.*, 2000). Con ello, esta espiral conectaría funcionalmente porciones

del estriado que no presentan conexiones anatómicas directas, desde el septum lateral (Risold & Swanson, 1997; Tsukahara & Yamanouchi, 2001) a la amígdala central (Oades & Halliday, 1987; Cardinal *et al.*, 2002), pasando por los territorios estriatales medial y dorsal. A lo largo de esta espiral, la modulación y plasticidad sinápticas mediadas por la DA en el estriado podrían contribuir a los diferentes fenómenos de aprendizaje relacionados con el refuerzo (Haruno & Kawato, 2006). Aunque, como hemos discutido en los Capítulos III y IV la DA no es el agente causal de la hedonia (Berridge 1996, 2000, 2007), hay evidencias de que el AcbShM está implicado en los componentes afectivos del refuerzo relacionados con la hedonia o *liking*. De hecho, se ha observado que la liberación de DA aumentaba sensiblemente en el AcbShM frente a estímulos reforzantes primarios como la comida (Bassareo & DiChiara, 1999) o cocaína (Ito *et al.*, 2000). Curiosamente los estímulos aversivos primarios también provocan el aumento de DA en el AcbSh (Deutch & Cameron, 1992). Por el contrario, los estímulos condicionados no alteran los niveles de DA en el AcbSh pero provocan el aumento de DA en el AcbC (Wilkinson *et al.*, 1998; Bassareo & DiChiara, 1999; Ito *et al.*, 2000), lo que sugiere que el fenómeno de aprendizaje asociativo estímulo-estímulo, por el cual los estímulos predictores del refuerzo se transforman en reforzantes secundarios, ocurre en las primeras vueltas de la espiral, entre el AcbSh y el AcbC.

Nuestros experimentos del Capítulo IV son coherentes con estos resultados. Así nuestros resultados indican que la denervación DAérgica del AcbShM no elimina la hedonia, dado que los animales lesionados acaban por adquirir preferencia por sacarosa frente a agua. No obstante, la dinámica del consumo de una solución azucarada con la que el animal no tenía experiencia previa y la superación de la neofobia que ésta induce, se ven alteradas. Posiblemente la alteración de ambas dinámicas se debe a una alteración en un proceso más global que interviene en ambas como la traslación del valor hedónico a un estado motivacional. Por todo ello, nuestros resultados sugieren que la función de la DA en el AchShM sería la adquisición (mediante un rápido fenómeno de aprendizaje) de motivación hacia estímulos que producen una respuesta hedónica, motivación que, tras su adquisición, sería inducida por los estímulos predictores. Es decir, mediaría el paso de una respuesta afectiva primaria a una motivacional frente a estímulos condicionados predictivos, tal y como sugirieron Cardinal *et al.* (2002).

Como consecuencia de este fenómeno de aprendizaje inicial, el nivel de motivación es suficiente como para desarrollar comportamientos complejos y enérgicos para la obtención del refuerzo. Este segundo fenómeno de aprendizaje asociativo

estímulo-respuesta dependería de la neurotransmisión DAérgica en el siguiente nodo de la espiral, el AcbC (Salamone *et al.*, 2002; Salamone & Correa, 2002; Berridge & Robinson, 2003). De hecho Alderson *et al.* (2001) observaron que tras lesiones excitotóxicas del AcbC los animales disminuían la autoadministración, tras apretar una palanca, de heroína intravenosa. Esto no ocurría con animales lesionados en el AcbSh donde la tasa de autoadministración era similar a los animales con lesión simulada (Sham). Aunque las lesiones del AcbC no consiguieron eliminar el comportamiento, parece que se vio afectado el aprendizaje instrumental, en el que se exige al animal un esfuerzo para conseguir su recompensa. La falta de motivación por realizar el comportamiento podría provocar unas dinámicas de aprendizaje más lentas.

Taha y Fields (2005) han descrito al menos dos tipos de neuronas en el Acb con diferentes patrones de actividad en relación con el refuerzo del sabor dulce. Una población está formada por neuronas inhibitorias que se activan en relación con la iniciación y mantenimiento de los comportamientos consumatorios, mientras que la otra es una población de células excitatorias y codificarían la palatabilidad del reforzante. De acuerdo con Berridge y Robinson (2003) la actividad de las neuronas inhibidoras que responden a la palatabilidad podría estar relacionada con la hedonia, mientras que las excitadoras que se activan con el comportamiento consumatorio podrían estar relacionadas con el *wanting* o motivación. Si la hedonia estuviera relacionada con la actividad de las neuronas del AcbShM como sugieren los datos de (Berridge, 1996, 2000, 2007) y el *wanting* con el AcbC, como sugieren los datos de Salamone (1992, 1994; Salamone *et al.*, 1997, 1999, 2003; Salamone & Correa, 2002) cabría esperar que los dos tipos celulares descritos por Taha y Fields (2005) estuvieran distribuidos diferencialmente en las dos divisiones del Acb. Desgraciadamente los autores no dan datos acerca de la localización de las neuronas que registran en los diferentes territorios del Acb.

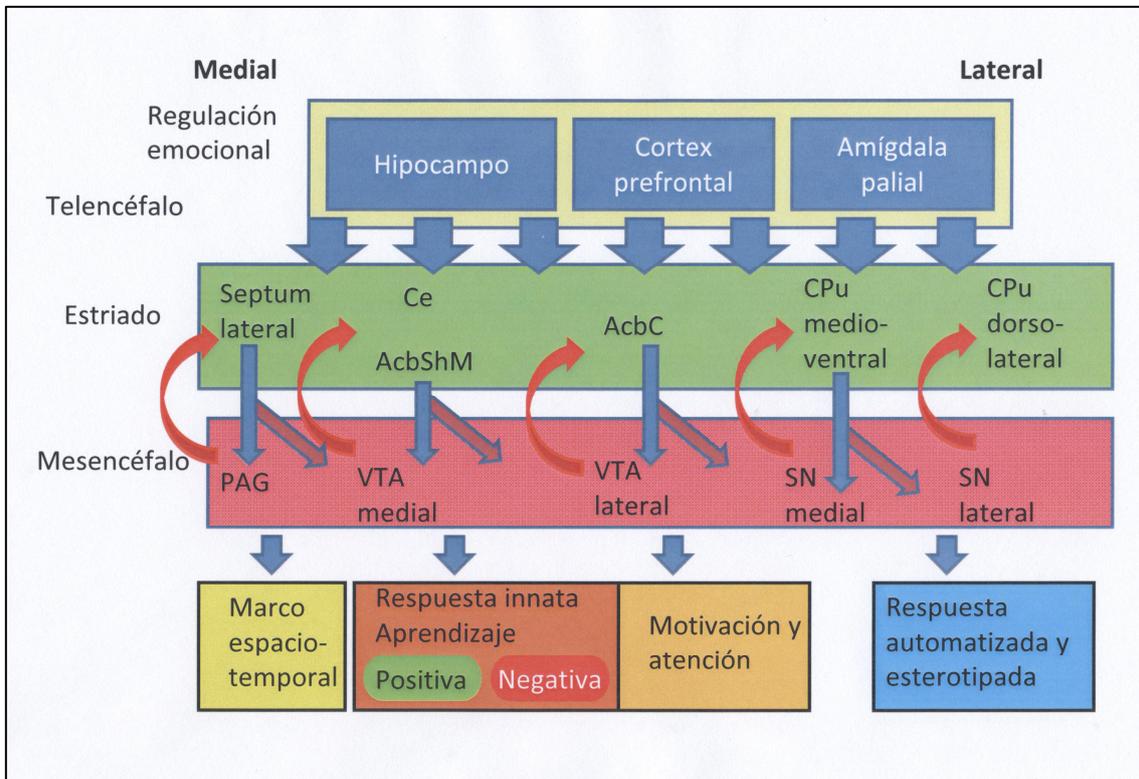
Por último, la espiral concluiría en la parte más lateral del tegmento que proyecta al estriado dorsal caudolateral. Hay evidencia de que esta parte de la espiral está implicada en el desarrollo y ejecución de hábitos, pautas motoras automatizadas o estereotipias (Miller, 1983; Marsden & Obeso, 1994; Jueptner & Weiller, 1998; Canales & Graybiel, 2000; Rebec, 2006). El desarrollo de estas estereotipias permitiría que, ante un estímulo reforzante, el animal mostrara rápidamente una respuesta estereotipada apropiada para aprovechar el estímulo. Este tipo de respuestas es proclive a alteraciones patológicas. Las personas con trastorno obsesivo-compulsivo repiten determinados

comportamientos de forma compulsiva y sienten una necesidad obsesiva de ello, lo que provoca desajustes en numerosos aspectos de su vida social y profesional. Habitualmente estos pacientes son tratados con neurolépticos, antagonistas de la DA (McDougle et al, 1993, 1994; Zohar *et al.*, 2000). El efecto terapéutico de estos medicamentos se atribuye a su acción en el final de la espiral DAérgica tegmento-estriatal, en donde podrían disminuir el refuerzo de aquellos comportamientos que se han automatizado demasiado, produciéndose en contextos inapropiados. En cualquier caso, se ha de tener cuidado con el uso excesivo de neurolépticos, ya que como hemos visto toda la espiral es DAérgica, por lo que con la medicación antiDAérgica posiblemente se altera el funcionamiento del resto de la espiral, lo cual puede provocar, entre otros efectos secundarios, alteraciones de las respuesta emocionales o afectivas (hedonia) y disminuciones de la motivación.

Aunque se conoce la relación de las emociones y el cortex prefrontal desde el siglo XIX (ver Damasio *et al.*, 1994), recientemente, Wager *et al.* (2008) observaron que una porción del cortex prefrontal humano está implicado en la superación (o no) de la aversión a estímulos desagradables (lo que en inglés se denomina *emotional reappraisal*), y que la activación prefrontal durante esta tarea se correlaciona con la activación de partes de la amígdala y del estriado ventral. Para ello, hicieron un estudio con resonancia magnética funcional donde enseñaban a los sujetos una serie de fotos con un valor negativo o neutro. Lo interesante del experimento era que los investigadores pedían que los sujetos regulasen el valor emocional de las imágenes mediante argumentos, aumentándolo o disminuyéndolo. Por ejemplo, ante la foto de un niño llorando (un estímulo negativo) el sujeto podía argumentar que la madre estaba a punto de volver con el niño (disminuyendo así su valor negativo) o que el niño está gravemente enfermo (aumentándolo). Así, observaron que en ambos casos se activaban porciones del cortex prefrontal ventrolateral pero que esta activación se correlacionaba con la de la amígdala cuando se aumentaba negativamente el valor de la imagen o con la del estriado ventral cuando se disminuía el impacto emocional del estímulo.

Este trabajo delimita claramente el esqueleto del cerebro emocional: la corteza prefrontal puede controlar ambos tipos de respuesta emocional, positiva o negativa, que al fin y al cabo son interdependientes (Lebrecht & Badre, 2008). Y lo hace a través de sus conexiones con centros relacionados con el refuerzo (estriado ventral) y con otros que, como la amígdala central, están relacionados con el miedo y la ansiedad (Roosendaal *et al.*, 1991; Campeua & Davis, 1995; Stiedl & Spiess, 1997; Campos &

Montenegro, 1998; Cain & LeDoux, 2008) y el aprendizaje emocional negativo (Beck & Fibiger, 1995; Holahan & White, 2002). En este sentido, nuestros datos revelan que la amígdala central, como el estriado ventral, recibe un *input* DAérgico heterogéneo, del que se ha dicho que está implicado en el aprendizaje emocional negativo (Pezze & Feldon, 2004). Y, lo que resulta más interesante, es que además de recibir terminales DAérgicos relacionados con el miedo, la amígdala central también proyecta de vuelta al tegmento (Oades & Halliday, 1987; Cardinal *et al.*, 2002; ver resultados del Capítulo II). Este patrón de conexiones permite incluir a la amígdala central en la espiral tegmento-estriatal, ya que al fin y al cabo la amígdala central también es de origen estriatal (García-López *et al.*, 2008). Con ello, la espiral dopaminérgica no sólo permitiría evaluar y dar respuesta a estímulos apetitivos mediante la elaboración y automatización de respuestas motoras adecuadas, sino que haría lo mismo con estímulos de naturaleza aversiva. De hecho, el registro electrofisiológico de las neuronas tegmentales indica que responden también a estímulos aversivos (Schultz, 2001) y ya hay quien empieza a plantear como hipótesis que el Acb y sus conexiones pudieran constituir el sustrato neural no sólo de respuestas a estímulos reforzantes sino también a aversivos (Carlezon & Thomas, 2008).



**Figura 5.1.** Esquemas de la espiral tegmento-estriatal, así como de algunos *inputs* relacionados con la regulación emocional y los posibles efectos e implicación de la espiral sobre el comportamiento.

Se dan casos en los que animales sometidos a estrés o estímulos aversivos o amenazantes realizan comportamientos no apropiados (por ejemplo asearse; Hinde, 1970), conocidos como comportamientos de desplazamiento. Estos comportamientos son dependientes de la DA, ya que su expresión es modulada por fármacos agonistas o antagonistas de este neurotransmisor (Guild & Dunn, 1982, Drago *et al.*, 1999). En los años 1960s se describieron casos en los que algunos de estos comportamientos parecían derivarse de respuestas adaptativas. Por ejemplo se condicionaba a un animal para que apretara una palanca para evitar un shock; cuando se cambiaban las condiciones experimentales de forma que el shock se hacía inevitable (el animal lo recibía independientemente de su comportamiento), no se producía extinción: el animal apretaba la palanca de forma compulsiva con una frecuencia mayor cuanto mayor era la intensidad del shock. A estos comportamientos no adaptativos se les llamó comportamientos superticiosos (Domjan & Rowell, 1969). A la luz de los conocimientos actuales, podría argumentarse que se trata de una estereotipia desarrollada frente a un estímulo aversivo, que podría usar los mismos circuitos y mecanismos que las estereotipias provocadas por estímulos apetitivos, que obviamente incluyen las vías dopaminérgicas ascendentes (Castall *et al.*, 1977).

### **Sexo y sabor dulce: ¿Uno o varios sistemas de refuerzo?**

Las feromonas sexuales no son como el sabor dulce: el refuerzo ejercido por ellas no es afectado ni por las lesiones de las neuronas DAérgicas de la VTA ni por la denervación DAérgica del shell del núcleo accumbens. Por el contrario, la preferencia por sacarosa sí que se ve afectada de alguna manera en ambos casos. De hecho, en el Capítulo IV hemos visto cómo la depleción DAérgica en el AcbShM producía una ralentización de la preferencia por la sacarosa y de la aparición y superación de la neofobia, mientras que la preferencia por las feromonas sexuales continuaba intacta. Dado que ambos estímulos son químicos, ¿en qué consiste la diferencia? ¿Son diferencias anatómicas en la entrada de la información desde ambos sistemas sensoriales? ¿Utilizan o requieren diferentes neurotransmisores?

Existe más de un tipo de entrada quimiosensorial al sistema límbico (Fig. 5.2). La información gustativa entra en el sistema nervioso central a través de los nervios craneales VII, IX y X cuyas fibras terminan en el núcleo del tracto solitario (NST, Astrom, 1953; Torvik, 1956). Desde aquí hay una proyección ipsilateral al núcleo pontino parabraquial (PBN, Schwartzbaum & DiLorenzo, 1982; Norgren, 1983) y en él

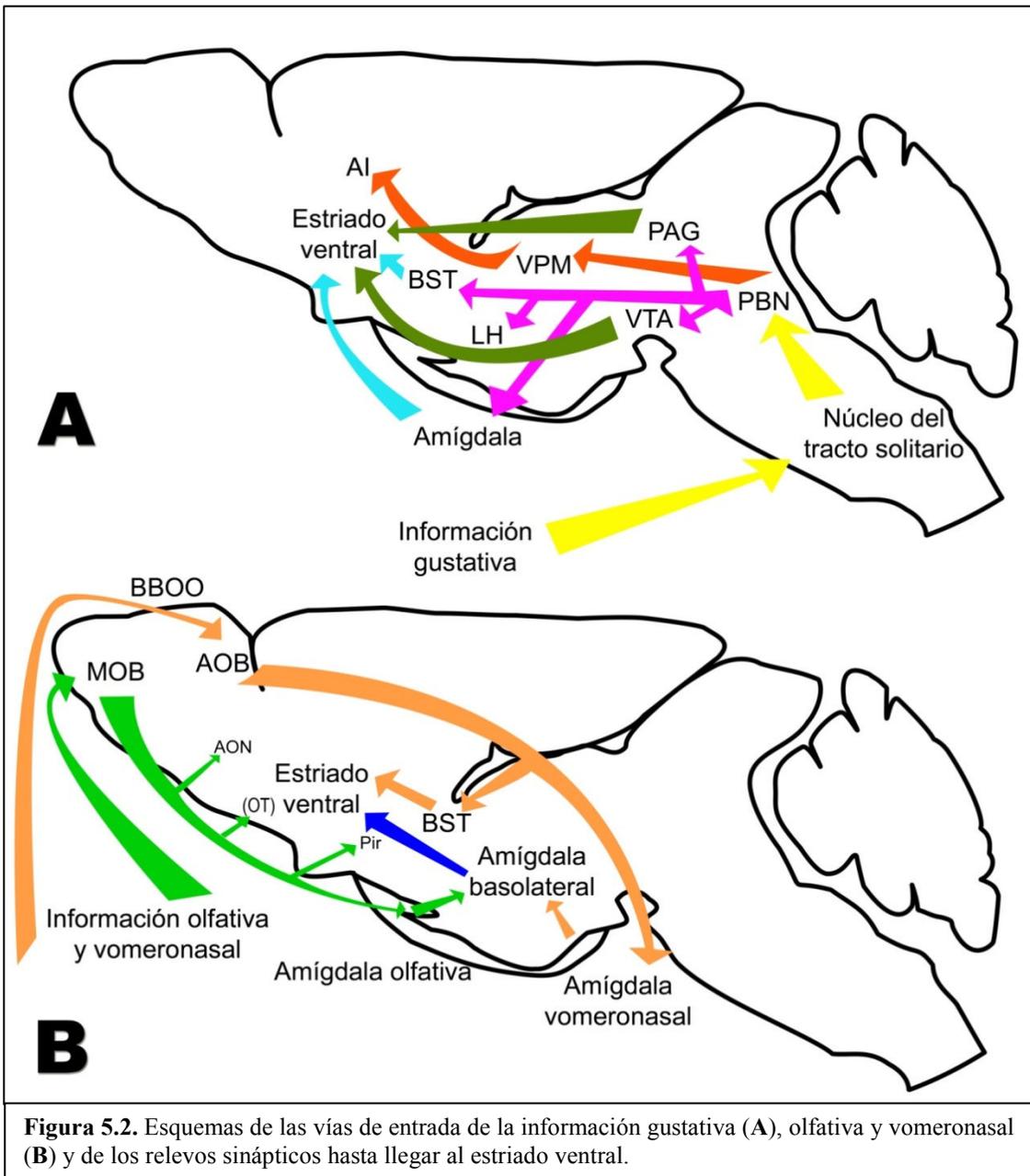
la vía gustativa se bifurca. El PBN proyecta bilateralmente al núcleo gustativo talámico (o núcleo talámico posteromedial ventral, VPM, Norgren, 1983) y desde éste la información llega a la corteza gustativa (o insular, Norgren & Wolf, 1975; Norgren, 1983; Kosar *et al.*, 1986). La otra eferencia del PBN parece menos implicada en el procesamiento de información gustativa (Norgren *et al.*, 2006) pero es anatómicamente más extensa, ya que sus axones alcanzan la PAG, la VTA (ver Capítulo II), el hipotálamo lateral, la amígdala y el BST (Norgren, 1976). Estos centros pueden estar implicados en el procesado del refuerzo.

Norgren *et al.* (2006) observaron la liberación de DA en el Acb tras la ingesta simulada (*sham feeding*) de sacarosa (que evita los posibles efectos reforzantes post-ingestivos relacionados con el valor calórico de la sacarosa). Este efecto es independiente de la integridad de la vía gustativa tálamo-cortical, mientras que queda abolido con lesiones anteriores del núcleo parabraquial. Este hallazgo indica que la liberación de DA en el Acb inducida por la ingesta de sacarosa puede estar mediada por proyecciones del parabraquial sobre los núcleos límbicos como la amígdala o el BST y sus conexiones directas e indirectas con el Acb (Cassell *et al.*, 1999; Groenewegen *et al.*, 1999; Novejarque *et al.*, 2008), a la proyección parabraquial monosináptica sobre la PAG (Norgren, 1976) o sobre la VTA (ver Capítulo II). Por lo tanto, es probable que los estímulos gustativos accedan directamente a la VTA y con ello activen la liberación de DA en el estriado ventral (y en otros centros del telencéfalo) sin utilizar inputs corticales. Esta liberación de DA parece fundamental para el consumo apetitivo (preferente a agua) de soluciones azucaradas. Así, nuestros datos del Capítulo III, junto con los de Shimura *et al.* (2002) indican que lesiones subtotales de la vía tegmento-estriatal reducen el consumo preferente de sacarosa frente a agua. Esto concuerda con los datos de estudios previos usando aproximaciones farmacológicas, de acuerdo con los cuales, los antagonistas de DA tendían a disminuir la ingesta de soluciones dulces (Geary & Smith, 1985; Schneider *et al.*, 1986), mientras que los agonistas incrementaban la ingesta de fluidos independientemente de la palatabilidad, y específicamente la de agua azucarada (Cioli *et al.*, 2000).

Por el contrario, la información relativa a las feromonas sexuales accede directamente al telencéfalo a través de a los bulbos olfativos (BBOO), y después de ese primer relevo la información llega a los diferentes núcleos de la amígdala olfativa (Scalia & Winans, 1975; Shipley *et al.*, 2004) y vomeronasal (Scalia & Winans, 1975; Olmos *et al.*, 1978; Brenan, 2001). Desde la amígdala, la vía continúa hacia el estriado

ventral mediante proyecciones directas e indirectas (Cassell *et al.*, 1999; Groenewegen *et al.*, 1999; Novejarque, 2008; Ubeda-Bañón *et al.*, 2008). Nuestros datos del Capítulo II indican que la amígdala medial anterior, sobre la que convergen proyecciones desde los BBOO principal y accesorio (Pro-Sistiaga *et al.*, 2007), presenta una proyección sustancial a la VTA. En este sentido, se ha comprobado mediante cronoamperometría (Mitchell & Graton, 1992) que estímulos que activan el bulbo olfativo accesorio son capaces de inducir la liberación de DA en el estriado ventral. La vía anatómica que mediaría esta liberación de DA podría ser la que utiliza la amígdala medial y sus proyecciones al tegmento o una vía amígdalo-estriatal directa (capaz de liberar DA en el estriado mediante la activación de los terminales axónicos DAérgicos; Floresco *et al.*, 1998). Sin embargo, nuestros resultados de los Capítulos III y IV indican que la respuesta apetitiva a las feromonas masculinas no se ve afectada por la depleción DAérgica en el AcbSh, lo que sugiere que la liberación de dopamina en el AcbSh mediada por estímulos olfativos o vomeronasales no mediaría las respuestas apetitivas primarias frente a los mismos.

De hecho, además de las diferencias debidas a la anatomía de los *inputs* vomeronasales al sistema del refuerzo, nuestro grupo también ha observado que existen diferencias entre la regulación neuroquímica de los comportamientos apetitivos desencadenados por el sabor dulce y los desencadenados por las feromonas sexuales. Así, las inyecciones sistémicas de antagonistas de D1 y D2 no alteraban la preferencia por feromonas sexuales ni el condicionamiento de lugar inducido por las mismas (Agustin-Pavon *et al.*, 2007). Sin embargo, la inyección sistémica de un agonista para D1 o de un inhibidor de la recaptación de la DA (anfetamina), hacían desaparecer la preferencia por las feromonas. Este efecto de las drogas dopaminérgicas contrasta con el de las mismas drogas sobre los comportamientos apetitivos inducidos por sabor dulce que hemos discutido antes (Geary & Smith, 1985; Schneider *et al.*, 1986; Cioli *et al.*, 2000)



**Figura 5.2.** Esquemas de las vías de entrada de la información gustativa (A), olfativa y vomeronasal (B) y de los relevos sinápticos hasta llegar al estriado ventral.

Además, el estudio del efecto de los opiáceos sobre ambos comportamientos apetitivos refuerza aun más la idea de que sus mecanismos neurales son diferentes. Como hemos explicado anteriormente, los opiáceos no actúan directamente sobre las neuronas DAérgicas, sino sobre interneuronas GABAérgicas. Éstas inhibirían a las neuronas DAérgicas, y al ser ellas inhibidas por los opiáceos, se produciría una activación por desinhibición. Se ha descrito que las neuronas con receptores para opiáceos intervienen en comportamientos tan esenciales como la ingesta, la analgesia y comportamientos sexuales (Bodnar & Klein, 2005). La inyección sistémica de antagonistas de los opiáceos no altera la preferencia por las feromonas sexuales, sin embargo sí que hace desaparecer la preferencia por una solución dulce. Sin embargo, la

inyección sistémica de un agonista para los receptores *mu* de opiáceos sí que hace desaparecer la preferencia por las feromonas sexuales, dejando intacta la preferencia por la sacarosa (Agustin-Pavon *et al.*, 2008). Por lo que parece que ambos comportamientos están regulados por opiáceos de manera diferente y antagónica. Esto concuerda con resultados previos, donde se describió que los opiáceos son necesarios para la hedonia del sabor (Kelley *et al.*, 2002) y más concretamente, se ha observado su implicación en “puntos calientes” del estriado ventral implicados en los efectos hedónicos del sabor dulce (Pecina & Berridge, 2005; Smith & Berridge, 2005). Sin embargo, la inyección sistémica o intracraneal de agonistas de opiáceos disminuyen un gran número de comportamientos relacionados con el sexo, mientras que la inyección de los antagonistas tiene un efecto positivo o ningún efecto (McIntosh *et al.*, 1980; Meyerson, 1981; Wiesner & Moss, 1984; Acosta-Martinez & Etgen, 2002). Por lo que se acepta generalmente que los opiáceos tienen un efecto inhibitorio en el comportamiento sexual (Pfaus & Gorzalka, 1987; Argiolas, 1999).

¿Por que existen estas diferencias en dos estímulos químicos de tal relevancia biológica? Como ya discutimos en el Capítulo IV es muy posible que estímulos diferentes con un significado biológico diferente utilicen o requieran de mecanismos del refuerzo distintos. Los estímulos naturales que hemos utilizado, a pesar de ser ambos de naturaleza química, son bien diferentes. Por un lado las feromonas sexuales masculinas son reforzantes de manera innata para las hembras de ratón (Moncho-Bogani *et al.*, 2002; Martínez-Ricos, 2007) independientemente de su estado hormonal (Moncho-Bogani *et al.*, 2004), actúan como señalizador de un congénere adulto del otro sexo (Dulac, 2000), y su “consumo” no cambia sustancialmente el estado homeostático del organismo.

En cambio, el sabor dulce se relaciona con la ingesta de un líquido de alto valor calórico (en condiciones naturales), y su valor reforzante depende, por tanto, del estado homeostático del animal. Un animal saciado no continúa ingiriendo sacarosa gracias a una retroalimentación inhibitoria que actúa antes de que el animal recupere su homeostasis. Así pues, el consumo de sacarosa depende del estado del animal que determina su valor hedónico y poder reforzante. Por ello, conforme los animales van consumiendo la sacarosa su poder reforzante se devalúa, lo que determina que las curvas de consumo acumulado observadas en el Capítulo IV sean asintóticas. Sin embargo, con las feromonas sexuales no se observa el fenómeno de la saciedad. No cambian el estado homeostático del animal ni, por tanto, hay mecanismos de saciedad

que retroinhiben su valor reforzante, lo que resulta en curvas de consumo acumulado prácticamente lineales. Posiblemente esto se deba a que las feromonas sexuales son tan solo el primer paso de un comportamiento reproductor: aunque para que éste se lleve a cabo es necesario encontrar al congénere y poseer el estado fisiológico apropiado, el refuerzo de las feromonas no depende del estado fisiológico. De hecho, en hembras de ratón la atracción por las feromonas masculinas es independiente incluso del estado hormonal de las hembras, que sin embargo sí que modula otros aspectos de su comportamiento sexual (Moncho-Bogani et al., 2004).

### **Dopamina, motivación y atención**

Como hemos comentado anteriormente el refuerzo se puede dividir en diferentes componentes (Berridge & Robinson, 2003), algunos de los cuales aparentemente dependen de la DA mientras que otros no. Como hemos visto las lesiones DAérgicas o los tratamientos hiperdopaminérgicos (Agustín-Pavón *et al.*, 2007) no parecen alterar la hedonia provocada por feromonas sexuales (ni en general, la relacionada con el comportamiento sexual; ver Paredes y Agmo, 2004) pero tampoco la inducida por el sabor dulce de la sacarosa. De hecho, las amplias lesiones de la VTA descritas en el Capítulo III, provocan una reducción notable del consumo de sacarosa acumulado durante 48 horas, y reducen la preferencia frente a agua, pero aun así, los animales consumen mayor cantidad de sacarosa que de agua. Los resultados del Capítulo IV indican que la denervación DAérgica del AcbShM tampoco elimina la hedonia por la sacarosa. La preferencia tarda más tiempo en desarrollarse, pero el estímulo continúa siendo hedónico dado que los animales lesionados adquieren, con el tiempo, idéntica preferencia por soluciones azucaradas que los sometidos a cirugía simulada.

Esto concuerda con los estudios de Berridge (1996) que muestran que las reacciones orofaciales placenteras ante un estímulo dulce son preservadas aunque el animal haya sufrido una lesión DAérgica o tratamientos farmacológicos antidopaminérgicos. Otro ejemplo de hedonia en ausencia de DA lo aportan los ratones KO para la TH de Canon y Palmiter (2003). Estos animales, a pesar de no ser capaces de sintetizar DA continúan prefiriendo una solución de sacarosa o sacarina frente al agua, pero su dinámica de su consumo varía respecto los animales control, en concordancia con el enlentecimiento de la dinámica de consumo que hemos observado en el Capítulo IV. Como nosotros, los autores interpretan sus resultados como indicadores de que los animales sienten placer consumiendo sacarosa, pero tienen

problemas en trasladar esta información a comportamientos motivados, en este caso conseguir la solución dulce. Esto concuerda con los datos obtenidos con otros ratones transgénicos (Pecina *et al.*, 2003) cuyo transportador de la DA es afuncional de forma que los animales son hiperdopaminérgicos. Al ser introducidos en un laberinto en T al final del cual (en uno de los brazos) había un trozo de azúcar como premio, estos animales aprendían antes a recorrer rápidamente el laberinto, se dirigían más rápidamente al premio (sin entretenerse por el camino) que los animales no mutantes. En otras palabras, estos animales parecían estar más motivados por conseguir el premio, a pesar de que no presentaban mayor “gusto” por la sacarosa, ya que no mostraban la expresividad orofacial de placer alterada.

Estas alteraciones de la motivación inducidas por la manipulación experimental de los sistemas DAérgicos sugieren que la DA está relacionada también con los procesos de atención, que están relacionados con el refuerzo (Carli *et al.*, 1985; Cook *et al.*, 1995; Nieoullon, 2002). Un ejemplo clínico de esta relación es el síndrome de hiperactividad y déficit de atención. Este síndrome, relativamente frecuente en niños, consiste en una dificultad para concentrarse en una sola actividad, de manera que el comportamiento resulta en un sinnúmero de actividades inacabadas, de ahí la hiperactividad. Normalmente, se asocia este síndrome con un déficit o regulación de la DA a la baja y, por ello, se suele tratar con agonistas de la DA (Wender & Reimherr, 1990; Ruskin *et al.*, 2001; Arnsten & Dudley, 2005). Esta terapia farmacológica ayuda a los niños a focalizar y concentrar su atención en una única tarea, disminuyendo su hiperactividad. A pesar de ser un tratamiento efectivo, como ya hemos comentado, altera los niveles de la DA de manera inespecífica en toda la espiral tegmento-estriatal, lo que puede desencadenar efectos indeseados. Un posible peligro del exceso de medicalización puede ser un aumento excesivo de la motivación por tareas concretas, lo que puede llevar a que se desarrollen obsesiones compulsivas, estereotipias o tics.

### **¿De qué depende la hedonia?**

Como ya hemos discutido, los trabajos de los últimos años usando diferentes aproximaciones experimentales han permitido descartar un papel de la DA en la hedonia. Si bien se han elaborado hipótesis nuevas para explicar el papel de la DA en el refuerzo, no existe, hasta donde sabemos, una propuesta sólida de los mecanismos neurales de la hedonia. ¿Se trata de la liberación de alguna otra monoamina que no sea

la DA? ¿Podría estar regulada por opiáceos? ¿O puede que sea la inervación glutamatérgica la que es responsable de la hedonia?

Cualquiera que sea el mecanismo de acción, la hedonia parece depender del Acb aunque sea independiente de la DA en éste núcleo. Peciña y Berridge (2005) observaron que la microinyección de opiáceos en lugares concretos del AcbSh medial (su porción rostro-dorsal), provocaban un aumento de la respuesta hedónica a la sacarosa en ratas. Este descubrimiento ha hecho de los opiáceos buenos candidatos para el control de la hedonia de los estímulos naturales.

Sin embargo, como ya comentamos antes, Agustín-Pavón *et al.* (2008) demostraron que la hedonia provocada por las feromonas sexuales no se debe a los receptores para los opiáceos. La inyección de antagonistas para los opiáceos no altera la preferencia por las feromonas sexuales ni la preferencia condicionada de lugar provocada por estas. Sin embargo, esto no significa que los opiáceos no participen en su regulación, dado que la inyección de agonistas de opiáceos inhibe la preferencia por las feromonas sexuales.

Todos estos datos negativos, nos hacen sugerir un posible mecanismo alternativo de la hedonia. Ésta podría depender de la neurotransmisión glutamatérgica en el estriado ventral debida a la actividad de sus aferencias de origen y naturaleza cortical que controlaría y modularía la respuesta final de las neuronas estriatales. En el caso de las feromonas, la vía implicada sería la proyección desde la corteza vomeronasal al territorio estriatal vecino a los islotes de Calleja magno y rostral-ventromedial, según sugieren los datos anatómicos (Novejarque, 2008), los datos de lesión de estos territorios (Agustín-Pavón, 2008) y de expresión de c-fos (Martínez-Ricós *et al.*, 2009). Y en el caso del sabor dulce de la sacarosa, las vías del refuerzo podrían ser las entradas ascendentes desde el núcleo parabraquial o las vías indirectas desde la corteza insular o desde la propia amígdala.

Sin embargo, esta hipótesis no parece explicar cabalmente el efecto que las alteraciones experimentales de la neurotransmisión DAérgica tienen sobre el refuerzo. Una posible explicación sería en el estriado ventral que la DA modulara la neurotransmisión glutamatérgica. Utilizando preparaciones de rebanadas cerebrales *in vitro* Charara y Grace (2003) observaron que la estimulación eléctrica de las aferencias estriatales desde la amígdala o el hipocampo activa las neuronas del Acb. Sin embargo, la activación del Acb no se produce o se ve muy disminuida en presencia de DA. La DA es capaz de modular la activación ejercida por la liberación de glutamato por parte de

las aferencias amigdalinas e hipocámpicas. El efecto inhibitor sobre las aferencias amigdalinas depende de los receptores de tipo D1 para la DA. Por el contrario, la DA puede tanto potenciar como inhibir la respuesta de las neuronas estriatales a la estimulación hipocámpica. Por lo tanto, los *inputs* glutamatérgicos al estriado ventral son regulados por la DA aunque diferentes inputs muestran diferentes mecanismos de modulación.

Curiosamente, lo contrario también parece ser cierto. Los terminales DAérgicos del estriado ventral también pueden ser activados y modulados por la neurotransmisión glutamatérgica. Los experimentos de Floresco *et al.* (1998, 2001a, 2001b, 2001c) demostraron que mediante la activación de *inputs* corticales como la amígdala o el hipocampo, se conseguía la liberación de DA en el Acb, aunque la actividad neuronal en la VTA hubiese sido previamente inhibida con lidocaína. Parece que los terminales axónicos de las neuronas DAérgicas poseen receptores para el glutamato que pueden provocar la liberación de DA mediante una activación presináptica.

Así pues, tenemos dos sistemas de neurotransmisores que se modifican el uno al otro (West *et al.*, 2003), por lo que ambos han de variar simultáneamente. Es muy posible que esta interdependencia haya contribuido a generar confusión acerca del papel de la DA en el refuerzo, dado que un incremento de la liberación de DA en el estriado ventral inducido por un estímulo gratificante podía ser interpretado como indicador de un papel causal de la DA en la gratificación. Sin embargo, esta liberación podía ser causada en realidad por la liberación de glutamato en el estriado ventral, que sería el verdadero agente causal de la gratificación. Con ello la liberación de DA se sería consecuencia y no causa de la hedonia.

Aunque ambos la liberación de DA y de glutamato sean interdependientes, parece que existen algunos procesos relacionados con el refuerzo que son regulados por el glutamato de manera independiente a la DA (Chiamulera *et al.*, 2001, Tzschentke & Schmidt, 2003). Así, Chiamulera *et al.* (2001) observaron que en un ratón KO para el receptor metabotrópico para el glutamato mGlu5, la cocaína no posee propiedades reforzantes ni aumenta la locomoción. Este déficit no es atribuible a la DA dado que los niveles DA en el estriado en los mutantes eran similares a los de los ratones silvestres. La misma falta de efecto reforzante de la cocaína ocurría si se utilizan antagonistas para el mGlu5 en animales silvestres. Sin embargo, a pesar de no autoadministrarse cocaína, los mutantes apretaban una palanca para conseguir comida. Estos datos indican, por

tanto, que al menos en algunos casos, el refuerzo depende críticamente de la neurotransmisión glutamatérgica.

Gracias a esto, en los últimos años, la estrategia para combatir adicciones se ha centrado en la búsqueda de tratamientos farmacológicos efectivos basándose en estos descubrimientos. Los tratamientos farmacológicos más eficaces para dejar el tabaquismo consisten en antagonistas de los receptores metabotrópicos para el glutamato (Liechti & Markou, 2008) especialmente para el receptor subtipo 5 (Carroll, 2008). Por lo que parece que el mGlu5 parece estar más implicado en las adicciones (Gass & Olive, 2008) que en el refuerzo por sustratos naturales, o al menos ha sido más estudiado en este campo. Recientemente se ha observado que el flujo de salida de información en el estriado es dependiente de los receptores del glutamato NMDA (Pomata *et al.*, 2008), y parece que también participan en la inicialización de comportamientos aprendidos (Graybiel, 1998) y la formación de hábitos en el estriado dorsal (Kelley *et al.*, 2003; Pawlak & Kerr, 2008).

Todos estos datos refuerzan la idea de que la transmisión glutamatérgica en distintos territorios del estriado ventral (y quizás del dorsal) sea la responsable de la hedonia. La DA estaría implicada en procesos de aprendizaje asociados que, a nivel celular, consistirían en la modulación de la neurotransmisión glutamatérgica y, con ello, en la modificación de la respuesta del sistema en sucesivos encuentros con el estímulo reforzante y con los estímulos que lo predicen. La complejidad y plasticidad del sistema se vería beneficiada de complicadas interacciones entre la DA y el glutamato a nivel estriatal, a su vez moduladas por diversos neurotransmisores entre los que se encuentran los opiáceos y el óxido nítrico.

**Bibliografía**

- Acosta-Martinez, M. & Etgen, A.M. (2002) The role of delta-opioid receptors in estrogen facilitation of lordosis behavior. *Behav. Brain Res.*, 136, 93-102.
- Agustin-Pavon, C., Martinez-Ricos, J., Martinez-Garcia, F. & Lanuza, E. (2007) Effects of dopaminergic drugs on innate pheromone-mediated reward in female mice: A new case of dopamine-independent "liking.". *Behav. Neurosci.*, 121, 920-932.
- Agustin-Pavon, C., Martinez-Ricos, J., Martinez-Garcia, F. & Lanuza, E. (2008) Sex versus sweet: Opposite effects of opioid drugs on the reward of sucrose and sexual pheromones. *Behav. Neurosci.*, 122, 416-425.
- Agustin-Pavon, C. (2008) Neuroquímica del refuerzo inducido por feromonas. Tesis Doctoral. Universitat de València.
- Alderson, H. L., Parkinson, J.A., Robbins, T.W. & Everitt, B.J. (2001) The effects of excitotoxic lesions of the nucleus accumbens core or shell regions on intravenous heroin self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 153, 455-463.
- Argiolas, A. (1999) Neuropeptides and sexual behaviour. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 23, 1127-1142.
- Arnsten, A. F. & Dudley, A.G. (2005) Methylphenidate improves prefrontal cortical cognitive function through alpha2 adrenoceptor and dopamine D1 receptor actions: Relevance to therapeutic effects in attention deficit hyperactivity disorder. *Behav. Brain Funct.*, 1, 2.
- Astrom, K. E. (1953) The central course of afferent fibres in the trigeminal, facial, glossopharyngeal and vagal nerves and their nuclei in the mouse. *Acta physiol. scand.*, 29 supply. 106, 209-320.
- Bassareo, V. & Di Chiara, G. (1999) Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell/core compartments 6475. *Neuroscience*, 89, 637-641.
- Beck, C. H. & Fibiger, H.C. (1995) Chronic desipramine alters stress-induced behaviors and regional expression of the immediate early gene, c-fos. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 51, 331-338.
- Berridge, K. C. (1996) Food reward: Brain substrates of wanting and liking. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 20, 1-25.
- Berridge, K. C. (2000) Measuring hedonic impact in animals and infants: Microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 24, 173-198.

- Berridge, K. C. & Robinson, T.E. (2003) Parsing reward. *Trends Neurosci.*, 26, 507-513.
- Berridge, K. C. (2007) The debate over dopamine's role in reward: The case for incentive salience. *Psychopharmacology (Berl)*, 191, 391-431.
- Bodnar, R. J. & Klein, G.E. (2005) Endogenous opiates and behavior: 2004. *Peptides*, 26, 2629-2711.
- Brauth, S. E. (1988) The organization and projections of the paleostriatal complex of caiman crocodilus. *The. Forebrain. of Reptiles.*, , 60-76.
- Brennan, P. A. (2001) The vomeronasal system. *Cell Mol. Life Sci.*, 58, 546-555.
- Cain C K , LeDoux J E (2008) Brain mechanisms of pavlovian and instrumental aversive conditioning. In R.J. Blanchard, C B lanchard, G Griebel & D Nutt (ed), *Handbook of Anxiety and Fear*. Elsevier, .
- Campos, H. A. & Montenegro, M. (1998) Footshock-induced rise of rat blood histamine depends upon the activation of postganglionic sympathetic neurons. *Eur. J. Pharmacol.*, 347, 159-164.
- Canales, J. J. & Graybiel, A.M. (2000) A measure of striatal function predicts motor stereotypy. *Nat. Neurosci.*, 3, 377-383.
- Cannon, C. M. & Palmiter, R.D. (2003) Reward without dopamine. *J. Neurosci.*, 23, 10827-10831.
- Cardinal, R. N., Parkinson, J.A., Hall, J. & Everitt, B.J. (2002) Emotion and motivation: The role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 26, 321-352.
- Carlezon, W. A., Jr. & Thomas, M. (2008) Biological substrates of reward and aversion: A nucleus accumbens activity hypothesis. *Neuropharmacology*, doi:10. 1016/j. neuropharm. 2008. 06. 075.
- Carli, M., Evenden, J.L. & Robbins, T.W. (1985) Depletion of unilateral striatal dopamine impairs initiation of contralateral actions and not sensory attention. *Nature*, 313, 679-682.
- Carroll, F. I. (2008) Antagonists at metabotropic glutamate receptor subtype 5: Structure activity relationships and therapeutic potential for addiction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1141, 221-232.
- Cassell, M. D., Freedman, L.J. & Shi, C. (1999) The intrinsic organization of the central extended amygdala. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 877, 217-241.

- Castall, B., Marsden, C.D., Naylor, R.J. & Pycock, C.J. (1977) Stereotyped behaviour patterns and hyperactivity induced by amphetamine and apomorphine after discrete 6-hydroxydopamine lesions of extrapyramidal and mesolimbic nuclei. *Brain Res.*, 123, 89-111.
- Charara, A. & Grace, A.A. (2003) Dopamine receptor subtypes selectively modulate excitatory afferents from the hippocampus and amygdala to rat nucleus accumbens neurons. *Neuropsychopharmacology*, 28, 1412-1421.
- Chiamulera, C., Epping-Jordan, M.P., Zocchi, A., Marcon, C., Cottiny, C., Tacconi, S., Corsi, M., Orzi, F. & Conquet, F. (2001) Reinforcing and locomotor stimulant effects of cocaine are absent in mGluR5 null mutant mice. *Nat. Neurosci.*, 4, 873-874.
- Cioli, I., Caricati, A. & Nencini, P. (2000) Quinpirole- and amphetamine-induced hyperdipsia: Influence of fluid palatability and behavioral cost. *Behav. Brain Res.*, 109, 9-18.
- Cook, E. H., Jr, Stein, M.A., Krasowski, M.D., Cox, N.J., Olkon, D.M., Kieffer, J.E. & Leventhal, B.L. (1995) Association of attention-deficit disorder and the dopamine transporter gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 56, 993-998.
- Damasio, H., Grabowski, T., Frank, R., Galaburda, A.M. & Damasio, A.R. (1994) The return of phineas gage: Clues about the brain from the skull of a famous patient. *Science*, 264, 1102-1105.
- De Olmos, J., Hardy, H. & Heimer, L. (1978) The afferent connections of the main and the accessory olfactory bulb formations in the rat: An experimental HRP-study. *J. Comp. Neurol.*, 181, 213-244.
- Del-Fava, F., Hasue, R.H., Ferreira, J.G. & Shammah-Lagnado, S.J. (2007) Efferent connections of the rostral linear nucleus of the ventral tegmental area in the rat. *Neuroscience*, 145, 1059-1076.
- Deutch, A. Y. & Cameron, D.S. (1992) Pharmacological characterization of dopamine systems in the nucleus accumbens core and shell. *Neuroscience*, 46, 49-56.
- Dilorenzo, P. M. & Monroe, S. (1992) Corticofugal input to the taste-responsive units in the parabrachial pons. *Brain Res. Bull.*, 29, 925-930.
- Divac, I. & Mogensen, J. (1985) The prefrontal "cortex" in the pigeon catecholamine histofluorescence. *Neuroscience*, 15, 677-682.
- Divac, I., Mogensen, J. & Bjorklund, A. (1985) The prefrontal 'cortex' in the pigeon. biochemical evidence. *Brain Res.*, 332, 365-368.

- Domjan, M. P. & Rowell, J.W. (1969) The effects of escape conditioning and shock intensity on responding during inescapable shock. *J. Exp. Anal. Behav.*, 12, 1045-1048.
- Drago, F., Contarino, A. & Busa, L. (1999) The expression of neuropeptide-induced excessive grooming behavior in dopamine D1 and D2 receptor-deficient mice. *Eur. J. Pharmacol.*, 365, 125-131.
- Dulac, C. (2000) Sensory coding of pheromone signals in mammals. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 10, 511-518.
- Floresco, S. B., Yang, C.R., Phillips, A.G. & Blaha, C.D. (1998) Basolateral amygdala stimulation evokes glutamate receptor-dependent dopamine efflux in the nucleus accumbens of the anaesthetized rat. *Eur. J. Neurosci.*, 10, 1241-1251.
- Floresco, S. B., Blaha, C.D., Yang, C.R. & Phillips, A.G. (2001a) Dopamine D1 and NMDA receptors mediate potentiation of basolateral amygdala-evoked firing of nucleus accumbens neurons. *J. Neurosci.*, 21, 6370-6376.
- Floresco, S. B., Blaha, C.D., Yang, C.R. & Phillips, A.G. (2001b) Modulation of hippocampal and amygdalar-evoked activity of nucleus accumbens neurons by dopamine: Cellular mechanisms of input selection. *J. Neurosci.*, 21, 2851-2860.
- Floresco, S. B., Todd, C.L. & Grace, A.A. (2001c) Glutamatergic afferents from the hippocampus to the nucleus accumbens regulate activity of ventral tegmental area dopamine neurons. *J. Neurosci.*, 21, 4915-4922.
- Garcia-Lopez, M., Abellan, A., Legaz, I., Rubenstein, J.L., Puelles, L. & Medina, L. (2008) Histogenetic compartments of the mouse centromedial and extended amygdala based on gene expression patterns during development. *J. Comp. Neurol.*, 506, 46-74.
- Gass, J. T. & Olive, M.F. (2008) Glutamatergic substrates of drug addiction and alcoholism. *Biochem. Pharmacol.*, 75, 218-265.
- Geary, N. & Smith, G.P. (1985) Pimozide decreases the positive reinforcing effect of sham fed sucrose in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 22, 787-790.
- Geisler, S. & Zahm, D.S. (2005) Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. *J. Comp. Neurol.*, 490, 270-294.
- Gonzalez, A. & Smeets, W.J. (1991) Comparative analysis of dopamine and tyrosine hydroxylase immunoreactivities in the brain of two amphibians, the anuran rana ridibunda and the urodele pleurodeles waltlii. *J. Comp. Neurol.*, 303, 457-477.

- Gonzalez, A., Tuinhof, R. & Smeets, W.J. (1993) Distribution of tyrosine hydroxylase and dopamine immunoreactivities in the brain of the south african clawed frog *xenopus laevis*. *Anat. Embryol. (Berl)*, 187, 193-201.
- Gonzalez, A., Smeets, W.J. & Marin, O. (1999) Evidences for shared features in the organization of the basal ganglia in tetrapods: Studies in amphibians. *Eur. J. Morphol.*, 37, 151-154.
- Graybiel, A. M. (1998) The basal ganglia and chunking of action repertoires. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 70, 119-136.
- Groenewegen, H. J., Wright, C.I., Beijer, A.V. & Voorn, P. (1999) Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 877, 49-63.
- Guild, A. L. & Dunn, A.J. (1982) Dopamine involvement in ACTH-induced grooming behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 17, 31-36.
- Haber, S. N., Fudge, J.L. & McFarland, N.R. (2000) Striatonigrostriatal pathways in primates form an ascending spiral from the shell to the dorsolateral striatum. *J. Neurosci.*, 20, 2369-2382.
- Haruno, M. & Kawato, M. (2006) Heterarchical reinforcement-learning model for integration of multiple cortico-striatal loops: FMRI examination in stimulus-action-reward association learning. *Neural Netw.*, 19, 1242-1254.
- Hasue, R. H. & Shammah-Lagnado, S.J. (2002) Origin of the dopaminergic innervation of the central extended amygdala and accumbens shell: A combined retrograde tracing and immunohistochemical study in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 454, 15-33.
- Hinde, R. A. (1970) *Animal Behaviour*. McGraw-hill, New York.
- Holahan, M. R. & White, N.M. (2002) Conditioned memory modulation, freezing, and avoidance as measures of amygdala-mediated conditioned fear. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 77, 250-275.
- Ikemoto, S. (2007) Dopamine reward circuitry: Two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res. Rev.*, 56, 27-78.
- Ito, R., Dalley, J.W., Howes, S.R., Robbins, T.W. & Everitt, B.J. (2000) Dissociation in conditioned dopamine release in the nucleus accumbens core and shell in response to cocaine cues and during cocaine-seeking behavior in rats. *J. Neurosci.*, 20, 7489-7495.
- Jueptner, M. & Weiller, C. (1998) A review of differences between basal ganglia and cerebellar control of movements as revealed by functional imaging studies. *Brain*, 121, 1437-1449.

- Kang, S. W., Thayananuphat, A., Bakken, T. & El Halawani, M.E. (2007) Dopamine-melatonin neurons in the avian hypothalamus controlling seasonal reproduction. *Neuroscience*, 150, 223-233.
- Kapsimali, M., Vidal, B., Gonzalez, A., Dufour, S. & Vernier, P. (2000) Distribution of the mRNA encoding the four dopamine D1 receptor subtypes in the brain of the european eel (*anguilla anguilla*): Comparative approach to the function of D1 receptors in vertebrates. *J. Comp. Neurol.*, 419, 320-343.
- Kelley, A. E., Bakshi, V.P., Haber, S.N., Steininger, T.L., Will, M.J. & Zhang, M. (2002) Opioid modulation of taste hedonics within the ventral striatum. *Physiol. Behav.*, 76, 365-377.
- Kelley, A. E., Andrzejewski, M.E., Baldwin, A.E., Hernandez, P.J. & Pratt, W.E. (2003) Glutamate-mediated plasticity in corticostriatal networks: Role in adaptive motor learning. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1003, 159-168.
- Kiss, J. Z. & Peczely, P. (1987) Distribution of tyrosine-hydroxylase (TH)-immunoreactive neurons in the diencephalon of the pigeon (*columba livia domestica*). *J. Comp. Neurol.*, 257, 333-346.
- Kosar, E., Grill, H.J. & Norgren, R. (1986) Gustatory cortex in the rat. II. thalamocortical projections. *Brain Res.*, 379, 342-352.
- Lanuza, E., Novejarque, A., Moncho-Bogani, J., Hernandez, A. & Martinez-Garcia, F. (2002) Understanding the basic circuitry of the cerebral hemispheres: The case of lizards and its implications in the evolution of the telencephalon. *Brain Res. Bull.*, 57, 471-473.
- Lebrecht, S. & Badre, D. (2008) Emotional regulation, or: How I learned to stop worrying and love the nucleus accumbens. *Neuron*, 59, 841-843.
- Liechti, M. E. & Markou, A. (2008) Role of the glutamatergic system in nicotine dependence : Implications for the discovery and development of new pharmacological smoking cessation therapies. *CNS Drugs*, 22, 705-724.
- Marsden, C. D. & Obeso, J.A. (1994) The functions of the basal ganglia and the paradox of stereotaxic surgery in parkinson's disease. *Brain*, 117 ( Pt 4), 877-897.
- Martinez-Garcia, F., Novejarque, A. & Lanuza, E. (2007) Evolution of the amygdala in vertebrates. In Kaas, J. H. (ed), *Evolution of Nervous Systems. A Comprehensive Reference*. Elsevier Academic Press, Oxford, pp. 255–334.
- Martinez-Garcia, F., Novejarque, A. & Lanuza, E. (2008) Two interconnected functional systems in the amygdala of amniote vertebrates. *Brain Res. Bull.*, 75, 206-213.

- Martinez-Ricos, J., Agustin-Pavon, C., Lanuza, E. & Martinez-Garcia, F. (2007) Intraspecific communication through chemical signals in female mice: Reinforcing properties of involatile male sexual pheromones. *Chem. Senses*, 32, 139-148.
- Martinez-Ricos, J. (2009) Feromones sexuals: Un nou estímul reforçant en ratolins. Tesis Doctoral. Universitat de València..
- McDougle, C. J., Goodman, W.K. & Price, L.H. (1993) The pharmacotherapy of obsessive-compulsive disorder. *Pharmacopsychiatry*, 26 Suppl 1, 24-29.
- McDougle, C. J., Goodman, W.K. & Price, L.H. (1994) Dopamine antagonists in tic-related and psychotic spectrum obsessive compulsive disorder. *J. Clin. Psychiatry*, 55 Suppl, 24-31.
- McIntosh, T. K., Vallano, M.L. & Barfield, R.J. (1980) Effects of morphine, beta-endorphin and naloxone on catecholamine levels and sexual behavior in the male rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 13, 435-441.
- Medina, L. & Reiner, A. (1995) Neurotransmitter organization and connectivity of the basal ganglia in vertebrates: Implications for the evolution of basal ganglia. *Brain Behav. Evol.*, 46, 235-258.
- Metzger, M., Jiang, S., Wang, J. & Braun, K. (1996) Organization of the dopaminergic innervation of forebrain areas relevant to learning: A combined immunohistochemical/retrograde tracing study in the domestic chick. *J. Comp. Neurol.*, 376, 1-27.
- Meyerson, B. J. (1981) Comparison of the effects of beta-endorphin and morphine on exploratory and socio-sexual behaviour in the male rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 69, 453-463.
- Miller, J. C. (1983) Sex differences in dopaminergic and cholinergic activity and function in the nigro-striatal system of the rat. *Psychoneuroendocrinology*, 8, 225-236.
- Mitchell, J. B. & Gratton, A. (1992) Mesolimbic dopamine release elicited by activation of the accessory olfactory system: A high speed chronoamperometric study. *Neurosci. Lett.*, 140, 81-84.
- Moncho-Bogani, J., Lanuza, E., Hernandez, A., Novejarque, A. & Martinez-Garcia, F. (2002) Attractive properties of sexual pheromones in mice. innate or learned? *Physiol. Behav.*, 77, 167-176.
- Moncho-Bogani, J., Lanuza, E., Lorente, M.J. & Martinez-Garcia, F. (2004) Attraction to male pheromones and sexual behaviour show different regulatory mechanisms in female mice. *Physiol. Behav.*, 81, 427-434.

- Nieoullon, A. (2002) Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Prog. Neurobiol.*, 67, 53-83.
- Norgren, R. & Wolf, G. (1975) Projections of thalamic gustatory and lingual areas in the rat. *Brain Res.*, 92, 123-129.
- Norgren, R. (1976) Taste pathways to hypothalamus and amygdala. *J. Comp. Neurol.*, 166, 17-30.
- Norgren, R. (1983) Afferent interactions of cranial nerves involved in ingestion. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 9, 67-77.
- Norgren, R., Hajnal, A. & Mungarndee, S.S. (2006) Gustatory reward and the nucleus accumbens. *Physiol. Behav.*, 89, 531-535.
- Novejarque, A. (2008) Evolución del cerebro emocional: Análisis comparado de las vías amígdalo-estriatales. Tesis Doctoral. Universitat de València.
- Oades, R. D. & Halliday, G.M. (1987) Ventral tegmental (A10) system: Neurobiology. 1. anatomy and connectivity. *Brain Res.*, 434, 117-165.
- Paredes, R. G. & Agmo, A. (2004) Has dopamine a physiological role in the control of sexual behavior? A critical review of the evidence. *Prog. Neurobiol.*, 73, 179-226.
- Parent, A. (1986) *Comparative Neurobiology of the Basal Ganglia*. John Wiley & Sons.
- Pawlak, V. & Kerr, J.N. (2008) Dopamine receptor activation is required for corticostriatal spike-timing-dependent plasticity. *J. Neurosci.*, 28, 2435-2446.
- Pecina, S., Cagniard, B., Berridge, K.C., Aldridge, J.W. & Zhuang, X. (2003) Hyperdopaminergic mutant mice have higher "wanting" but not "liking" for sweet rewards. *J. Neurosci.*, 23, 9395-9402.
- Pecina, S. & Berridge, K.C. (2005) Hedonic hot spot in nucleus accumbens shell: Where do mu-opioids cause increased hedonic impact of sweetness? *J. Neurosci.*, 25, 11777-11786.
- Pezze, M. A. & Feldon, J. (2004) Mesolimbic dopaminergic pathways in fear conditioning. *Prog. Neurobiol.*, 74, 301-320.
- Phillipson, O. T. (1979) Afferent projections to the ventral tegmental area of tsai and interfascicular nucleus: A horseradish peroxidase study in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 187, 117-144.
- Pomata, P. E., Belluscio, M.A., Riquelme, L.A. & Murer, M.G. (2008) NMDA receptor gating of information flow through the striatum in vivo. *J. Neurosci.*, 28, 13384-13389.

- Pro-Sistiaga, P., Mohedano-Moriano, A., Ubeda-Banon, I., Del Mar Arroyo-Jimenez, M., Marcos, P., Artacho-Perula, E., Crespo, C., Insausti, R. & Martinez-Marcos, A. (2007) Convergence of olfactory and vomeronasal projections in the rat basal telencephalon. *J. Comp. Neurol.*, 504, 346-362.
- Puelles, L. & Rubenstein, L.R. (1993) Expression patterns of homeobox and other putative regulatory genes in the embryonic mouse forebrain suggest a neuromeric organization. *Trends Neurosci.*, 16, 472-479.
- Puelles, L. (1995) A segmental morphological paradigm for understanding vertebrate forebrains. *Brain Behav. Evol.*, 46, 319-337.
- Rebec, G. V. (2006) Behavioral electrophysiology of psychostimulants. *Neuropsychopharmacology*, 31, 2341-2348.
- Reiner, A., Karle, E.J., Andersn, K.D. & Medina, L. (1994) Catecholaminergic perikarya and fibers in the avian nervous system. Phylogeny. and. Development of Catecholamine. Systems. in the. CNS. of Vertebrates., , 135-181.
- Risold, P. Y. & Swanson, L.W. (1997) Chemoarchitecture of the rat lateral septal nucleus. *Brain Res. Brain Res. Rev.*, %19;24, 91-113.
- Russchen, F. T., Smeets, W.J.A.J. & Hoogland, P.V. (1987) Histochemical identification of pallidal and striatal structures in the lizard gekko gekko: Evidence for compartmentalization. *J. Comp. Neurol.*, 256, 329-341.
- Salamone, J. D. (1992) Complex motor and sensorimotor functions of striatal and accumbens dopamine: Involvement in instrumental behavior processes. *Psychopharmacology (Berl)*, 107, 160-174.
- 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. & Snyder, B.J. (1997) Behavioral functions of nucleus accumbens dopamine: Empirical and conceptual problems with the anhedonia hypothesis. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 21, 341-359.
- Salamone, J. D. & Correa, M. (2002) Motivational views of reinforcement: Implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behav. Brain Res.*, 137, 3-25.
- Salamone, J. D., Arizzi, M.N., Sandoval, M.D., Cervone, K.M. & Aberman, J.E. (2002) Dopamine antagonists alter response allocation but do not suppress appetite for food in rats:

- Contrast between the effects of SKF 83566, raclopride, and fenfluramine on a concurrent choice task. *Psychopharmacology (Berl)*, 160, 371-380.
- Salamone, J. D., Correa, M., Mingote, S. & Weber, S.M. (2003) Nucleus accumbens dopamine and the regulation of effort in food-seeking behavior: Implications for studies of natural motivation, psychiatry, and drug abuse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 305, 1-8.
- Sartsoongnoen, N., Kosonsiriluk, S., Prakobsaeng, N., Songserm, T., Rozenboim, I., Halawani, M.E. & Chaiseha, Y. (2008) The dopaminergic system in the brain of the native thai chicken, *gallusdomesticus*: Localization and differential expression across the reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 159, 107-115.
- Scalia, F. & Winans, S.S. (1975) The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J. Comp. Neurol.*, 161, 31-55.
- Schneider, L. H., Gibbs, J. & Smith, G.P. (1986) D-2 selective receptor antagonists suppress sucrose sham feeding in the rat. *Brain Res. Bull.*, 17, 605-611.
- Schultz, W. (2001) Reward signaling by dopamine neurons. *Neuroscientist*, 7, 293-302.
- Shimura, T., Kamada, Y. & Yamamoto, T. (2002) Ventral tegmental lesions reduce overconsumption of normally preferred taste fluid in rats. *Behav. Brain Res.*, 134, 123-130.
- Shipley, M. T., Ennis, M. & Puche, A. (2004) Olfactory system. In Paxinos, G. (ed), *The Rat Nervous System*. Academic press, California, pp. 923-964.
- Smeets, W. J., Hoogland, P.V. & Voorn, P. (1986) The distribution of dopamine immunoreactivity in the forebrain and midbrain of the lizard gekko gekko: An immunohistochemical study with antibodies against dopamine. *J. Comp. Neurol.*, 253, 46-60.
- Smeets, W. J., Jonker, A.J. & Hoogland, P.V. (1987) Distribution of dopamine in the forebrain and midbrain of the red-eared turtle, *pseudemys scripta elegans*, reinvestigated using antibodies against dopamine. *Brain Behav. Evol.*, 30, 121-142.
- Smeets, W. J. (1988) Distribution of dopamine immunoreactivity in the forebrain and midbrain of the snake *python regius*: A study with antibodies against dopamine. *J. Comp. Neurol.*, 271, 115-129.
- Smeets, W. J. (1991) Comparative aspects of the distribution of substance P and dopamine immunoreactivity in the substantia nigra of amniotes. *Brain Behav. Evol.*, 37, 179-188.
- Smeets, W. J. A. J. & Reiner, A. (1994) *Phylogeny and Development of Catecholamine Systems in the CNS of Vertebrates*. Cambridge University Press, Cambridge.

- Smeets, W. J., Marin, O. & Gonzalez, A. (2000) Evolution of the basal ganglia: New perspectives through a comparative approach. *J. Anat.*, 196 ( Pt 4), 501-517.
- Smith, K. S. & Berridge, K.C. (2005) The ventral pallidum and hedonic reward: Neurochemical maps of sucrose "liking" and food intake. *J. Neurosci.*, 25, 8637-8649.
- Steffensen, S. C., Svingos, A.L., Pickel, V.M. & Henriksen, S.J. (1998) Electrophysiological characterization of GABAergic neurons in the ventral tegmental area. *J. Neurosci.*, 18, 8003-8015.
- Stiedl, O. & Spiess, J. (1997) Effect of tone-dependent fear conditioning on heart rate and behavior of C57BL/6N mice. *Behav. Neurosci.*, 111, 703-711.
- Swanson, L. W. (1982) The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: A combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res. Bull.*, 9, 321-353.
- Taha, S. A. & Fields, H.L. (2005) Encoding of palatability and appetitive behaviors by distinct neuronal populations in the nucleus accumbens. *J. Neurosci.*, 25, 1193-1202.
- Tillet, Y. & Kitahama, K. (1998) Distribution of central catecholaminergic neurons: A comparison between ungulates, humans and other species. *Histol. Histopathol.*, 13, 1163-1177.
- Torvik, A. (1956) Afferent connections to the sensory trigeminal nuclei, the nucleus of the solitary tract and adjacent structures; an experimental study in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 106, 51-141.
- Tsukahara, S. & Yamanouchi, K. (2001) Neurohistological and behavioral evidence for lordosis-inhibiting tract from lateral septum to periaqueductal gray in male rats. *J. Comp. Neurol.*, 431, 293-310.
- Tzschentke, T. M. & Schmidt, W.J. (2003) Glutamatergic mechanisms in addiction. *Mol. Psychiatry*, 8, 373-382.
- Ubeda-Banon, I., Novejarque, A., Mohedano-Moriano, A., Pro-Sistiaga, P., Insausti, R., Martinez-Garcia, F., Lanuza, E. & Martinez-Marcos, A. (2008) Vomeronasal inputs to the rodent ventral striatum. *Brain Res. Bull.*, 75, 467-473.
- Verney, C. (1999) Distribution of the catecholaminergic neurons in the central nervous system of human embryos and fetuses. *Microsc. Res. Tech.*, 46, 24-47.
- Wager, T. D., Davidson, M.L., Hughes, B.L., Lindquist, M.A. & Ochsner, K.N. (2008) Prefrontal-subcortical pathways mediating successful emotion regulation. *Neuron*, 59, 1037-1050.

- Waldmann, C. & Gunturkun, O. (1993) The dopaminergic innervation of pigeon caudolateral forebrain: Immunocytochemical evidence for a 'prefrontal cortex' in birds? *Brain Res.*, 600, 225-234.
- Wender, P. H. & Reimherr, F.W. (1990) Bupropion treatment of attention-deficit hyperactivity disorder in adults. *Am. J. Psychiatry*, 147, 1018-1020.
- West, A. R., Floresco, S.B., Charara, A., Rosenkranz, J.A. & Grace, A.A. (2003) Electrophysiological interactions between striatal glutamatergic and dopaminergic systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1003, 53-74.
- Wiesner, J. B. & Moss, R.L. (1984) Beta-endorphin suppression of lordosis behavior in female rats; lack of effect of peripherally-administered naloxone. *Life Sci.*, 34, 1455-1462.
- Wilkinson, L. S., Humby, T., Killcross, A.S., Torres, E.M., Everitt, B.J. & Robbins, T.W. (1998) Dissociations in dopamine release in medial prefrontal cortex and ventral striatum during the acquisition and extinction of classical aversive conditioning in the rat. *Eur. J. Neurosci.*, 10, 1019-1026.
- Wynne, B. & Gunturkun, O. (1995) Dopaminergic innervation of the telencephalon of the pigeon (*Columba livia*): A study with antibodies against tyrosine hydroxylase and dopamine. *J. Comp. Neurol.*, 357, 446-464.
- Zohar, J., Chopra, M., Sasson, Y., Amiaz, R. & Amital, D. (2000) Obsessive compulsive disorder: Serotonin and beyond. *World J. Biol. Psychiatry.*, 1, 92-100.

## Conclusiones



## **Conclusiones**

1. Como en otras especies, en el ratón el transportador de dopamina sólo es expresado en las neuronas DAérgicas del mesencéfalo, y consecuentemente no puede ser considerado como un marcador dopaminérgico general.
2. Nuestros resultados en ratón hacen patente la necesidad de revisar la clasificación de los grupos celulares dopaminérgicos considerando nuevos datos anatómicos, embriológicos y funcionales, puesto que existen neuronas TH-ir que no se ubican en ninguno de los grupos clásicos. Como es el caso de las neuronas dopaminérgicas del núcleo supramamilar, núcleo dorsomedial hipotalámico, el núcleo magnocelular preóptico y el núcleo de la *stria terminalis*. Además, ocurre que grupos clásicos como el A11 y A13 presentan una continuidad, mientras que el grupo A15 resulta de la unión artificiosa de dos poblaciones celulares TH-ir independientes.
3. Existen neuronas TH-ir, no descritas previamente y presumiblemente dopaminérgicas, en el prosencéfalo de ratón sano, tanto en el diencefalo, como ocurre con las neuronas del núcleo magnocelular preóptico, y en el telencefalo, en el estriado, en el tubérculo olfativo y en al área olfativa anterior, incluyendo la corteza piriforme, como ocurre en otras especies de mamíferos, aunque en un número muy reducido.
4. Los ratones poseen un circuito de interconexiones entre el tegmento del mesencéfalo y el estriado organizado formando una espiral tegmento-estriado-tegmental, similar al descrito en primates, que permite una interacción funcional desde estructuras estriatales mediales hacia estructuras laterales.
5. Al menos en ratón, esta espiral empieza más medialmente de lo que se había descrito previamente, originándose en el PAG e incluyendo el septum lateral. Además, esta espiral se bifurca en determinados niveles incluyendo a la amígdala estriatal dentro de esta espiral.
6. Los datos presentados en esta tesis son compatibles con la hipótesis de que la parte medial de la espiral (incluyendo el núcleo accumbens) sea la encargada de desencadenar motivación hacia predictores de estímulos con valor hedónico. Por el contrario, la parte lateral de la espiral (incluyendo al estriado dorsal) mediaría el aprendizaje de respuestas rápidas y estereotipadas (formación de hábitos) frente a los diferentes estímulos de relevancia biológica.

7. La atracción innata por feromonas sexuales es independiente de la integridad de las células dopaminérgicas del VTA.
8. Aunque la preferencia por la sacarosa se mantiene tras lesiones DAérgicas en el VTA, su sobreconsumo se reduce. Esto indica que hay una dependencia entre el consumo preferente de sacarosa y la integridad de la inervación dopaminérgica desde el VTA.
9. La atracción y dinámica de la primera experiencia con feromonas sexuales es independiente de la inervación dopaminérgica del AcbShM. Por ello, en el caso de las feromonas, la inervación dopaminérgica de las porciones mediales de la espiral tegmento-estriado-tegmental no media la respuesta apetitiva incondicionada.
10. En la primera experiencia con soluciones concentradas de sacarosa, los ratones muestran un consumo preferente frente a agua inicial, seguido de una clara neofobia que se aprecia en un consumo preferente de agua. Ambas fases resultan en una ausencia de preferencia global por la solución azucarada en la primera experiencia. En la segunda experiencia, los ratones muestran una preferencia clara y sostenida por la solución azucarada.
11. Las lesiones DAérgicas del AcbShM afectan al desarrollo del consumo preferente de agua azucarada en la primera experiencia del animal con este estímulo. Así, los animales lesionados no muestran inicialmente preferencia entre solución azucarada y agua, pero a lo largo de los primeros minutos desarrollan preferencia por la sacarosa sin que, a lo largo de la primera sesión, lleguen a presentar síntomas claros de la neofobia por esta solución que se da en los animales control.
12. A pesar de ello, en la segunda sesión de consumo de solución de azúcar, los animales con lesiones DAérgicas del AcbShM muestran una preferencia clara y sostenida por la solución azucarada frente a agua, similar a la que presentan los animales control.
13. Estos datos sugieren que la inervación DAérgica de las porciones mediales del estriado participa en el desarrollo del estado motivacional adecuado para el consumo apetitivo de soluciones dulces. No obstante, esta inervación no es necesaria para la señalización del valor reforzante del sabor dulce, dado que los animales con lesiones de la misma llegan a adquirir una preferencia robusta, similar a la de los animales control, por las soluciones azucaradas.