

TESIS DOCTORAL

**MEDIACIÓN DOPAMINÉRGICA
Y GABAÉRGICA EN ESTUDIOS DE
CONDUCTA ADJUNTIVA**

ANA DOLORES RUIZ DÍEZ

Licenciada en Psicología por la Universidad Complutense de Madrid



Departamento de Psicología Básica I.

Facultad de Psicología

Universidad Nacional de Educación a Distancia

Madrid 2010

TESIS DOCTORAL

**MEDIACIÓN DOPAMINÉRGICA
Y GABAÉRGICA EN ESTUDIOS DE
CONDUCTA ADJUNTIVA**

ANA DOLORES RUIZ DÍEZ

Licenciada en Psicología por la Universidad Complutense de Madrid

Dirigida por:

Catedrático Dr. D. RICARDO PELLÓN SUÁREZ DE PUGA



Departamento de Psicología Básica I.

Facultad de Psicología

Universidad Nacional de Educación a Distancia

Madrid 2010

A MIS PADRES

Porque todo se lo debo a ellos.

Y a mi familia.

Agradecimientos:

A mi director de tesis el profesor Ricardo Pellón Suárez de Puga, por años de trabajo en común, por su buena dirección y saber hacer y porque siempre me trato con respeto y afecto.

A mí querida Hija por que siempre creyó en mí y por su comprensión por todas las horas que le quite de estar a su lado para poder realizar esta tesis.

Al profesor Emilio Ambrosio por enseñarme tantas cosas en el laboratorio con paciencia y cariño.

Al profesor Francisco Claro porque siempre me trato de tú a tú.

A Ángeles sin cuyos ánimos y ayuda no hubiera podido terminar esta tesis.

A Lola, más que una compañera y amiga casi una hermana.

A Alberto, por estar siempre que lo he necesitado.

A Ismael, por nuestras peleas y risas y por estar siempre a mi lado.

A Cilia y a José Antonio y también a José Carlos por su compañía y por todo lo que aprendimos juntos con nuestras charlas, y a Joaquín y a Maribel.

A Juan que de recién llegada me enseñó como moverme en un laboratorio y hasta como coger a una rata y a José Luís el más veterano de todos.

A Luís Troca por su afecto y buen hacer profesional, así como a Rosa y a todos los demás que siempre estaban dispuestos a echar una mano.

A Amparo que casi me adoptó en su departamento, a Iciar, Encarna, Ángel....

A mis compañeros mas tardíos, Javier, Muriel, Pedro, por su agradable compañía.

A todos, de corazón, Gracias.

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 POLIDIPSIA INDUCIDA POR PROGRAMA:DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS.....	1
1.2 MECANISMOS CONDUCTUALES.....	5
1.3 MECANISMOS NEUROENDOCRINOS.....	14
2. PLANTEAMIENTOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	33
3. EFECTOS DE LAS DROGAS SOBRE LA POLIDIPSIA INDUCIDA POR PROGRAMA.....	39
3.1 <i>d</i> -ANFETAMINA.....	40
3.2 NEUROLÉPTICOS.....	47
3.3 ANSIOLÍTICOS.....	56
4.EXPERIMENTO I: LOS EFECTOS DE AGENTES DOPAMINÉRGICOS SOLOS Y EN COMBINACIÓN DE <i>d</i>-ANFETAMINA, SOBRE LA POLIDIPSIA INDUCIDA POR PROGRAMA.....	69
4.1 INTRODUCCIÓN.....	69
4.2 MÉTODO.....	74
Sujetos.....	74

Aparatos.....	75
Procedimiento Conductual.....	76
Procedimiento Farmacológico: Antagonistas Dopaminérgicos.....	78
Procedimiento Farmacológico: Agonistas Dopaminérgicos.....	80
4.3 RESULTADOS.....	81
Antagonistas Dopaminérgicos.....	82
Agonistas Dopaminérgicos.....	89
4.4 DISCUSIÓN.....	93
5. EXPERIMENTO II: ANÁLISIS FARMACOLÓGICO DE LOS EFECTOS DE LAS BENZODIACEPINAS SOBRE LA POLIDIPSIA INDUCIDA POR PROGRAMA CASTIGADA EN RATAS.....	99
5.1 INTRODUCCIÓN.....	99
5.2 MÉTODO.....	104
Sujetos.....	104
Aparatos.....	105
Procedimiento Conductual.....	106
Procedimiento Farmacológico.....	108
5.3 RESULTADOS.....	110
Agonistas Benzodiazepínicos.....	111
Antagonistas Benzodiazepínicos.....	113
5.4 DISCUSIÓN.....	115
6. EXPERIMENTO III: DIFERENCIAS INDIVIDUALES EN LA POLIDIPSIA INDUCIDA POR PROGRAMA: DIVERGENCIAS DOPAMINÉRGICAS NEUROANATÓMICAS.....	119
6.1 INTRODUCCIÓN.....	119
	125

6.2 MÉTODO.....	125
Sujetos.....	126
Aparatos.....	128
Procedimiento Conductual.....	129
Autorradiografía cuantitativa de receptores.....	132
Inmunocitoquímica de la proteína Fos.....	134
6.3 RESULTADOS.....	134
Autorradiografía cuantitativa de receptores.....	136
Inmunocitoquímica de la proteína Fos.....	137
6.4 DISCUSIÓN.....	138
Autorradiografía cuantitativa de receptores.....	141
Inmunocitoquímica de la proteína Fos.....	142
Discusión final.....	
7. CONCLUSIONES.....	145
8. BIBLIOGRAFÍA.....	153

Índice de ilustraciones

Tabla 3.1.....	57
Figura 4.1.....	83
Figura 4.2.....	84
Figura 4.3.....	85
Figura 4.4.....	88
Figura 4.5.....	90
Figura 4.6.....	92
Figura 5.1.....	112
Figura 5.2.....	114
Figura 6.1.....	135
Tabla 6.1.....	137

1. INTRODUCCIÓN

1.1- POLIDIPSIA INDUCIDA POR PROGRAMA: DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS.

Polidipsia significa beber con frecuencia y abundantemente. La ingestión de agua en exceso por parte de los animales cuando no tienen sed resulta un fenómeno de difícil explicación. Cuando una rata es privada de comida y sometida a un programa de reforzamiento intermitente, si se le facilita a la vez agua, el animal bebe grandes cantidades de líquido concurrentemente con su ejecución en el programa de reforzamiento. A esta conducta se le ha denominado polidipsia inducida por programa (Falk, 1961). En la demostración original se utilizaron ratas mantenidas por privación de comida entre el 70% y 80% de su peso inicial y se las sometió a un programa simple de reforzamiento intermitente, por el que se liberaba una bolita de comida contingentemente a las presiones de palanca una vez que había transcurrido un minuto por término medio desde el anterior reforzador. Las ratas consumieron grandes cantidades de agua. El estallido de bebida ocurría

después del consumo de cada bolita de comida (pellet), alcanzando su tasa máxima transcurridos unos segundos del intervalo entre reforzamientos (Falk, 1966b). Esto sucedió a pesar de que las ratas nunca estuvieron privadas de agua y de que la privación de comida normalmente reduce el consumo de agua (Bolles, 1961). Para que este tipo de conductas se produzcan sólo son necesarias dos condiciones: que los animales estén privados de comida y que la comida se presente de forma intermitente (Falk, 1969). La cantidad de polidipsia inducida por programa es una función del nivel de privación de comida, disminuyendo a medida que se incrementa el peso de los animales. Falk (1969) encontró que cuando el porcentaje de reducción de peso por privación de comida fue superior al 95%, la polidipsia desaparecía casi por completo; sin embargo, con niveles de privación entre el 80% y el 95% las ratas bebieron en exceso.

Varios autores han sugerido que la intermitencia en la presentación del reforzador es una condición necesaria para la adquisición y el mantenimiento de la polidipsia inducida por programa. Todos ellos coinciden en afirmar que una tasa intermedia de presentación de la comida es la más eficaz para generar bebida excesiva. Tasas altas de reforzamiento son ineficaces, posiblemente porque la respuesta de comer compite con la bebida en esas condiciones (Cohen, 1975). Tasas muy bajas de reforzamiento son también poco efectivas en generar polidipsia, debido posiblemente al déficit motivacional generado por la baja tasa de ingestión de comida (Freed y Mendelson, 1979). Sin

embargo, existe cierta controversia en delimitar la tasa mínima de reforzamiento en la cual ya no es posible generar polidipsia. En la mayoría de los estudios, no obstante, se ha descrito que la cantidad de agua consumida y la tasa de lametones se relacionan como una función bitónica o de U invertida con la frecuencia en la presentación de comida, aumentando a medida que disminuye la densidad del reforzamiento hasta un valor óptimo y disminuyendo posteriormente.

Se ha podido obtener polidipsia inducida por una amplia variedad de programas de reforzamiento, incluyendo aquellos en los que la liberación del reforzador es periódica (por ejemplo, Intervalo Fijo-IF), o aperiódica (por ejemplo, Intervalo Variable-IV), e incluso cuando no se requiere una respuesta operante explícita para obtener la comida (por ejemplo, Tiempo Fijo- TF o Tiempo Variable- TV). También se han encontrado tasas relativamente altas de polidipsia inducida con programas de Reforzamiento Diferencial de tasas Bajas de respuesta (RDB: Segal y Holloway, 1963). Por todo ello se ha sugerido que es la intermitencia producida por dichos programas, más que la contingencia de la respuesta operante, lo que quizás sea estrictamente necesario para el desarrollo y mantenimiento de la polidipsia inducida por programa. Estos resultados demuestran que la duración del intervalo entre reforzamientos es una de las variables más importantes para el desarrollo de la polidipsia inducida por programa (Falk, 1966b; Flory, 1971), indicando que la localización temporal y

la cantidad de polidipia se relacionan directamente con la duración del intervalo entre reforzadores.

Esta ingestión excesiva de agua constituye una notable excepción a la idea general de que la conducta está determinada por sus consecuencias, pues no parece estar al servicio de ningún mecanismo regulatorio de ingestión de líquidos (Stricker y Adair, 1966), y se ha propuesto como prototipo de una serie de conductas inducidas, también denominadas conductas adjuntivas. Las características fundamentales de la conducta adjuntiva son: producirse a una tasa significativamente mayor que en la línea base con la presentación del reforzador "en masa", presentar una curva de U invertida a medida que se incrementa el intervalo entre reforzamientos, y aparecer al principio del intervalo entre reforzamientos, justo tras la presentación del reforzador (localización post-pellet).

La afirmación de que la polidipsia inducida por programa tiene una localización post-pellet parece indicar la posibilidad de que solo el intervalo post-pellet es efectivo para predisponer a beber. No obstante, trabajos como los de Gilbert (1974), en los que el acceso a la botella se restringió a los 30 ó 10 segundos finales de los intervalos entre reforzamientos de 60 segundos, han demostrado la capacidad que tiene esta conducta de ocurrir en otro lugar del intervalo entre reforzamientos. En los experimentos de Gilbert, las ratas

llegaron a consumir casi la misma cantidad de agua durante los períodos de restricción que durante el período de acceso libre.

El fenómeno de la inducción se ha demostrado también en otros tipos de conductas adjuntivas, como, por ejemplo, el ataque (Azrin, Hutchinson y Hake, 1966), el consumo de sustancias no nutritivas (Villarreal, 1967) y el lamer a una corriente de aire (Mendelson y Chillag, 1970). Finalmente, también se ha obtenido polidipsia con diferentes especies de animales además de la rata, como palomas (Shanab y Peterson, 1969), monos rhesus (Allen y Kenshalo, 1976), monos ardilla (Barrett, Stanley y Weimberg, 1978), e incluso en seres humanos (Kachanoff, Leveille, McLelland y Wayner, 1973).

1.2- MECANISMOS CONDUCTUALES.

Gran parte de la investigación sobre las conductas adjuntivas pretende determinar si este tipo de conductas pertenece a una categoría distinta de comportamiento. Para ello se han propuesto interpretaciones que intentan explicar el origen, desarrollo y el tipo de variables que modulan las conductas adjuntivas. Ninguna en si misma es capaz de dar cuenta en su totalidad del fenómeno de la inducción. La mayoría de estas explicaciones se pueden clasificar en conductuales o biológicas, que aquí se presentarán en apartados distintos, aunque deben necesariamente ser complementarios (Véanse las revisiones de Flores y Pellón, 2001; Pellón, Flores y Blackman, 1998).

Las interpretaciones conductuales abogan por la idea de que la polidipsia inducida por programa resulta de algún tipo de asociación con la comida; por ejemplo, se ha propuesto que la cantidad inusual de bebida resulta de las circunstancias inusuales de presentación de la comida (Stein, 1964). Falk (1971) critica esta interpretación argumentando que la polidipsia inducida por programa ocurre también después de ingerir comida en forma líquida, es decir, la ingestión de comida sólida no es una condición necesaria para la aparición de polidipsia inducida por programa (Falk, 1967; Hawkins, Schrot, Githens y Everett, 1972). Existen otros experimentos en contra de esta hipótesis (Gilbert, 1974), éstos demuestran que ratas privadas de comida y sometidas a programas de reforzamiento donde la bebida esta limitada a ciertas partes del intervalo entre reforzamientos, beben en dichas partes del intervalo y no inmediatamente después de la liberación del reforzador. La polidipsia no puede ser entendida sólo en términos de bebida asociada a la comida, pues no es el resultado de los efectos fisiológicos o metabólicos de su presentación inusual: Stricker y Adair (1966) examinaron muestras de sangre de ratas que habían desarrollado polidipsia y encontraron que pese a la sobrehidratación que presentaban los fluidos y tejidos de las ratas, éstas continuaban bebiendo.

Falk (1961) propuso que la interrupción de una conducta consumatoria en un animal motivado induce a la ocurrencia de otra conducta inmediatamente después de su interrupción, que es facilitada por los estímulos ambientales. El

origen de las conductas inducidas, sin embargo, parece deberse a estímulos ambientales algo diferentes. Una posibilidad es que la polidipsia inducida por programa sea una conducta respondiente y se traduciría en que la bebida sería una respuesta incondicionada a la ingestión de comida. Falk (1971) defiende dos argumentos en contra de esta propuesta. Primero, la polidipsia inducida por programa no es igual que una respuesta elicitada ya que necesita de varias sesiones para desarrollarse en su totalidad. Wetherington (1982) refuta este argumento aduciendo que la conducta elicitada presenta sensibilización, ya que puede incrementarse en frecuencia como consecuencia de las repetidas presentaciones del estímulo (comida). Por tanto, el desarrollo de la polidipsia inducida por programa puede deberse a una sensibilización al estímulo comida. Falk (1971) ha objetado, en segundo lugar, que mientras la bebida adjuntiva está sujeta a circunstancias ambientales, la respuesta refleja no varía con respecto a ellas. Sin embargo, se ha demostrado que la respuesta elicitada puede depender de la disponibilidad ambiental para su aparición y que la cantidad de estimulación puede determinar la amplitud de dicha respuesta (Wetherington, 1982). Esta misma autora apunta además que para que se pueda conceptualizar la conducta adjuntiva como respondiente debe cumplir dos requisitos. Por una parte, debe ser condicionable clásicamente, y por otra, las variaciones en los parámetros de la comida deben afectar a la conducta adjuntiva de manera similar que las variaciones en los parámetros del estímulo incondicionado afectan a la conducta respondiente.

En el contexto de la polidipsia inducida por programa, resulta difícil construir un paradigma pavloviano adecuado en el que tanto el estímulo condicionado como el incondicionado estén claramente indentificados. No obstante, Lashley y Rosellini (1980) han sugerido que la polidipsia inducida por programa se restringe a los períodos de tiempo donde la probabilidad de reforzamiento es menor y que su origen no se encuentra en la interrupción de la conducta consumatoria, subrayando la importancia de los factores asociativos en el desarrollo y mantenimiento de la bebida adjuntiva, esto es, que las señales de reforzamiento y no reforzamiento tienen una influencia directa en la polidipsia inducida por programa. La interpretación anterior es compatible con el modelo propuesto por Staddon (1977). (Véase también Staddon y Simmelhag, 1971), según el cual las presentaciones periódicas de comida dan lugar a dos categorías de conductas: conductas de intermedio que se darían hacia el inicio del intervalo entre reforzamientos y conductas terminales localizadas al final del intervalo entre reforzamientos (ambas conductas son consideradas como inducidas o excesivas). Las respuestas terminales incluyen actividades que forman parte del patrón de alimentación natural y se localizan en los períodos de alta probabilidad de reforzamiento, y las respuestas de ínterim o de intermedio, no relacionadas con la comida, se localizan en los períodos de baja probabilidad de reforzamiento. Se añadiría una tercera categoría de conductas denominadas facultativas (no inducidas), caracterizadas por ocurrir hacia la mitad del intervalo entre reforzamientos cuando éste es suficientemente largo.

Aproximaciones alternativas a la conducta adjuntiva han propuesto que la bebida inducida constituye un ejemplo de conducta operante, caracterizada como una conducta supersticiosa mantenida por el reforzamiento accidental con comida (Clark, 1962). Wetherington (1982) propone que para que una conducta pueda definirse como operante debe cumplir tres requisitos. Primero, debe ser modificable por sus consecuencias; segundo, las variables especificadas explícitamente que afectan a las conductas operantes deben afectar de forma similar a las conductas adjuntivas; y tercero, si la conducta adjuntiva es operante debería ser consecuencia de un reforzamiento adventicio (conducta supersticiosa), es decir tiene que mantenerse por sus consecuencias.

Reberg (1980) investigó los efectos de dos contingencias operantes sobre la polidipsia inducida por programa. Comparó la bebida inducida por parte de diferentes grupos de animales a los que se reforzó y no se reforzó el beber, respectivamente, con un grupo de control no sometido a contingencia operante alguna. Los resultados mostraron que la contingencia operante positiva (reforzamiento) aceleró la adquisición, mientras que la negativa (omisión) la impidió. Este hecho parece indicar que la contingencia operante, tanto positiva como negativa, ejerce control sobre la adquisición de la bebida inducida, aunque dicho efecto no se observó una vez adquirida la conducta.

Dunham (1971) aplicó una descarga eléctrica ligera después de cada lametón en dos ratas polidípsicas que se encontraban bajo un programa de

reforzamiento intermitente. Ambos animales suprimieron casi por completo su conducta de beber. Bond, Blackman y Scruton (1973) obtuvieron resultados parecidos, informando que cuando se utilizan descargas eléctricas contingentes a los lametones del animal, se reduce la polidipsia inducida por programa previamente establecida.

Pellón y Blackman (1987) investigaron los efectos del castigo negativo sobre la polidipsia inducida por programa, aplicando periodos de demora en la presentación de la comida contingentes a los lametones, mediante un procedimiento con demoras señaladas (apagado de la luces de la cámara como señal para una demora de 10 segundos en la presentación de la comida) y otro con demoras no señaladas. Los resultados mostraron que en general, tanto las demoras señaladas como las no señaladas, reducen la bebida inducida por programa, pudiendo llegar a la conclusión de que este tipo de conducta es susceptible a la demora en la presentación de la comida como castigo. Lamas y Pellón (1995) investigaron los efectos de distintos niveles de privación de comida sobre la polidipsia inducida por programa castigada por la aplicación de demoras dependientes de los lametones en la presentación de la comida. Los resultados de este experimento demuestran que la privación de comida ejerce efectos sobre la polidipsia castigada (los animales dejaron de beber cuando se les incrementó el peso corporal) de forma semejante a sus efectos sobre la conducta operante (Azrin, Holz y Hake, 1966). Pellón y Castilla (2000) estudiaron los efectos del castigo negativo sobre la polidipsia, mediante un

procedimiento de demoras de distinta duración en la presentación de la comida, contingentes a los lametones de la botella. Los resultados demostraron que la duración de la demora empleada como castigo no tiene siempre la misma efectividad, y que esta efectividad depende de la duración del intervalo entre reforzadores. Cuanto más largo es el intervalo entre reforzadores, menos efectiva es la demora. La efectividad de la demora como castigo está pues en función no solo de la duración de la demora, sino también de la longitud del intervalo entre reforzadores.

Varios autores han sugerido, como ya se ha señalado con anterioridad, que la intermitencia en la presentación del reforzador es una condición necesaria para la adquisición y el mantenimiento de la polidipsia inducida por programa (Hawkins, Schrot, Githens y Everett, 1972). En la mayoría de los estudios se ha descrito que la cantidad de agua consumida y la tasa de lametones se relaciona como una función bitónica de U invertida con la frecuencia en la presentación de la comida, aumentando a medida que disminuye la densidad del reforzamiento hasta un valor óptimo y disminuyendo posteriormente (Falk, 1966; Flory, 1971). La polidipsia inducida por programa suele comenzar a desarrollarse a partir de intervalos entre reforzamientos mínimos de 5 segundos, incrementando a medida que aumenta la duración de dichos intervalos hasta alcanzar un máximo entre los 30 y los 60 segundos, y comenzando a disminuir a partir de los 120 segundos aproximadamente,

llegando a desaparecer prácticamente en torno a los 240 segundos (véase Flores y Pellón, 1995).

Una influencia potencial sobre el efecto de la frecuencia del reforzamiento es la magnitud del reforzador. Falk (1967) propuso inicialmente que la tasa consumatoria (cantidad de comida por unidad de tiempo) está en relación inversa con el nivel de polidipsia inducida por programa (lo que se ha venido a conocer como la teoría de la tasa consumatoria). En otras palabras, a mayor densidad de comida por intervalo, menor nivel de bebida.

La cantidad de polidipsia inducida por programa es también función del nivel de privación de comida, disminuyendo a medida que se incrementa el peso de los animales (Falk, 1969). Falk encontró que cuando el porcentaje de reducción de peso por privación de comida fue superior al 95%, la polidipsia desapareció casi por completo. Sin embargo, con niveles de privación entre el 80% y el 95% las ratas bebieron en exceso.

Los dos primeros requisitos establecidos por Wetherington (1982) parecen cumplirse, solo queda preguntarse si la conducta adjuntiva se mantiene por sus consecuencias ambientales. Al menos tres razones contradicen la idea de que la polidipsia inducida por programa es una conducta reforzada supersticiosamente por su proximidad temporal a la liberación de las bolitas de comida. Primero, la polidipsia inducida por programa se desarrolla y estabiliza

rápidamente, al contrario que la conducta supersticiosa que es indiosincrática y de topografía muy variable. Segunda, la polidipsia inducida por programa puede desarrollarse con programas de Razón Fija (RF) de reforzamiento (Burks, 1970), donde es difícil que se establezca una relación entre el beber y la comida pues la bebida no ocurre temporalmente cercana a la presentación de la comida. Tercera, si la polidipsia inducida por programa estuviese mantenida supersticiosamente debería ocurrir inmediatamente antes de la liberación de la comida, pero normalmente se localiza en los momentos inmediatamente posteriores a la presentación del reforzador. Clark (1962) propuso que las tasas altas de bebida se deben a las correlaciones entre esta conducta y la liberación del reforzador, para el cual el animal está altamente motivado. La crítica asociada a esta hipótesis argumenta que el animal no bebe para conseguir la comida, sino que la bebida polidíptica se produce después de la aparición del reforzador y no antes de la aparición del siguiente reforzador.

La explicación de que la polidipsia inducida por programa es una conducta supersticiosa mantenida por sus consecuencias ambientales resulta, por tanto, inadecuada. Sin embargo, se pueden ofrecer otras dos explicaciones. La primera propone que la liberación de la comida podría no reforzar sólo la presión de la palanca, en caso de que esta fuera necesaria, sino que reforzaría una cadena de conductas, de manera que los animales aprendieran a beber y después a acercarse al comedero (y presionar la palanca si así se requiere). De esta forma, la conducta de beber estaría mantenida por sus consecuencias

ambientales, aunque no en la forma que predice la teoría de la superstición (véase Pellón y cols., 1998; Ardoy y Pellón, 2004).

Un segundo mecanismo explicativo basado en las consecuencias de la conducta de beber polidipsica podría encontrarse en el reforzamiento negativo. Se ha sugerido que los períodos post-reforzamiento son aversivos, por lo que los animales desarrollarán respuestas que les permitan escapar del programa de reforzamiento en esos momentos, como pueden ser las conductas adjuntivas (Palya, 1993). Levine y Levine (1989) argumentan que la conducta adjuntiva se mantiene porque disminuye la ansiedad (medida a través de glucocorticoides en sangre) que produce un programa intermitente de reforzamiento. La polidipsia inducida por programa quedaría reforzada negativamente al evitar un estímulo aversivo.

1.3- MECANISMOS NEUROENDOCRINOS.

Las interpretaciones de tipo biológico intentan explicar la polidipsia inducida por programa en función de la estructura o estructuras neurales encargadas de su génesis o mantenimiento.

Freed, Zec y Mendelson (1977) propusieron que la secreción exagerada de insulina es la responsable de la aparición de polidipsia inducida por

programa. Los programas de reforzamiento con comida y que generan polidipsia causan al mismo tiempo una excesiva secreción de insulina, que a su vez produce hipoglucemia y un estado motivacional exagerado que se traduce en la conducta inducida. No obstante, esta teoría no es capaz de explicar el fenómeno de la inducción mediante otro tipo de reforzadores que no sean la comida (Atrens, 1973; Cantor y Wilson, 1978).

Wayner (1970) propuso que el refuerzo asociado a la comida tiene un efecto de arousal comparable con la excitación que sigue a la estimulación eléctrica del hipotálamo lateral. El hecho de que la excitación eléctrica intermitente del hipotálamo lateral induzca polidipsia en ratas (Atrens, 1973) apoya la idea de que el hipotálamo puede provocar excitación conductual. Existen evidencias que apoyan esta teoría, como el hecho de que la polidipsia inducida por programa se reduce por lesiones electrolíticas en el hipotálamo lateral (Falk, 1969) y en el hipotálamo ventromedial (Kulkosky, Moe, Woods y Riley, 1975). Por otro lado, la bebida adjuntiva se ha visto aumentada por lesiones en el aérea septal (Wayner y Greenberg, 1972). A su vez se han encontrado reducciones o ausencia de polidipsia inducida por programa tras lesionar distintas áreas corticales. También se han encontrado efectos sobre la polidipsia inducida por programa tras lesionar el núcleo accumbens y el hipocampo. La adquisición de bebida inducida se ha visto impedida tras lesionar el núcleo accumbens con 6-hidroxidopamina (6-OHDA), un neurotóxico que destruye las terminales presinápticas de dopamina cuando se

inyecta intracerebralmente. Sin embargo, lesiones electrolíticas del hipocampo y lesiones en el septum lateral con 6-OHDA incrementan la polidipsia inducida por programa.

Existen dos hipótesis que enfatizan los factores motivacionales de la polidipsia inducida por programa, como se ha visto en el apartado anterior, y que sugieren distintos substratos neurofisiológicos para dicha conducta. Una explicación relaciona la conducta adjuntiva con las propiedades motivacionales del incentivo que supone la liberación de las bolitas de comida (Killeen, Hanson y Osborne, 1978). De acuerdo con esta hipótesis, tales conductas son engendradas por la excitación motivacional que acompaña a la liberación de cada bolita de comida, potenciando actividades alternativas que resultan evocadas por los estímulos ambientales disponibles. Estas conductas se realizan vigorosamente hasta que son interrumpidas por respuestas competidoras emitidas en anticipación a la siguiente bolita de comida. Un posible substrato neurofisiológico subyacente a la adquisición de la polidipsia inducida por programa, y probablemente a otras formas de conducta adjuntiva, es el núcleo accumbens y más específicamente la proyección dopaminérgica mesolímbica.

La segunda hipótesis mantiene que las situaciones que evocan las conductas adjuntivas son altamente estresantes y la expresión de dichas conductas es un medio para reducir esa situación de estrés (Brett y Levine,

1979, 1981). En apoyo a esta hipótesis se ha puesto de manifiesto que esta conducta puede modular la actividad del eje pituitario-adrenal.

De acuerdo con estas dos hipótesis, las bases anatómicas y fisiológicas de la polidipsia se podrían agrupar en dos grandes apartados: el primero se centraría en los substratos neurales de la bebida inducida, y el segundo implica al eje pituitario-adrenal en la adquisición y mantenimiento de dicha conducta.

Mecanismos neurales de la polidipsia inducida por programa.

Pocos estudios han investigado los efectos de la manipulación neural sobre el total de las conductas que ocurren durante los programas de presentación periódica de comida, aunque de entre ellos la mayoría han tenido como objetivo el estudio de las conductas adjuntivas, especialmente la polidipsia inducida por programa.

Los primeros trabajos sobre los mecanismos neurales de la polidipsia se centraron en el papel del hipotálamo ventromedial y lateral (véase anteriormente), postulando sobre esta estructura la base neural de la polidipsia inducida por programa, aunque fue descartada rápidamente debido a su fuerte implicación en la regulación del consumo de bebida y de comida.

Las investigaciones más recientes implican en la génesis y el mantenimiento de la polidipsia inducida por programa al sistema dopaminérgico. Los diversos estudios farmacológicos han demostrado que los agonistas dopaminérgicos afectan a la polidipsia inducida por programa a dosis que no alteran otro tipo de conductas. La administración periférica de agonistas dopaminérgicos, tales como apomorfina (Snodgrass y Allen, 1987) y *d*-anfetamina (Flores y Pellón, 1995; Pellón, Mas y Blackman, 1992; Robbins, Roberts y Koob, 1983; Sanger, 1977b; Wayner, Greenberg y Trowbridge, 1973; Williams y White, 1984), reducen la polidipsia inducida por programa a dosis que no alteran las tasas de conducta operante ni la bebida regulatoria en sujetos no privados. Estas reducciones en la conducta adjuntiva se ven acompañadas de incrementos en la actividad general de los animales, como puede ser la locomoción (Tazi, Dantzer y Le Moal, 1988) o morder y masticar (Todd, Beck y Martin-Iverson, 1992).

La vía neural responsable de estos efectos resulta aún desconocida, aunque existe cierto consenso sobre la implicación del sistema dopaminérgico en la polidipsia inducida por programa ya que este sistema está relacionado con la activación y el reforzamiento, en concreto, la vía dopaminérgica mesolímbica (Haz A10) que inerva áreas que parten del área tegmental ventral (VTA) hasta estructuras límbicas como el núcleo accumbens (NAc), el septum, la amígdala, el tubérculo olfatorio y el cortex prefrontal. Por este motivo se empieza a experimentar con lesiones en las distintas áreas dopaminérgicas.

Estas lesiones cuando inciden en las neuronas dopaminérgicas que proyectan desde el VTA al NAc y septum afectan a la bebida adjuntiva (Robbins y Koob, 1980). Wallace, Singer, Finlay y Gibson (1983) encontraron resultados parecidos en una serie de experimentos en los que se analizaron las relaciones entre las lesiones producidas con 6-OHDA en el NAc-septum, las conductas inducidas por programa y el nivel de corticosterona en plasma, demostrando que la interrelación de las vías dopaminérgicas del NAc-septum con los cambios en los niveles plasmáticos de corticosterona es una aproximación más completa a los sustratos neurales de la conducta adjuntiva (este aspecto se abordará posteriormente). Tanto Robbins y Koob (1980), como Wallace y cols. (1983), concluyeron que la bebida adjuntiva es fruto de una activación motivacional positiva relacionada con la aparición periódica de comida. Esto entraría en conflicto con investigaciones posteriores realizadas por Taghzouti, Simon, Tazi, Dantzer y Le Moal (1985), los cuales lesionaron las terminales dopaminérgicas del septum lateral con 6-OHDA, observándose un incremento significativo en la ingestión de agua durante la adquisición de la polidipsia inducida por programa. Los autores afirman que estos resultados vienen producidos por el incremento de la activación conductual como consecuencia de una situación aversiva, ya que la inervación dopaminérgica del septum lateral media el control de las situaciones aversivas o estresantes, concluyendo que la polidipsia era debida a una activación motivacional negativa producida por una situación aversiva como lo puede ser para una rata hambrienta la presentación periódica de comida.

En la misma línea, Mittleman y Valenstein (1986) investigaron el efecto de lesiones unilaterales en la sustancia negra sobre la polidipsia inducida por programa. La sustancia negra es el lugar de donde parte el sistema nigroestriado (Haz A9), otro de los sistemas que utilizan dopamina como neurotransmisor y que está implicado en la producción de esterotipias inducidas por estimulantes, cuya degeneración es responsable de la enfermedad de Parkinson. Los resultados demostraron que estas lesiones reducían significativamente la polidipsia inducida por programa, independientemente de que el hemisferio lesionado sea el dominante o no. Estos autores deducen que este tipo de lesiones reduce el nivel o la duración de la activación inducida por la presentación intermitente de comida.

También se ha investigado el papel del córtex prefrontal en la polidipsia inducida por programa, no observándose, sin embargo, en las neuronas dopaminérgicas que conectan el VTA con la corteza prefrontal una implicación similar a la encontrada en las neuronas que proyectan del VTA al NAc-septum (Christie, Beart, Louis, Gibson, Singer y Papasaya, 1986). Mittleman, Whishaw, Jones, Koch y Robbins (1990) realizaron un experimento mediante aspiraciones del hipocampo y pequeñas lesiones en el cortex parietal (grupo de control de la lesión del hipocampo), decorticación, o lesiones con 6-OHDA en el NAc y el núcleo caudado. En este experimento intentaron validar, estableciendo sus bases neurales, el esquema propuesto por Staddon (1977)

acerca de que las conductas que ocurren en los intervalos entre reforzamientos se dividen en tres categorías (de intermedio, facultativas y terminales), pues parece ser que los patrones conductuales generados durante la liberación intermitente de comida dependen para su expresión de un gran número de sistemas neurales. Los resultados del estudio indican la existencia de dos tipos de problemas conductuales, en lo que a las conductas adjuntivas se refiere, que parecen ser debidos a diferentes tipos de lesión cerebral. El primero puede describirse como un desajuste motor para beber que afecta a la lengua y a la boca. Este déficit se produjo tras la decorticación y por la depleción de dopamina en el núcleo caudado. El segundo tipo de problema es de naturaleza motivacional y no está relacionado con déficit en la bebida consumatoria. Aparentemente los déficit motivacionales se producen por la hipocampectomía y por la depleción de la dopamina en el cerebro.

No todos los resultados son positivos para la implicación de la dopamina mesolímbica y el NAc en la polidipsia inducida por programa. Se han registrado incrementos en los niveles de dopamina extracelulares en el NAc durante el desarrollo de la polidipsia inducida por programa (Weissenborn, Blaha, Winn y Phillips, 1996), pero queda por determinar la especificidad de dichos cambios: puede ser que el incremento de dopamina durante las sesiones de polidipsia sea debido al incremento en la actividad producida por la presentación intermitente de comida, o bien, puede ser que los incrementos de dopamina sean necesarios para que ocurra la bebida. También

puede ser que los elevados niveles de dopamina reflejen la necesidad del animal de escoger entre distintas actividades en una situación caracterizada por altos niveles de motivación. Queda igualmente por determinar las partes del NAc que tienen una mayor implicación en la polidipsia inducida por programa, ya que las lesiones en el núcleo (core) del NAc no se han demostrado suficientes para reducir específicamente la conducta adjuntiva de beber, sugiriendo que esta estructura no es necesaria para el desarrollo de la polidipsia inducida por programa, sin embargo si se redujo el número de presiones por minuto al panel de respuestas, considerada esta última como una conducta de tipo terminal. Esto sugiere que el desarrollo de la polidipsia inducida por programa puede ser fraccionado y que diferentes sistemas neurales controlan diferentes aspectos de su expresión.

Mittleman, Rosner y Schaub (1994) demostraron que los sistemas dopaminérgicos están principalmente implicados en aspectos motores o de actuación de la polidipsia inducida por programa, más que en aspectos motivacionales. Esto se confirma por el hecho de que agonistas y antagonistas dopaminérgicos tienen el mismo efecto reductor sobre la polidipsia inducida por programa. Los mecanismos de esta reducción, sin embargo, parecen distintos. Los agonistas dopaminérgicos (*d*-anfetamina, SKF-82958) reducen la polidipsia inducida por programa al incrementar la actividad de los animales, conductas que compiten con el beber. Los antagonistas dopaminérgicos (haloperidol, SKF-83566), algunos agonistas como el quinpirole, y otras

sustancias no dopaminérgicas como el diazepam, reducen la polidipsia al causar impedimentos en la iniciación o ejecución de las conductas, reducen la actividad locomotora, las entradas al comedero, incrementan la latencia de coger la comida y reducen también la bebida.

Como consecuencia de todo lo anteriormente expuesto, se puede concluir que no se sabe con exactitud si las manipulaciones dopaminérgicas afectan sólo a cuestiones motoras o también motivacionales, y si son estas últimas las que resultan afectadas o si la motivación que mantiene esta conducta es apetitiva o aversiva. También habría que preguntarse si se pueden separar los componentes motivacionales en una respuesta (Salomone, Cousins y Snyder, 1997). Actualmente existe un amplio debate sobre si la dopamina simplemente media el valor reforzante de los estímulos (Wise, 1982), o informa de un error en la predicción temporal del reforzador (Hollerman y Schultz, 1998). También se postula la idea de que la dopamina está implicada en la evaluación de las relaciones coste-beneficio de la respuesta, independientemente de que la motivación sea apetitiva o aversiva (Salomone y cols., 1977; Redgrave, Prescott y Gurney, 1999). Y por último, también se relaciona a la dopamina con la conducta apetitiva más que con la consumatoria (Nader, Bechara y Vander Kooy, 1997).

Estos resultados han llevado a los investigadores a explorar otros sistemas de neurotransmisión que pudieran estar implicados en la bebida

inducida. Los estudios sobre el locus coeruleus y el efecto de sustancias serotoninérgicas sugieren que esta estructura está implicada en la integración central de la polidipsia inducida por programa, y que los efectos moduladores de las sustancias que actúan a través de los receptores 5-HT₂ dependen de la integridad de la función del locus coeruleus (Lu, Tseng, Wan, Yin y Tung, 1992). La administración de agonistas selectivos y de inhibidores de la recaptación de serotonina disminuyen selectivamente la polidipsia inducida por programa, que se ve aumentada tras la administración de antagonistas selectivos de serotonina (Woods, Smith, Szewczak, Dunn, Cornfeldt y Corbett, 1993).

Mecanismos pituitario-adrenales de la polidipsia inducida por programa.

En la actualidad existe abundante evidencia experimental que implica al eje pituitario adrenal en la adquisición y mantenimiento de la polidipsia inducida por programa. A ello han contribuido los trabajos de Levine y colaboradores (Brett y Levine, 1979, 1981; Brett, Patterson y Levine, 1982; Levine y Levine, 1989). Estos trabajos están basados en la hipótesis de que la polidipsia inducida por programa tiene el papel de reducir el "arousal" generado por las situaciones de presentación intermitente de comida a animales hambrientos. Así, los efectos de la polidipsia inducida por programa sobre la

actividad pituitario adrenal se han estudiado manipulando sistemas que tiene que ver con la ansiedad y el estrés, tanto a nivel central (sistema serotoninérgico) como se ha visto en el apartado anterior, como a nivel periférico (corticoesterona).

Los experimentos realizados por Brett y Levine (1979) mostraron como resultado que las ratas polidípsicas experimentaban una reducción significativa en sus niveles de corticosterona durante la sesión experimental de presentación intermitente de comida. Se puede interpretar, por tanto, que los animales polidípsicos experimentan una supresión activa de la actividad pituitario adrenal y que la polidipsia inducida por programa tiene propiedades reductoras del estrés (producido por la liberación intermitente de comida a animales hambrientos), las cuales contribuyen al desarrollo y mantenimiento de esta conducta. Así mismo, en otra serie de experimentos, estas mismas autoras demostraron que este descenso en los niveles de corticosterona en sangre reflejaba factores psicológicos y no factores fisiológicos periféricos, es decir, que la reducción de la corticoesterona en sangre no era debida a la hemodisolución de dicha sustancia dado la gran cantidad de agua que ingiere el animal en una situación de inducción polidípsica (Brett y Levine, 1981).

En otros trabajos se ha investigado el papel de las hormonas pituitario-adrenales en la polidipsia inducida por programa. La actividad polidípsica resulta suprimida por la adrenalectomía (Levine y Levine, 1989; Lin, Singer y

Papasaba, 1988) y por la hipofisectomía (Lin, Singer e Irby, 1990). La implantación de corticosterona revierte los efectos de la adrenalectomía y de la hipofisectomía, de forma total en el primer caso y parcial pero significativa en el segundo. Todos estos resultados demuestran que la corticosterona desempeña una función muy importante en la adquisición y desarrollo de la polidipsia inducida por programa.

Examinando otro tipo de conductas adjuntivas, como el correr por una rueda, y comparando ésta con la polidipsia inducida por programa, se obtuvieron resultados que indicaban que la actividad en la rueda daba lugar a un incremento de corticosterona en plasma (Tazy, Dantzer, Mormede y Le Moal, 1986), mientras que la actividad polidíptica estaba acompañada de una reducción significativa de los niveles de corticosterona (Brett y Levine, 1979, 1981). Estos resultados sugieren que el uso de los niveles de corticosterona como índice de reducción del estrés en situaciones aversivas puede no ser el adecuado, debido a que éste puede variar en función de los requerimientos metabólicos de la respuesta conductual bajo estudio, especialmente cuando conlleva ejercicio intenso (como el correr por la rueda).

Ha habido intentos de explorar qué factores pudieran ser los responsables de las diferencias individuales entre los animales que desarrollan polidipsia y los que no lo hacen. Dantzer, Terlouw, Mormede y Le Moal (1988a) encontraron que las ratas que desarrollan polidipsia disminuyen sus niveles de corticosterona e

incrementan sus niveles de prolactina durante el curso de las sesiones experimentales, en comparación con ratas que no desarrollan polidipsia. No hay diferencias, sin embargo, en los niveles de catecolaminas de ambos grupos. En conclusión, el patrón neuroendocrino de respuesta de la polidipsia inducida por programa consistiría en una disminución de la actividad pituitario-adrenal y en un incremento de la liberación de prolactina, sin ningún cambio en los niveles plasmáticos de catecolaminas. La predisposición a desarrollar polidipsia inducida por programa sería, pues, una faceta de un perfil más general de reactividad neuroquímica y conductual, que podría estar relacionado con los sistemas dopaminérgicos (Mittleman y Valenstein, 1985; Mittleman, Castañeda, Robinson y Valenstein, 1986). El factor básico subyacente a las diferencias entre los animales que desarrollan o no polidipsia inducida por programa, pudiera ser la habilidad para cambiar de una conducta a otra dentro de los programas de reforzamiento, es decir, la flexibilidad conductual. Generalmente las ratas que no desarrollan una gran cantidad de polidipsia inducida por programa son animales que desarrollan cierta cantidad de bebida pero que se muestran flexibles en su conducta y no desarrollan rutinas. Por el contrario, los animales que desarrollan gran cantidad de polidipsia son animales cuyos patrones de bebida se vuelven estereotipados a medida que van desarrollando la conducta.

El principal resultado de estos estudios ha sido el descubrimiento de una relación entre la propensión a responder bebiendo o comiendo tras la estimulación eléctrica del hipotálamo lateral y la predisposición a desarrollar

olidipsia inducida por programa. Estas diferencias pudieran estar relacionadas con las diferencias individuales en la responsividad de los sistemas dopaminérgicos. Los animales que desarrollan polidipsia y beben tras la estimulación eléctrica del hipotálamo lateral desarrollan mayor sensibilización a la administración repetida de amfetamina y muestran una actividad más amplia de los sistemas dopaminérgicos en respuesta al estrés producido por una descarga eléctrica (Mittleman y Valenstein, 1984, 1985; Mittleman y cols., 1986). Además, los animales que no beben tras la estimulación eléctrica del hipotálamo lateral llegan a emitir dicha conducta tras repetidas inyecciones de amfetamina (Mittleman y Valenstein, 1985).

La hipótesis de la polidipsia inducida por programa como reductora del estrés es puesta en duda por Mittleman, Robbins y Jones (1988), tras demostrar que si bien es cierto que existe una relación inversa entre los niveles de corticosterona en plasma y la polidipsia inducida por programa, dichos niveles de corticosterona son significativamente más altos que los basales tras una sesión de polidipsia inducida por programa, tanto con agua disponible como sin ella (resultados contrarios a los hallados por Brett y Levine, 1979; y Tazi y cols., 1986).

Mittleman, Blaha y Phillips (1992), con el fin de ofrecer una hipótesis alternativa llevaron a cabo una serie de experimentos, proponiendo como conclusión de sus investigaciones un mecanismo neural de acción según el cual

los incrementos en la corticosterona plasmática pueden facilitar la liberación de dopamina y es posible que este efecto resulte mediado por los glucocorticoides que actúan directamente sobre los sinaptosomas reduciendo la recaptación de dopamina. Es posible que la corticosterona actúe directamente sobre los receptores de glucocorticoides en los cuerpos celulares del área tegmental ventral. Alternativamente, como la administración de glucocorticoides puede alterar otros sistemas de neurotransmisión, tales como monoaminas y acetilcolina, es posible que los cambios en estos sistemas puedan interactuar con la neurotransmisión dopaminérgica. Entonces las alteraciones de corticosterona en plasma pueden afectar a la dopamina por alguno o por todos los mecanismos mencionados, la forma precisa por la cual ocurre es aún desconocida.

De todo ello se puede concluir que, puesto que tanto los incrementos como las reducciones de corticosterona estuvieron asociados con la reducción de la polidipsia inducida por programa, no existe una relación consistente entre la actividad pituitario-adrenal y el desarrollo de bebida adjuntiva y, por tanto, la hipótesis de que las conductas adjuntivas reducen el estrés parece inconsistente. Sin embargo, los efectos de la manipulación de los niveles de corticosterona fueron diferentes cuando se evaluaron sobre el mantenimiento de la polidipsia. La adrenalectomía bloqueó el posterior desarrollo de polidipsia inducida por programa y el aumento de corticosterona incrementó la bebida dependiendo de los niveles de línea base de consumo de agua.

Mittleman y cols. (1992) proponen la hipótesis de que pudiera haber diferencias en los mecanismos que controlan la adquisición y el mantenimiento de la polidipsia inducida por programa, ya que la adquisición de la polidipsia resulta afectada por la depleción de dopamina en el núcleo accumbens (Mittleman y cols., 1990; Robbins y Koob, 1980; Wallace, y cols., 1983) y esta depleción no afecta en la misma intensidad al mantenimiento de la polidipsia (Robbins y cols., 1983). Por otro lado, el incremento de la corticosterona afecta al mantenimiento de la polidipsia dependiendo de los niveles de línea base de bebida. Pudiera ser que el substrato fisiológico de la adquisición de la polidipsia estuviera en la proyección mesolímbica, mientras que el mecanismo fisiológico de mantenimiento fuera de carácter endocrino.

Las conclusiones de las investigaciones sobre los mecanismos neuroendocrinos de la polidipsia inducida por programa son aún bastante controvertidas. Existen importantes avances, casi nadie duda que las conductas adjuntivas en general, y la polidipsia inducida por programa en particular, son conductas mantenidas por sus consecuencias (véase Pellón y cols., 1998). No obstante, quedan muchas cuestiones por resolver, por ejemplo, qué tipo de motivación las mantiene, si cumple una o varias funciones a lo largo de su desarrollo, y si cumple la misma función en animales con altos niveles de polidipsia que en animales con bajos niveles de polidipsia. Respondiendo a estas preguntas puede que se encuentre que son varios los mecanismos implicados en la génesis y el mantenimiento de esta conducta.

2. PLANTEAMIENTOS DE LA INVESTIGACIÓN

La presente Tesis Doctoral se enmarca en una línea de investigación que se desarrolla en los Laboratorios de Conducta Animal del Departamento de Psicología Básica I, por la cual se intenta determinar el grado de control farmacológico de la polidipsia inducida por programa a través de drogas de abuso, y la determinación de las estructuras neurales implicadas en su génesis y mantenimiento.

Polidipsia significa beber con frecuencia y abundantemente. La ingestión de agua en exceso por parte de los animales cuando no tienen sed, resulta un fenómeno de difícil explicación. Cuando una rata es privada de comida y sometida a un programa de reforzamiento intermitente, si se le facilita a la vez agua, el animal bebe grandes cantidades de líquido concurrentemente con su ejecución en el programa de reforzamiento. A esta conducta se le ha denominado polidipsia inducida por programa (Falk, 1961). Esta ingestión excesiva de agua

constituye una notable excepción a la idea general de que la conducta esta determinada por sus consecuencias, pues no parece estar al servicio de ningún mecanismo regulatorio de ingestión de líquidos (Stricker y Adair, 1966) y se ha propuesto como una serie de conductas inducidas, también denominadas conductas adjuntivas.

Dado que el presente trabajo pretende ser un estudio farmacológico y neurobiológico sobre la polidipsia inducida por programa, se plantearon tres tipos de experimentos en relación con su estudio. En el primer experimento, se examina la implicación del sistema dopaminérgico en los efectos de la *d*-anfetamina sobre la polidipsia inducida por programa y de varios antagonistas dopaminérgicos: SCH-23390 (antagonista selectivo de los receptores D1), eticlopride (antagonista selectivo de los receptores D2) y flupentixol (antagonista de los receptores D1 y D2), y las de los agonistas dopaminérgicos SKF-38393 (agonista selectivo de los receptores D1) y quinpirole (agonista selectivo de los receptores D2), y se combinaron dosis de los agonistas y antagonistas dopaminérgicos con dosis de *d*-anfetamina para conocer si los efectos de la *d*-anfetamina sobre la polidipsia pueden ser modulados con dichas drogas. La manipulación dopaminérgica afecta a la polidipsia inducida por programa (Mittleman y cols., 1994), y dado que las anfetaminas ejercen la mayoría de sus efectos conductuales a través del sistema dopaminérgico, liberando dopamina o inhibiendo su recaptación, se puede suponer que los

neurolépticos y otros antagonistas de los receptores dopaminérgicos puedan bloquear los efectos de la *d*-anfetamina sobre la conducta.

Se redujo el peso de los animales al 80% de su peso libre. Se sometió a los animales a un programa de Tiempo Fijo (TF) 60-s de liberación de comida independiente de la conducta del sujeto. Una vez que la conducta polidíptica presentó una línea base estable se procedió con el tratamiento farmacológico combinándose las dosis de los antagonistas y agonistas dopaminérgicos con dosis de *d*-anfetamina y se determinó la curva de dependencia de dosis de la *d*-anfetamina, así como la de los antagonistas y agonistas dopaminérgicos.

La polidipsia inducida por programa es un patrón de conducta sensible también a los efectos de las drogas ansiolíticas. El segundo experimento de la Tesis Doctoral se basa en la hipótesis de que las situaciones capaces de provocar conductas adjuntivas son altamente activadoras o estresantes, y que la ejecución de conductas adjuntivas en esas situaciones funcionaría reduciendo la ansiedad o el estrés. Las benzodiazepinas son las drogas más frecuentemente utilizadas como ansiolíticos al tener efectos específicos sobre el Sistema Nervioso Central (SNC), aumentando las acciones electrofisiológicas y bioquímicas del GABA, principal neurotransmisor inhibitorio del cerebro. Los ansiolíticos, al disminuir la ansiedad, deberían disminuir también la conducta polidíptica (Sanger y Blackman, 1978). Pellón y cols. (1992) comprobaron que la administración de diazepam (una de las benzodiazepinas más frecuentemente utilizadas en la clínica para el tratamiento

de la ansiedad) producía un descenso en la polidipsia inducida por programa. Hymowitz (1981b) también comprobó que dosis bajas o intermedias de diazepam no afectaban a la bebida polidíptica, mientras que dosis altas redujeron las tasas de bebida de esta conducta. Así mismo, la tasa de respuesta de bebida polidíptica que ha sido previamente castigada mediante una descarga eléctrica de determinada intensidad, se ve incrementada con la administración de ansiolíticos (Flores y Pellón, 1998, 2000).

El objetivo del presente estudio fue investigar los mecanismos farmacológicos de acción de las benzodiazepinas sobre la polidipsia inducida por programa castigada, a través del estudio comparado de diferentes agonistas benzodiazepínicos y del posible antagonismo producido por el bloqueo de los receptores de benzodiazepinas con flumacénil.

En este segundo experimento se examina, en primer lugar, los efectos de las drogas ansiolíticas sobre la polidipsia inducida por programa castigada, para conocer, mediante diferentes agonistas gabaérgicos, si los efectos ansiolíticos sobre la polidipsia inducida por programa castigada, pueden ser antagonizados mediante el bloqueo de los receptores de benzodiazepinas por el antagonista flumacénil. Al igual que en el primer experimento, se redujo el peso de los animales al 80% de su peso libre y se les sometió a un programa de reforzamiento de TF 60-s. Una vez estabilizada la bebida polidíptica, se continuó administrando la comida conforme al programa de TF 60-s, pero ahora las ratas recibieron

además una descarga eléctrica en periodos señalados de cinco minutos. Se administraron 4 tipos de agonistas completos de benzodiazepinas: diazepam, clordiazepóxido, oxacepam y el agonista parcial RU-32698, así como el agonista inverso RU-34000, tanto para la condición de castigo como para la de no castigo. Posteriormente, se combinaron dosis de diazepam en combinación de dosis de flumazenil y RU-32698, así como con dosis del agonista inverso benzodiazepínico RU-34000.

El tercer experimento se dirige hacia la investigación del sustrato neurobiológico de la polidipsia inducida por programa. Esta línea de experimentación está basada en la hipótesis de que la polidipsia es elicitada por la excitación motivacional o arousal que supone la aparición de la comida al final del intervalo. Este arousal provocaría la aparición de conductas relacionadas con los estímulos disponibles en el ambiente. Esta hipótesis dirigió las investigaciones del sustrato neurobiológico hacia regiones del sistema nervioso relacionadas con los sistemas de recompensa, en general hacia los sistemas dopaminérgicos (cortex prefrontal, cuerpo estriado, núcleo accumbens, etc).

En este experimento se examinan si existen diferencias, a nivel neurológico, entre animales capaces de desarrollar polidipsia y los que no la desarrollan, basándose en el estudio de las estructuras encefálicas relacionadas con el circuito motivacional o de recompensa. Una vez reducido el peso de los animales, como en los anteriores experimentos, se les sometió a un programa

de reforzamiento intermitente con comida mediante el cual desarrollaron polidipsia. A continuación, los animales fueron sacrificados y perfundidos, y sus encéfalos extraídos para proceder a la incubación de secciones de tejido que permitieron, mediante técnicas autorradiográficas, obtener la concentración de receptores de regiones anatómicas concretas, previamente seleccionadas por su implicación en el circuito motivacional. En segundo lugar, y mediante técnicas de inmunocitoquímica se estudiaron los niveles de actividad neural a través de la inmunotinción de la proteína Fos.

3. EFECTOS DE LAS DROGAS SOBRE LA POLIDIPSIA INDUCIDA POR PROGRAMA

En los capítulos anteriores se ha tratado de ofrecer una panorámica general acerca de la polidipsia inducida por programa, de sus características y de las principales interpretaciones, tanto de naturaleza conductual como biológica. Dado que el presente trabajo pretende ser un estudio farmacológico y neurobiológico de la polidipsia inducida por programa, a continuación se expondrán los efectos de diferentes tipos de drogas sobre la conducta adjuntiva, aquellas que serán objeto de investigación en la presente Tesis Doctoral.

3.1- *d*-ANFETAMINA.

(+)- Anfetamina sulfato o dextroanfetamina sulfato (*d*-anfetamina): S(+)-Ó-Metilfeniletilamina sulfato (C₉H₁₃N)₂H₂SO₄ es el isómero más potente de las anfetaminas (tres o cuatro veces más potente que el isómero (-) anfetamina sulfato o l-anfetamina sulfato). Es un agonista indirecto de los receptores de dopamina, intensificando la función neuronal de la norepinefrina y de la dopamina ya que actúa, dado su gran semejanza química, desplazando las moléculas de dopamina y de norepinefrina de las vesículas de almacenamiento de la terminación nerviosa, haciendo con ello que estos neurotransmisores se difundan por la hendidura sináptica e impidiendo su recaptación. Arrojadados los neurotransmisores a la hendidura sináptica, estimulan en ella a los receptores apropiados. Además de esta acción, la *d*-anfetamina tiene también efecto sobre otro neurotransmisor, tal como la serotonina (5-Hidroxitriptamina:5-HT), sin embargo su principal acción conductual es a través de la dopamina (Robbins, Mittlemam, O'Brien y Winn, 1990).

Muchos estudios han demostrado que los efectos dopaminérgicos de la *d*-anfetamina se producen a dosis más bajas de las que se necesitan para activar otros sistemas neuroquímicos. Se trata pues de un estimulante del SNC que a dosis bajas produce activación física y mental, caracterizada por un incremento de la capacidad en general, una demora en la aparición de la fatiga y una

disminución en la necesidad de sueño. Tras este efecto se produce una marcada depresión con efecto de rebote. A dosis moderadas, las anfetaminas producen un estado de euforia y a dosis altas pueden inducir, además de esterotipias, un síndrome psicótico (Kruk y Pycock, 1991). Los efectos alertadores y estimulantes de las anfetaminas son producidos por la intensificación de la actividad noradrenalinérgica en el cortex cerebral. La euforia suscitada por esta droga implica probablemente al sistema límbico. Las drogas neurolépticas producen sus efectos terapéuticos bloqueando los receptores de dopamina. La exacerbación de los síntomas esquizofrénicos con pequeñas dosis de anfetamina se puede explicar, pues, por la capacidad de este estimulante para incrementar la liberación de dopamina. Cuando se ingieren dosis cada vez mayores de anfetamina, se liberan grandes cantidades de dopamina, lo que da por resultado el síndrome psicótico mencionado anteriormente, semejante a la esquizofrenia. De todas las principales drogas psicoactivas, solo los estimulantes y los neurolépticos son los que más selectivamente influyen en los sistemas dopaminérgicos del cerebro.

Las anfetaminas son drogas que han gozado de una amplia investigación en experimentos de conducta por ser sustancias consideradas de abuso y ejercer una gran variedad de acciones sobre la conducta de los animales de laboratorio (Moore, 1978). Una de las áreas de investigación donde más se han estudiado los efectos de las anfetaminas es la del condicionamiento operante. El efecto más sobresaliente de estas drogas sobre la conducta

operante es lo que se ha dado en llamar "efecto de dependencia de la tasa". Es decir, los efectos de las anfetaminas sobre la conducta operante dependen de la tasa a la cual la conducta está ocurriendo antes de la administración de la droga. Las tasas bajas de respuesta aumentan, y las altas disminuyen, después de la administración de anfetamina (Dews, 1958; Kelleher y Morse, 1968).

Sanger y Blackman (1978) revisaron los estudios experimentales sobre los efectos de las drogas sobre la polidipsia inducida por programa. De esta revisión se puede deducir que las drogas ejercen efectos ordenados sobre esta conducta adjuntiva, pero estos difieren de los mostrados sobre la conducta operante. Los estimulantes, tales como las anfetaminas, no tienen efecto o disminuyen la bebida inducida por programa a dosis pequeñas o moderadas, las cuales simultáneamente incrementan la conducta operante mantenida por el mismo programa (Wuttke e Innis, 1972; Byrd, 1973; Wayner, Greenberg y Trowbridge, 1973; Smith y Clark, 1975).

Falk (1964) entrenó ratas a presionar una palanca para conseguir comida de acuerdo con un programa de IV 1 minuto con botellas de agua disponibles. Cuando la bebida adjuntiva se consideró estable, se evaluaron los efectos de la dosis de 0.5 mg/Kg de metanfetamina. La bebida disminuyó prodigiosamente debido a la administración de esta droga, mientras que sólo se encontró un pequeño efecto sobre la tasa de presión de palanca.

Algunos investigadores han utilizado programas de IF (Wuttke e Innis, 1972; Byrd, 1973; McKearney, 1973; Wayner y cols., 1973; Williams y White, 1984). Wayner y cols. (1973) sometieron a dos ratas hembra a un programa de IF 1 minuto de reforzamiento con comida con botellas de agua disponibles. Cuando se estabilizaron las tasas de bebida, administraron *d*-anfetamina (0.05, 0.25, 0.50, 1.0, 1.5 y 2.0 mg/Kg) intraperitonealmente. La bebida adjuntiva resultó marcadamente disminuida a dosis de *d*-anfetamina que concurrentemente incrementaron las tasas de presión de palanca (0.5 y 2.0 mg/Kg). A dosis bajas (0.05 y 0.25 mg/Kg), sin embargo, hubo indicios de que se facilitó la bebida adjuntiva en uno de los animales.

Byrd (1973) estudió en dos chimpancés los efectos de la *d*-anfetamina sobre la presión de palanca y la bebida adjuntiva mantenidas por un programa múltiple de IF 10 minutos RF 100 de reforzamiento con comida. Las dosis de 0.3 a 1.0 mg/Kg aumentaron las tasas medias de presión de palanca bajo el programa de IF, y las dosis de 0.03 a 0.3 mg/Kg aumentaron las tasas medias de presión de palanca bajo el programa de RF. Ninguna de las dosis de *d*-anfetamina estudiadas incrementó la bebida en los chimpancés y ésta fue totalmente suprimida por las dosis más altas (1.0 y 3.0 mg/Kg) sólo en el programa de IF, ya que en el programa de RF la bebida ocurría muy raramente. También se ha demostrado que la bebida inducida por un programa de TF es atenuada por la administración de *d*-anfetamina (Segal, Oden y Deadwyler, 1965a).

Sanger (1978b) analizó los efectos de la *d*-anfetamina (0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/Kg) sobre la presión de palanca y la bebida inducida en ratas por un programa múltiple IF TF. La *d*-anfetamina incrementó la proporción de lametones que ocurrían al principio del intervalo. No hubo diferencias en los efectos de esta droga sobre la bebida inducida por los dos componentes del programa múltiple. La presión de palanca en el componente de IF fue alterado por la anfetamina, incrementando la proporción de respuestas emitidas al principio del intervalo.

McKearney (1973) registró las tasas de bebida durante segmentos sucesivos de 18 segundos en un programa de IF 3 minutos. Esto proporcionó un amplio rango de tasas, tanto de bebida adjuntiva, como de respuesta operante. Los efectos de la metanfetamina sobre estas tasas no fueron claramente dependientes de sus valores en condición de control.

Pellón y Blackman (1992) midieron las respuestas obtenidas durante el intervalo entre reforzamientos dividido en intervalos de tiempo de 5 segundos. La *d*-anfetamina desplazó la distribución de los lametones entre reforzamientos.

Flores y Pellón (1997) investigaron los efectos de dependencia de la dosis de la *d*-anfetamina en la distribución de los lametones a lo largo de las

distintas duraciones de los intervalos entre reforzamientos divididos en segmentos de 2 segundos. Los resultados confirmaron que la *d*-anfetamina produjo un desplazamiento hacia la izquierda en la distribución de los lametones.

McMillan (1979) encontró que los efectos de la *d*-anfetamina (0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg/Kg) sobre la polidipsia inducida por un programa de IF 90 segundos fueron dependientes de la tasa de los valores de control, decreciendo los valores más altos e incrementándose los más bajos. No obstante, sus datos no son totalmente concluyentes, pues dos de las cuatro ratas utilizadas redujeron las tasas altas de bebida polidíptica, pero en estas mismas ratas no se puede apreciar el efecto de incremento de tasas bajas, que sólo aumentaron en las otras dos ratas. En contraste con McMillan (1979), Flores y Pellón (1995) encontraron que los efectos de la *d*-anfetamina (0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/kg) sobre la polidipsia inducida por un programa múltiple de TF IF (15, 30, 60, 120, 240 y 480 segundos) producía una reducción de la respuesta dependiente de la dosis de manera inversamente proporcional a la tasa de lametones de los valores de control, es decir, las líneas base de respuesta bajas resultaron más suprimidas (efecto de dependencia de tasa inverso), resultados que complementan y corroboran los obtenidos por Robbins y cols. (1983).

Williams y White (1984) estudiaron los efectos de distintas dosis de *d*-anfetamina (0.3, 1.0, 3.0 y 10.0 mg/Kg) sobre dos conductas inducidas

diferentes por un programa de IF 90 segundos. Las dosis de 0.3 y 1.0 mg/Kg de *d*-anfetamina incrementaron significativamente la tasa de presión de palanca, mientras que la dosis de 10.0 mg/Kg la disminuyó. Tanto la bebida adjuntiva como la actividad inducida resultaron disminuidas por la anfetamina. Estos datos demuestran que la *d*-anfetamina tiene efectos diferentes sobre las conductas operante y adjuntiva, y que los efectos de una droga sobre la tasa de una conducta adjuntiva puede ser un ejemplo sobre los efectos de esa droga sobre otra conducta adjuntiva diferente.

Pellón y cols. (1992) estudiaron los efectos de la *d*-anfetamina (0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 mg/Kg) sobre la bebida inducida por un programa de TF 60 segundos, utilizando procedimientos de castigo negativo y de no castigo. El procedimiento de castigo utilizado consistió en una demora de 10 segundos en la liberación de la siguiente bolita de comida que se iniciaba con cada lametón. Las dosis más bajas no tuvieron efecto sobre la bebida inducida no castigada, sin embargo, la dosis mayor la disminuyó. La bebida castigada resultó incrementada por todas las dosis de *d*-anfetamina.

Se puede concluir que las acciones de las anfetaminas sobre la bebida dependen de las circunstancias bajo las cuales ocurre la bebida. Así mismo, las anfetaminas afectan de forma diferencial a la conducta operante y a las conductas inducidas. Mientras que la conducta operante puede ser

incrementada como consecuencia de dosis moderadas de anfetaminas, estas mismas dosis no alteran o incluso reducen la bebida polidipsica.

3.2- NEUROLÉPTICOS.

Los neurolépticos o antipsicóticos son antagonistas selectivos de los receptores de dopamina. La dopamina es un neurotransmisor clasificado dentro de las catecolaminas, localizado en el SNC y en algunos ganglios del Sistema Nervioso Autónomo (SNA). Las catecolaminas están constituidas por la dopamina, la noradrenalina (o norepinefrina) y la adrenalina (o epinefrina). Tanto en el SNA como en el SNC, la dopamina es un precursor de la adrenalina y de la noradrenalina. La neurotransmisión dopaminérgica sólo ocurre en el SNC, no obstante se han encontrado receptores de dopamina en el sistema nervioso periférico, en los ganglios simpáticos, en las glándulas exocrinas, en el tracto gastro-intestinal y en las arterias mesentérica y renal.

Existen cuatro vías dopaminérgicas en el cerebro: la vía dopaminérgica mesolímbica que proyecta desde el tronco del encéfalo a las áreas límbicas del cerebro, y se piensa que controla la conducta emocional, la actividad cognitiva y el refuerzo y que, en especial, produce delirios y alucinaciones cuando está hiperactiva. Cuando estas vías se interrumpen por bloqueo de los receptores dopaminérgicos, se reducen los delirios y alucinaciones. Lo contrario ocurre cuando estas vías son activadas por fármacos estimulantes. La vía dopaminérgica

nigroestrial (sustancia negra-cuerpo estriado) que proyecta desde la sustancia negra a los ganglios basales que forman parte del sistema extrapiramidal del SNC, y que controla los movimientos. Cuando los receptores de dopamina son bloqueados en las proyecciones postsinápticas de este sistema dopaminérgico se producen trastornos del movimiento. La vía dopaminérgica mesocortical que proyecta desde el área tegmental ventral del mesencéfalo a la corteza límbica, está relacionada con la vía dopaminérgica mesolímbica. La vía dopaminérgica tuberoinfundibular que proyecta desde el hipotálamo a la glándula pituitaria anterior. El hipotálamo regula la emisión, desde la glándula pituitaria, de hormonas que influyen en otras glándulas distribuidas por todo el cuerpo, entre ellas la glándula tiroidea, la glándula adrenal y las gónadas.

Existen cinco tipos de receptores dopaminérgicos: D1A, D2, D3, D4 y D5 o D1B; estos receptores se dividen a su vez en dos familias, considerándose los receptores D1A y D5 como pertenecientes a la primera familia, y los receptores D2, D3 y D4 a la segunda. Los receptores D1 están unidos a un subtipo de proteína G que activa a la enzima adenilato ciclasa y los D2 lo están a un subtipo de proteína G que inhibe a la adenilato ciclasa (Stoof y Keabian, 1984). Todos los receptores D1 están localizados en las estructuras postsinápticas; los receptores D2 se localizan tanto presináptica como postsinápticamente. El receptor D3 se encuentra principalmente en el sistema mesolímbico, asociado con funciones emocionales y cognitivas (Kruk y Pycoc, 1991) y, al igual que el receptor D4, parece que no existe en los ganglios basales.

Los neurolépticos son fármacos utilizados en el tratamiento de la esquizofrenia y actúan principalmente bloqueando los receptores D2 de dopamina (Kandel, 1991). Los llamados neurolépticos típicos, tales como el haloperidol y la clorpromacina, son los responsables de las llamadas reacciones extrapiramidales y la discinesia tardía, ambas derivadas de las propiedades bloqueantes sobre el receptor dopaminérgico D2 en la vía nigroestriatal. Los neurolépticos atípicos (por ejemplo, clozapina) son potentes antagonistas de los receptores D1 y D4 y parecen tener menos facilidad para producir efectos extrapiramidales por ser más selectivos para los receptores mesolímbicos que para los nigroestriatales.

Se han propuesto dos hipótesis para explicar los mecanismos de acción conductual de los neurolépticos. Una de las hipótesis propone que los neurolépticos producen reducciones en las respuestas reforzadas porque actúan sobre los mecanismos motivacionales que están implicados en los procesos de reforzamiento (Wise, 1982). Existe otra serie de trabajos que proponen que los neurolépticos ejercen su acción al causar impedimentos en la iniciación o ejecución de las conductas alterando el sistema motor, reduciendo la actividad locomotora (Fowler y Mortell, 1992), las entradas al comedero y conductas como el morder, e incrementando conductas como la masticación y la latencia para coger la comida (Todd y cols., 1992).

Existe evidencia experimental de que la dopamina es un neurotransmisor que modula la ingestión de agua (Dourish, 1983; Pal, Bharathi y Thombre, 1992). Varios estudios han revelado la naturaleza facilitadora de la dopamina para aumentar la ingestión de agua debido a estímulos que provocan sed (Mailman, 1983; Fregly y Rowland, 1988). Este efecto de la dopamina correlaciona con los estudios que demuestran la inhibición de la ingestión de agua debida a la administración de antagonistas de los receptores de dopamina (Pal y cols., 1992).

La polidipsia inducida por programa es un patrón de conducta sensible a la acción de los neurolépticos. Diversos estudios han demostrado que su administración disminuye la polidipsia inducida por programa (Byrd, 1974; Porter, Goldsmith, McDonough, Heath y Johnson, 1984), así como la conducta operante (Keehn, Coulson y Klieb, 1976; Sanger y Blackman, 1989).

Byrd (1974) informó de reducciones en la bebida adjuntiva de dos chimpancés tras la administración de clorpromacina. En este experimento los sujetos fueron entrenados para obtener comida presionando una palanca de acuerdo a programa múltiple de IF RF. El agua estuvo disponible en todo momento y los sujetos bebieron con mucha frecuencia durante el componente de IF y raramente durante el componente de RF. La clorpromacina a dosis bajas (0.1 y 0.3 mg/Kg) incrementó la tasa de respuesta operante en el componente de IF y redujo dicha tasa a dosis altas (1.3 mg/Kg). La ingestión

de agua no resultó afectada por la administración de dosis bajas de clorpromacina, pero fue marcadamente reducida por dosis que también redujeron la respuesta operante, de lo que se deduce que los efectos de las drogas pueden afectar diferencialmente a la respuesta operante y a la bebida adjuntiva (ver también Byrd, 1973)

Keehn y cols. (1976) estudiaron por primera vez los efectos del haloperidol sobre la bebida adjuntiva en ratas. Los animales fueron entrenados a presionar una palanca para conseguir comida mediante un programa de IF 60 segundos con agua disponible. El haloperidol fue administrado mediante la adulteración de las bolitas de comida (0.01 mg de haloperidol en cada bolita). Tanto la bebida como la presión operante de la palanca resultaron muy reducidas. Keehn y Riusech (1977) demostraron que la administración oral de haloperidol (0.25-0.75 mg/Kg), drogando cada bolita de comida con 0.01 mg, redujo el consumo de agua y sacarina al 4% en proporción directa a la dosis, pero la ingestión de sacarina siempre fue superior a la del agua. Este resultado concuerda con la hipótesis de que el mecanismo de acción de los neurolépticos es disminuir la motivación por el reforzador (Wise, 1982).

Snodgrass y Allen (1987), en una serie de tres experimentos, compararon los efectos de la apomorfina, un agonista dopaminérgico, con los del haloperidol. El haloperidol, a dosis de 0.05 y 0.3 mg/Kg, produjo reducciones dependientes de la dosis en la presión operante de palanca y en la

olidipsia inducida por programa. A dosis más altas, el haloperidol también disminuyó la frecuencia de reforzamiento. En el segundo experimento, utilizando un programa de IF 90 segundos y 0.1, 0.2 y 0.3 mg/Kg de haloperidol, demostraron que las reducciones en la polidipsia inducida por programa fueron debidas al efecto del haloperidol y no a posibles cambios en la tasa de reforzamiento, ya que los animales consiguieron todos los reforzadores a pesar de la disminución en la tasa de presión de palanca. El tercer experimento demostró que el haloperidol redujo la bebida inducida por privación de agua adelantando el momento en que las ratas dejaron de beber, a diferencia de la apomorfina que retrasó el comienzo de la bebida. Según estos investigadores, el haloperidol interfiere con el feedback sensorial necesario para mantener la conducta consumatoria de beber, mientras que la apomorfina produce déficit motores que interfieren con dicha conducta consumatoria.

Porter y cols. (1984) demostraron que la administración crónica durante 15 días de los antagonistas D2 pimozide (0.5 y 1.0 mg/Kg) y spiperone (0.062 y 0.125 mg/Kg) suprimió la adquisición de bebida inducida por un programa de IF 1 minuto de reforzamiento con comida en ratas. Sin embargo, las mismas dosis de pimozide y spiperone no afectaron a la bebida inducida por privación, ni a la bebida ad libitum. La presión operante de la palanca tampoco resultó afectada por dichos antagonistas dopaminérgicos. Estos resultados sugieren que la supresión de la bebida adjuntiva no se puede atribuir a un efecto general de los antagonistas dopaminérgicos en todo comportamiento de ingestión de

líquidos. Snodgrass y Allen (1989) realizaron un estudio para determinar si los resultados de Porter y cols. (1984) con el pimozide fueron debidos a una acción específica del pimozide sobre la polidipsia inducida por programa, o si, por el contrario, fue el resultado de un efecto diferencial sobre una conducta en adquisición (la bebida adjuntiva) y una conducta que ya estaba establecida (la presión operante de la palanca). Snodgrass y Allen (1989) administraron 1.0 mg/Kg de pimozide 30, 60 y 120 minutos antes de la sesión experimental, dependiendo de los grupos, mientras que los sujetos de control recibieron el vehículo de la droga con los mismos intervalos inyección-sesión. Los resultados indicaron que, tanto la adquisición de la bebida inducida, como la conducta operante, fueron afectados de forma semejante y dependiendo del intervalo de tiempo desde la administración de la droga. El pimozide causó una alteración en la distribución temporal entre reforzamientos de la bebida adjuntiva inducida y de la respuesta operante. Los autores abogan porque este resultado podría haber sido causado por una alteración en la integración sensoriomotora, debido a las propiedades bloqueadoras de la dopamina que posee el pimozide. Además, estos resultados contradicen los encontrados por Porter y cols. (1984) y concuerdan con la hipótesis de que el sistema dopaminérgico se relaciona por igual con la conducta operante y adjuntiva.

Todd y cols. (1992) examinaron los efectos conductuales y neuroquímicos del SCH-23390 (antagonista dopaminérgico que actúa a través de los receptores D1 de dopamina) y del haloperidol sobre la polidipsia

inducida por programa, medidos a través del volumen medio de agua consumido y del porcentaje de tiempo que los sujetos estuvieron bebiendo de la botella en comparación con una condición pre-droga. Se midieron también los porcentajes de tiempo por sesión utilizados en conductas como masticar, morder, levantarse sobre los cuartos traseros, actividad locomotora e inmovilidad. El haloperidol redujo la polidipsia inducida por programa de forma dependiente de la dosis, tanto en ml de agua consumida como en el tiempo empleado en beber. El mismo resultado se obtuvo con el SCH-23390. El tiempo utilizado en masticar resultó incrementado, de forma dependiente de la dosis, por las dos drogas, al igual que el tiempo en estado de inmovilidad. Por el contrario, el tiempo utilizado en morder fue disminuido por las dos drogas de forma dependiente de la dosis. La conducta de levantarse sobre los cuartos traseros no se mostró afectada de forma significativa por las drogas. Por último, el haloperidol, pero no el SCH-23390, redujo de forma dependiente de la dosis la actividad locomotora. La cantidad de tiempo total empleada por los animales en actividades orales no cambió, debido a que la conducta de masticar sustituyó a la conducta de beber. Los autores argumentan que la conducta polidíptica puede ser un buen modelo para examinar neurolepticos debido a su extensa sensibilidad a los efectos extrapiramidales, pues tanto los antagonistas D1 (SCH-23390) como los D2 (haloperidol) dan lugar a una conducta excesiva de masticar que es un movimiento distónico típico del tratamiento con neurolepticos y se puede considerar como uno de los síntomas del síndrome extrapiramidal. Los autores intuyen que si la clozapina o el SCH-

23390, drogas que han demostrado que tienen menos efectos extrapiramidales, produjeran la conducta de masticar no regulatoria en un paradigma de inducción polidíptica, entonces podríamos estar ante un modelo de conducta extremadamente sensible a los efectos extrapiramidales de las sustancias potencialmente neurolépticas. Estos autores concluyen que la polidipsia inducida por programa podría ser un buen modelo para estudiar los fármacos neurolépticos basándose en los efectos extrapiramidales.

Didriksen y Christensen (1992) y Olsen, Didriksen y Christensen (1992) han investigado si la polidipsia inducida por programa pudiera ser un buen modelo de los efectos antipsicóticos de los neurolépticos. Estos efectos antipsicóticos son mediados por el sistema mesolímbico (Kandel, 1991) y la bebida polidíptica depende de la integridad de las proyecciones mesolímbicas (Robbins y Koob, 1980; Wallace y cols., 1983; Mittleman y cols., 1990). Didriksen y Christensen (1992) indujeron bebida polidíptica en ratas mediante un programa de TF 1 minuto de liberación intermitente de comida en sesiones experimentales de 20 minutos. Los neurolépticos fueron administrados diariamente durante 21 días mediante inyecciones subcutáneas 30 minutos antes del comienzo de la sesión. Tras la retirada de la administración de drogas, los animales fueron evaluados durante 7 días en los que recibieron salino. Encontraron que los neurolépticos atípicos, a dosis clínicamente relevantes, no suprimieron el consumo de agua tanto como lo hicieron los neurolépticos

típicos. Por tanto, la polidipsia inducida por programa puede ser utilizada como una herramienta conductual para diferenciar neurolépticos típicos y atípicos.

De todo esto se deduce que los neurolépticos reducen tanto la conducta operante como la bebida inducida por programa, y que esta última conducta ha sido propuesta en los últimos años como un modelo animal adecuado para estudiar los efectos farmacológicos y conductuales de los neurolépticos.

3.3- ANSIOLÍTICOS.

El término ansiolítico ha sido utilizado para describir la categoría de drogas que se utilizan en el tratamiento de la ansiedad patológica. La primera sustancia que se introdujo específicamente como sedante y después como hipnótico fue el bromide, entre 1853 y 1864. Sólo cuatro sustancias hipnótico sedativas estuvieron en uso antes de 1900: el hidrato de cloro, el paraldehído, el uretano y el sulfonal. Los primeros tratamientos para la ansiedad generalizada fueron los barbitúricos (barbital y fenobarbital), que sirvieron como ansiolíticos hasta la década de los sesenta. Estos agentes poco tenían que ver con una acción ansiolítica específica: reducían meramente la ansiedad en proporción a su capacidad sedante. La necesidad de separar las propiedades hipnótico sedativas de las anticonvulsivas, que coexistían en estos fármacos, condujo a la búsqueda de sustancias con efectos más selectivos sobre el SNC y que no tuvieran los fuertes efectos depresores que sobre éste producían los barbitúricos. Todo esto

llevo a la síntesis, en 1957, del clordiacepóxido. Con su introducción en la práctica clínica en 1961, dio comienzo la era de las benzodiazepinas (véase la Tabla 3.1). Estos agentes revolucionaron el tratamiento de la ansiedad. Los agentes anteriores trataban la ansiedad esencialmente sustituyendo sedación por ansiedad, cuando se introdujeron las benzodiazepinas se observaron por primera vez acciones verdaderamente ansiolíticas, ya que la reducción de los síntomas de ansiedad no se asociaba con un simple enmascaramiento por sedación. El perfil farmacológico de las benzodiazepinas y de los barbitúricos es similar y se caracteriza por mostrar efectos anticonvulsivos, ansiolíticos, de relajación muscular y propiedades hipnótico sedativas. Es cierto que algunas benzodiazepinas son más sedantes que otras. Sin embargo, las benzodiazepinas sedantes se utilizan más para promover e inducir el sueño, como sedantes-hipnóticos, que como ansiolíticos. Aquellas benzodiazepinas utilizadas como ansiolíticos son verdaderamente ansioselectivas; esto es, producen efectos antiansiedad por otros medios distintos al de producir sedación (Stahl, 1998).

Tabla 3.1. Algunas de las principales benzodiazepinas.

Alprazolam	Lorazepam	Triazolam	Quazepam	Loprazolam
Clonazepam	Oxazepam	Temazepam	Flumazenil	Clobazam
Diazepam	Prazepam	Flurazepam	Mitrazepam	Flunitrazepam
Clordiacepóxido	Clorazepato	Midazolam	Lormetazolam	Brotizolam

En la década de los 80 entró en la clínica una nueva sustancia, la buspirona, un compuesto del grupo clínico de las azapironas que demostró ser un ansiolítico fuertemente efectivo y que a diferencia de las benzodiazepinas y de los barbitúricos, no presenta efectos anticonvulsivos, hipnótico sedativos ni miorelajantes. La buspirona no ejerce su acción a través del receptor para benzodiazepinas (Barrett, Witkin, Mansbach, Skolnick y Weissman, 1986), sino que esta sustancia ejerce su acción ansiolítica como agonista parcial del neurotransmisor denominado serotonina, y en concreto a través de los receptores 5-HT_{1A} (Gleeson, Ahlers, Mansbach, Foust y Barrett, 1989; Kruk y Pycocock, 1991). Su desventaja, comparada con las benzodiazepinas, consiste en el retraso en el inicio de su acción. Esto ha llevado a creer que los agonistas 5-HT_{1A} ejercen sus efectos en virtud de acontecimientos adaptativos neuronales y a nivel de los receptores, más que por la mera ocupación aguda de estos, actuando mediante adaptaciones en los receptores de los neurotransmisores, y que hace diferente el mecanismo de acción de los agonistas parciales 5-HT_{1A} del de los ansiolíticos benzodiazepínicos, que actúan de forma relativamente aguda por ocupación de los receptores de benzodiazepinas (Stahl, 1998). Las ventajas de los agonistas parciales 5-HT_{1A} sobre los agentes benzodiazepínicos incluyen la ausencia de interacciones farmacológicas con el alcohol, con las benzodiazepinas y con los sedantes-hipnóticos, y la no producción de dependencia o de síntomas de abstinencia.

Comprender las acciones de los fármacos ansiolíticos requiere un conocimiento básico de la farmacología GABAérgica. El GABA es el principal

neurotransmisor inhibitorio que existe en el cerebro. Las neuronas GABAérgicas utilizan GABA como neurotransmisor. El GABA se sintetiza a partir del aminoácido precursor glutamato por medio del enzima descarboxilasa del ácido glutámico. El glutamato procede de los almacenes intraneurales de aminoácidos. Es el aminoácido libre más abundante en el SNC. Los receptores GABA también regulan la neurotransmisión GABAérgica.

Existen varios tipos conocidos de receptores GABA. Los receptores GABA A están modulados alostéricamente por un conjunto de receptores cercanos que incluyen a los receptores para benzodiazepinas y barbitúricos. Estos compuestos más que tener efecto por sí mismos, actúan aumentando la frecuencia de apertura del canal del cloro (Kruk y Pycock, 1991). Las benzodiazepinas son moduladores alostéricos positivos de la neurotransmisión inhibitoria rápida del GABA en los receptores GABA A. Así pues, la modulación alostérica positiva de las benzodiazepinas sobre los receptores GABA A tiene lugar porque las benzodiazepinas son agonistas completos en el sitio de las benzodiazepinas. Sin embargo, una modulación alostérica negativa puede ocurrir cuando un agonista inverso se liga al sitio benzodiazepínico. En lugar de aumentar la conductancia al cloro que provoca el GABA A, el agonista inverso la disminuye. Esto puede traducirse en acciones conductuales opuestas de los agonistas frente a los agonistas inversos. Por ejemplo, los agonistas completos de las benzodiazepinas reducen la ansiedad aumentando la conductancia al cloro, sin embargo, un agonista inverso causa ansiedad, y lo hace disminuyendo la conductancia al cloro.

Sería de esperar que los agonistas inversos benzodiazepínicos fueran no sólo ansiogénicos (generadores de ansiedad), sino también proconvulsivantes (aumentan la probabilidad de convulsiones), activadores (lo opuesto a sedación) y promnésicos (promotores de la memoria). Un punto intermedio en el espectro agonista lo ocupa el agonista parcial, que tiene la posibilidad teórica de separar los efectos deseados (el efecto ansiolítico) de los efectos no deseados (sedación diurna, ataxia, alteración de la memoria, dependencia y abstinencia). Esto es, los agonistas completos ejercen teóricamente el repertorio completo de acciones benzodiazepínicas, mientras que un agonista parcial separaría aquellas acciones que al parecer sólo requieren un agonismo parcial (los efectos ansiolíticos) de aquellas que parecen requerir un agonismo completo (la sedación y la dependencia). Las manipulaciones farmacológicas de las benzodiazepinas han avanzado hasta el punto de desarrollar un antagonista, el flumazenil, que puede bloquear las acciones de las benzodiazepinas y revertir sus efectos (Stahl, 1998).

Parecen existir muchas localizaciones, receptores y puntos de modulación de este importante complejo receptor GABA A: el propio GABA como guardián del canal de cloro y las benzodiazepinas, los convulsivantes, los anticonvulsivantes y el alcohol como moduladores alostéricos, capaces de manifestar sus peculiares efectos neurológicos y conductuales mediante acciones diferentes en una constelación de receptores únicos y diferenciados organizados en este complejo (Stahl, 1998). Hay múltiples formas moleculares de los receptores benzodiazepínicos, pudiendo existir hasta cinco subtipos de receptor

benzodiazepínico. Por ejemplo, los receptores benzodiazepina-1 (algunas veces llamado omega-1) abundan preferentemente en el cerebelo y contienen sitios de reconocimiento con altas afinidades, tanto para las benzodiazepinas como para agentes con diferentes estructuras químicas. La acción ansiolítica, así como las acciones sedante-hipnóticas, parecen estar mediadas principalmente a través del subtipo de receptor benzodiazepina-1. Por otra parte, los receptores benzodiazepina-2 (omega-2) se localizan predominantemente en la médula espinal y en el estriado. Estos receptores pueden estar implicados en la mediación de las acciones relajantes musculares de las benzodiazepinas. Finalmente, el receptor benzodiazepina-3, también conocido como el tipo "periférico" (esto es, fuera del SNC), es abundante en el riñón. Su papel en las acciones ansiolíticas todavía no está claro.

Se piensa, por tanto, que las acciones en los receptores benzodiazepínicos subyacen virtualmente a todas las acciones farmacológicas de las benzodiazepinas, tanto las deseables como las indeseables. Esto incluye las acciones terapéuticas deseables de las benzodiazepinas como ansiolíticos, como sedantes hipnóticos o como anticonvulsivantes y relajantes musculares. También incluye sus efectos colaterales indeseables como agentes amnésicos y como agentes que, administrados crónicamente, causan adaptaciones en el receptor benzodiazepínico y son probablemente responsables de la producción de dependencia y de abstinencia (Stahl, 1998).

El segundo subtipo de receptor GABA es el denominado receptor GABA B. Este receptor no está modulado alostéricamente por las benzodiazepinas, sino que se liga selectivamente al relajante muscular baclofen. Su papel fisiológico todavía no es bien conocido, pero no parece estar íntimamente ligado a los trastornos de ansiedad o a los ansiolíticos. La estimulación del receptor GABA B se manifiesta por cambios en la conductancia del potasio y es un proceso más lento que el mediado por los receptores GABA A. Los receptores GABA B pueden estar localizados en las terminales presinápticas donde la entrada del calcio en la terminal resulta reducida, lo cual produce disminuciones en la liberación sináptica del neurotransmisor en respuesta a la estimulación presináptica (Kruk y Pycock, 1991).

La polidipsia inducida por programa es también un patrón de conducta sensible a los efectos de las drogas ansiolíticas. Las distintas investigaciones que se exponen a continuación arrojan resultados que indican que en el caso de los barbitúricos estos tienden a disminuir la polidipsia inducida por programa, y, que las benzodiazepinas a dosis moderadas aumentan el volumen de agua ingerido aunque no desplazan la distribución temporal de la bebida inducida, de la misma manera, en que lo hacen las anfetaminas, pues en su caso lo que se produce es una reducción en el máximo de respuestas que se produce al principio del intervalo entre reforzadores.

Falk (1964) encontró que el barbitúrico pentobarbital a dosis de 2 mg/Kg redujo los niveles de bebida adjuntiva en ratas. Existen varios trabajos en los que se ha demostrado que la administración periférica de benzodiazepinas facilita la bebida adjuntiva. Bacotti y Barret (1976) indujeron bebida polidíptica en ratas mediante un programa múltiple de RF 80 IF 2 min, alternando los componentes después de la liberación de cada bolita de comida, obteniendo mayor cantidad de bebida en el componente de IF que en el de RF en tres de los animales utilizados, mientras que en el cuarto ocurrió lo contrario. Posteriormente, la administración de clordiazepóxido (1.0, 3.0, 5.6 y 10.0 mg/Kg) incrementó la cantidad de agua consumida y la tasa de lametones dependiendo del componente del programa. Los autores concluyeron que el efecto de la droga venía determinado por las tasas de bebida en condiciones de control, de tal forma que las tasas bajas se incrementaron más que las tasas altas.

Sanger y Blackman (1976) desarrollaron y mantuvieron bebida adjuntiva en ratas mediante un programa de TF 60 segundos. Una vez estabilizado el nivel de bebida, administraron diazepam (0.1, 0.3, 1.0, 3.0 y 5.6 mg/Kg) y ripazepam (1.0, 3.0, 10.0, 30.0 y 56.0 mg/Kg). Las dosis bajas de estas drogas produjeron pequeños incrementos en la cantidad de agua consumida, pero no así en el número de lametones. Las dosis más altas redujeron, sin embargo, tanto el nivel de agua consumido como el número de lametones. Según los autores, estos resultados podrían deberse al hecho de que las benzodiazepinas alteran la

topografía de bebida de las ratas, haciéndolas consumir más cantidad de agua en cada lametón.

Los resultados de estos experimentos demuestran que los efectos de las benzodiazepinas sobre la bebida adjuntiva pudieran deberse a que éstas cambian la forma de beber, ya que se produce un incremento en la cantidad de agua consumida (Barrett y Weinberg, 1975; Bacotti y Barrett, 1976; Sanger y Blackman, 1976), pero no en el número de lametones (McKearney, 1973; Sanger y Blackman, 1976).

Mittleman, Jones y Robbins (1988) indujeron bebida polidíptica en ratas mediante un programa de TF 60 segundos de liberación de dos bolitas de comida. Posteriormente les administraron diazepam a dosis de 0.3, 1.0, 3.0 y 5.0 mg/Kg. La cantidad de agua ingerida fue reducida de forma dependiente de la dosis: las dosis más pequeñas no tuvieron efecto y las dosis mayores redujeron significativamente tanto el volumen de agua ingerido como la tasa de lametones, así como también la distribución temporal de la tasa de bebida en los intervalos entre reforzamientos, reduciéndose la cantidad de respuestas dadas al principio del intervalo en comparación con la condición pre-droga. El número de entradas al comedero no se vio afectado por ninguna dosis de diazepam, pero las dosis más altas sí afectaron la distribución temporal de los mismos, reduciéndose estos durante la última mitad del intervalo. La actividad locomotora también se vio afectada por dosis altas de diazepam, resultando reducidas las tasas altas que se

venían dando hacia la mitad del intervalo, aunque la media total de actividad locomotora durante el intervalo no se vio afectada.

Pellón y cols. (1992) administraron dosis de diazepam (0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mg/Kg) en tres ratas para observar sus efectos sobre la bebida polidíptica inducida por un programa de TF 60 segundos. Las dosis más bajas de esta droga (0.5 y 1.0 mg/Kg) produjeron pequeños aumentos en la cantidad de agua ingerida medida en ml, pero no así las dosis de 2.0 y 4.0 mg/Kg. La dosis de 4.0 mg/Kg sólo produjo una disminución significativa de ingestión de agua en una de las ratas. En la medida de lametones por intervalo, las dosis más bajas de diazepam produjeron ligeros aumentos en las tasas de bebida en todos los animales y la dosis más alta produjo un descenso en todas las ratas.

Pellón y Blackman (1992) encontraron que el diazepam no cambia la distribución de los lametones en los intervalos entre reforzamientos, excepto para las dosis de 2.0 y 4.0 mg/Kg en una de las ratas. Estos resultados confirman que el diazepam reduce el máximo de la tasa de lametones en los intervalos entre reforzamientos, pero sin producir desplazamiento en la distribución temporal de los mismos y sin producir reducciones en la tasa global de ingestión de agua.

En animales privados de agua, las benzodiazepinas y los barbitúricos incrementan el nivel de consumo de agua y parece ser que este efecto no es debido a la tasa local de ingestión de líquido, sino a un incremento en la duración

de la conducta de beber (Cooper y Estall, 1985). El incremento en el consumo de agua tras los tratamientos con benzodiazepinas no parece ser un efecto secundario a los efectos ansiolíticos y sedativos de éstas, ya que la hiperdipsia parece mediada por la acción de la droga sobre los receptores de benzodiazepinas, debido a que este efecto puede ser antagonizado por el flumazenil, antagonista de los receptores de benzodiazepinas (Cooper, 1982).

Existen diversos estudios sobre los efectos de los ansiolíticos sobre la bebida inducida por programa reducida mediante procedimientos de castigo. Pellón y cols. (1992) investigaron los efectos del diazepam (0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mg/kg) sobre la bebida polidíptica castigada y mantenida por un programa de TF 60 segundos de presentación de la comida. La contingencia de castigo consistió en que cada lametón al pitorro de la botella iniciaba una demora de 10 segundos en la liberación de la siguiente bolita de comida (castigo negativo), dando esto lugar a un bajo nivel de ingestión de agua y de lametones por intervalo, los cuales no resultaron incrementados por ninguna de las dosis de diazepam.

Flores y Pellón (1998) estudiaron los efectos de la *d*-anfetamina, el diazepam (0.5-8.0 mg/kg) y la buspirona sobre la polidipsia castigada que había sido inducida por un programa de TF 60 segundos. La contingencia de castigo consistió en que cada lametón al pitorro de la botella por parte de las ratas experimentales estuvo seguido por una descarga eléctrica (0.05, 0.1 o 0.2 mA), mientras que las ratas de control recibieron la misma descarga pero

independientemente de sus lametones a la botella. Los resultados demostraron que la polidipsia inducida por programa puede ser reducida por la presentación intermitente de descargas eléctricas contingentes a la conducta de beber, y que las tasas de bebida castigada obtenidas mediante este procedimiento fueron incrementadas significativamente por el diazepam, probándose así los efectos anticastigo del mismo, puesto que las tasas de polidipsia obtenidas mediante el procedimiento de presentación no contingente de descargas eléctricas no fueron incrementadas por ninguna de las dosis del diazepam, y que este efecto fue más marcado con niveles intermedios de intensidad de la descarga eléctrica. Los efectos anticastigo de las drogas se restringieron al diazepam, ya que el efecto no fue compartido por la buspirona ni por la *d*-anfetamina. Flores y Pellón (2000) investigaron los efectos del diazepam (0.3-10.0 mg/kg) sobre la polidipsia castigada por descargas eléctricas dependientes e independientes de la respuesta. Los resultados demostraron que dosis intermedias o moderadas de diazepam disminuyeron la polidipsia castigada por una descarga contingente a la respuesta, la cual producía altas tasas de supresión en la bebida polidíptica, e incrementaron la tasa de bebida producida como consecuencia de respuestas no contingentes a la descarga, en las que la supresión de la bebida fue menor. Estos resultados demostraron que los efectos anticastigo de las benzodiazepinas pueden depender del nivel de supresión previo obtenido con los procedimientos de castigo, ya que tasas bajas de bebida castigada se incrementaron tras la administración del diazepam y se disminuyeron las tasas más altas.

4. EXPERIMENTO I

EFECTOS DOPAMINÉRGICOS DE LA *d*-ANFETAMINA, SOBRE LA POLIDIPSIA INDUCIDA POR PROGRAMA EN RATAS*

4.1- INTRODUCCIÓN

Cuando una rata es privada de comida pero dispone de agua libremente en todo momento, si es sometida a un programa de reforzamiento intermitente de presentación de comida, la rata bebe grandes cantidades de agua concurrentemente con su ejecución operante en el programa de reforzamiento. Esta conducta se denominó polidipsia inducida por programa (Falk, 1961). La polidipsia inducida por programa ha sido propuesta como prototipo de una

* Trabajo publicado en The Psychological Record, 2007, 57, 339-357.

clase de conducta llamada conducta adjuntiva que fue originariamente considera diferente de la conducta operante mantenida por sus consecuencias (Falk, 1971; Staddon, 1977). Aproximaciones recientes, sin embargo, sugieren que las contingencias operantes pueden estar involucradas en el desarrollo y mantenimiento de la conducta adjuntiva (Arday y Pellón, 2004; Palya, 1993).

Sanger y Blackman (1978) hicieron una revisión de los efectos de las drogas sobre la conducta adjuntiva y propusieron que una manera de aclarar la naturaleza de la conducta adjuntiva sería determinar si los efectos de las drogas sobre los patrones de conducta adjuntiva, tales como la polidipsia inducida por programa, son similares a los efectos de las drogas sobre la conducta operante mantenida por sus consecuencias. Muchos estudios sobre la conducta adjuntiva castigada y no castigada han producido resultados similares a los que implican a la conducta operante, tales como los efectos de dependencia de tasa de las anfetaminas y los efectos anticastigo de las benzodiazepinas (Pellón y Flores, 2009). Un paso más allá en la farmacología de la conducta adjuntiva sería examinar las implicaciones del sistema dopaminérgico en la propia conducta, y los efectos neurofarmacológicos de las drogas psicoestimulantes, tal como se encontró en los sistemas motivacionales relacionados con el reforzamiento.

Hay importantes evidencias de la implicación del sistema dopaminérgico en el desarrollo de la polidipsia inducida por programa (Flores y Pellón, 2001). Por ejemplo, administraciones repetidas de *d*-anfetamina

facilitan el desarrollo de polidipsia inducida por programa (Mittleman y Valestein, 1994). Lesiones en el núcleo accumbens reducen el desarrollo y mantenimiento de polidipsia inducida por programa (Mittleman y cols., 1990; Robbins y Koob, 1980; Wallace y cols., 1983). Incrementos de los niveles de la dopamina extracelular en el núcleo accumbens también correlacionan con el desarrollo de polidipsia inducida por programa (Weisenborn y cols., 1996).

Los compuestos antidopaminérgicos reducen la polidipsia inducida por programa (Porter y cols., 1984; Snodgrass y Allen, 1987; Todd y cols., 1992; Didriksen, Olsen y Christensen, 1993; Didriksen y Christensen, 1993, 1994; Mittleman, y cols., 1994;). Todd y colaboradores, por ejemplo, encontraron que el SCH-23390 (antagonista selectivo de los receptores dopaminérgicos D1) y el haloperidol (antagonista de los receptores dopaminérgicos D2) reducen el consumo de agua pero incrementan la conducta de masticar, lo que les llevó a concluir que la polidipsia inducida por programa podría ser un buen modelo para evaluar los propios efectos de las drogas neurolepticas y sus consecuencias extrapiramidales. Sin embargo, Didriksen y Christensen (1993) argumentan que la supresión de la polidipsia inducida por programa mediante antagonistas dopaminérgicos no se debe a su efectos extrapiramidales, porque la supresión no se antagonizó con la escopolamina (droga anticolinérgica utilizada para contrarestar la distonía inducida por neurolepticos) o por el diazepam (benzodiazepina utilizada para contrarestar la acatisia).

La administración de anfetamina en dosis pequeñas o moderadas no afecta ni disminuyen el desarrollo y mantenimiento de la polidipsia inducida por programa (Byrd, 1973; McKearney, 1973; Smith y Clark, 1975; Sanger, 1978b; McMillan, 1979; Williams y White, 1984; Flores y Pellón, 1995). Por ejemplo, Sanger encontró que la *d*-anfetamina a dosis entre 0.25 y 2.0 mg/kg no afecta ni disminuye los niveles de la bebida adjuntiva mantenida con programas de tiempo fijo e intervalo fijo de reforzamiento con comida. Las dosis de *d*-anfetamina no alteran las tasas totales de respuesta, sin embargo, incrementan el nivel de lametones que ocurre al comienzo del intervalo entre reforzadores (Flores y Pellón, 1997; Pellón y Blackman, 1992).

Se han comprobado los efectos de otros agonistas dopaminérgicos tales como el SKF38393 (agonista selectivo de los receptores dopaminérgicos D1) y quinpirol (agonista selectivo de los receptores dopaminérgicos D2) sobre la polidipsia inducida por programa, encontrándose que ambos reducían la bebida adjuntiva dependiendo de la dosis (Mittleman y cols., 1994). Tanto los agonistas como los antagonistas dopaminérgicos reducen la polidipsia inducida por programa, Mittleman y cols. (1994) sugirieron que los cambios producidos en la bebida adjuntiva por la administración de los compuestos dopaminérgicos podían deberse a cambios en el balance de activación de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 fuera de los niveles óptimos, así como a cambios en los niveles totales de neurotransmisión dopaminérgica.

Las anfetaminas ejercen la mayoría de sus efectos conductuales a través del sistema dopaminérgico, liberando dopamina o inhibiendo su recaptación (Robbins y cols., 1990), por tanto se puede suponer que los neurolépticos y otras drogas antagonistas de los receptores dopaminérgicos puedan bloquear los efectos de la anfetamina sobre la conducta. El haloperidol, la clorpromazina y la clozapina bloquean las claves estimulares y las estereotipias inducidas por la anfetamina, pero no antagonizan la reducción en la tasa de respuesta operante producida por dosis intermedias de *d*-anfetamina (Colpaerts, Niemegeers y Jansen, 1978; Miczed y Yoshimura, 1982; Nielsen y Jepsen, 1985; Tschanz y Rebec, 1988; Callaham, Appel y Cunningham, 1991). Antagonistas selectivos de los receptores D1 y D2 bloquean el aprendizaje de preferencia del lugar inducido por la anfetamina (Leone y DiChiara, 1987), y atenúan el efecto de la anfetamina sobre el reforzamiento condicionado (Ranaldi y Beninger, 1993). No se tiene constancia de estudios previos en los que la coadministración de *d*-anfetamina y antagonistas dopaminérgicos hayan sido probados sobre la polidipsia inducida por programa.

Los experimentos que se presentan a continuación examinan la implicación del sistema dopaminérgico en los efectos de la *d*-anfetamina sobre la polidipsia inducida por programa y cómo esas relaciones afectan a la naturaleza de la conducta adjuntiva. Se determinó la curva de dependencia de dosis de la *d*-anfetamina, así como las de los antagonistas dopaminérgicos SCH-23390 (antagonista selectivo de los receptores D1), eticlopride

(antagonista selectivo de los receptores D2) y flupentixol (antagonista de los receptores D1 y D2), y las de los agonistas dopaminérgicos SKF-38393 (agonista selectivo de los receptores D1) y quinpirole (agonista selectivo de los receptores D2). Posteriormente se combinaron dosis de los antagonistas y agonistas dopaminérgicos con dosis de *d*-anfetamina.

4.2-MÉTODO.

Sujetos.

Se utilizaron 7 ratas albinas macho de la cepa Wistar, procedentes de la casa Harlam Ibérica, S.A. (Gannat, Francia), experimentalmente ingenuas, con una edad aproximada de 90 días y un peso medio de 403.6 g (rango: 374-437 g) al comienzo del experimento. Estuvieron enjauladas individualmente en el animalario donde se controlaba tanto la temperatura (20°C) como el ciclo de luz-oscuridad (8am/8pm). Se les sometió a un control alimenticio diario para mantenerlas en el 80% (± 10 g) de su peso libre. Se pesaban las ratas antes de cada sesión experimental, y al terminar ésta, se les administraba suficiente comida suplementaria, pero nunca antes de transcurridos 15 minutos desde el final de cada sesión. Dispusieron de agua limpia y fresca en todo momento. Las ratas fueron tratadas siguiendo la Directiva del Consejo de la Comunidad Europea del 24 de Noviembre de 1986 (86/609/EEC).

Aparatos.

Se utilizaron 4 cajas de condicionamiento operante para roedores LI-836 (Letica S.A., Barcelona, España), de 29 cm de largo x 24.5 cm de ancho x 35.5 cm de alto, instaladas en cubículos ventilables que les aislaba de cualquier estimulación ambiental. El techo y la pared izquierda de cada caja estaban hechos de material acrílico transparente. El resto de las paredes era de material acrílico opaco. Una botella de agua estaba sujeta en la cara externa de la pared derecha de cada caja, su tetina accesible al sujeto a través de una abertura de 3.2 cm de ancho y 3.9 cm de alto, situada a 20 cm de la pared frontal y a 7 cm sobre el suelo. La tetina se dispuso a 2 cm de la abertura de la pared, de este modo la rata podía lamer pero no podía mantener un contacto permanente con ella. Los lametones a la tetina fueron detectados al cerrar el circuito eléctrico entre los pulsos formados sobre las 16 barras paralelas metálicas que constituían la rejilla del suelo y el de la tetina del biberón, por el contacto con la lengua del animal. La iluminación de las cajas fue a través de dos luces internas de 3 W, situadas en la parte superior del panel frontal a ambos lados del comedero, y una luz ambiente de 25 W colocada en la carcasa externa. El ruido ambiental producido por la ventilación fue de 60 dB, y sirvió para enmascarar otros posibles ruidos externos. Un expendedor de la marca Letica Instruments, colocado en la cara externa del panel frontal de cada caja, permitió administrar bolitas de comida de 45 mg de peso (Bio-Serv, Frenchtown, New Jersey, USA) a un pequeño receptáculo interno situado en el

centro de la pared frontal a 3.7 cm del suelo, que sirvió como comedero. La programación y el registro de los eventos se realizaron a través de un microordenador de la serie Archimedes (Paul Fray Ltd.) programado en Arachnid.

Procedimiento Conductual.

Una vez reducido el peso de los animales al 80% se calculó para cada uno de ellos su línea base de ingestión de agua. Durante dos días se depositó en sus jaulas hogar un platillo con 60 bolitas de comida durante una hora y se midió la cantidad de agua consumida. Este procedimiento permite determinar la cantidad de agua ingerida durante el mismo período de tiempo que posteriormente se utilizará en las sesiones experimentales y con la misma cantidad de comida, aunque ahora toda junta y no presentándola de manera intermitente (cf. Pellón y Blackman, 1987).

Se sometió a los sujetos a un entrenamiento previo al comedero durante un día para que se acostumbrasen a las cajas experimentales. Se introdujeron los animales en sus correspondientes cajas de condicionamiento durante una hora, donde se habían depositado aproximadamente 20 bolitas de comida en el comedero. Las luces de las cajas estuvieron encendidas y el ventilador en marcha, pero la botella de agua no estuvo disponible y no se programó ninguna contingencia experimental.

Después comenzó el experimento propiamente dicho. Las botellas se llenaron con 100 ml de agua fresca y se colocaron en las cajas antes de cada sesión experimental. Se sometió a los animales a un programa de Tiempo Fijo (TF) 60-s de liberación de comida durante 50 sesiones experimentales de 1 hora de duración, 5 días por semana. Cada sesión se inició con la iluminación de las cajas, y las bolitas de comida se liberaban a intervalos regulares de 60-s independientemente de la conducta del sujeto.

Para cada rata y en cada sesión se recogieron las siguientes medidas: a) la cantidad total de agua ingerida de la botella (este cálculo se realizó restando a los 100 ml originales, el residuo de agua sobrante después de cada sesión), b) el número total de lametones al pitorro de la botella, obteniendo así el número de lametones por minuto, y c) el número de lametones al pitorro de la botella en segmentos sucesivos de 2 seg. del intervalo entre reforzadores, lo que permitió calcular el cuarto de vida (véase posteriormente).

Procedimiento Farmacológico: Antagonistas Dopaminérgicos.

Una vez finalizado el procedimiento conductual, cuando la conducta de los sujetos mostró pocas variaciones de sesión a sesión, se inició el procedimiento farmacológico. A las ratas 11, 12 y 13 se les administraron intraperitonealmente el antagonista selectivo de dopamina D1 SCH-23390, a dosis de 0.001, 0.003 y 0.01 mg/kg, 15 min antes de la sesión experimental. A continuación se administró i.p. el antagonista selectivo de dopamina D2 eticlopride a dosis de 0.001, 0.003, 0.01 y 0.03 mg/kg, 30 min antes de la sesión. Finalmente, se probaron los efectos de la administración i.p. del antagonista no selectivo de dopamina flupentixol, a dosis de 0.03, 0.1 y 0.3 mg/kg, 30 minutos antes de la sesión experimental. Las drogas se disolvieron en agua destilada y se inyectaron en un volumen de 1 ml/kg. Cada droga se administró en sesiones independientes, y para cada una de ellas el orden de las dosis fue aleatorio.

A continuación, los animales fueron inyectados con dosis de 0.3, 1.0 y 3.0 mg/kg de *d*-anfetamina sulfato. La droga se disolvió en 10% de suero fisiológico salino y se inyectó en forma de 1 ml/kg i.p 10 minutos antes de cada sesión experimental. Las dosis se administraron en un orden aleatorio y fueron precedidas 20 minutos antes por una inyección de agua destilada en un volumen de 1ml/kg.

Finalmente, se procedió a evaluar la combinación de la *d*-anfetamina con dosis de los antagonistas en sesiones independientes, siguiendo la siguiente pauta: se administró SCH-23390 (0.001, 0.003, 0.01 mg/kg) 15 min. antes de la sesión experimental, y transcurridos 5 min. se administró la dosis de 1.0 mg/kg de *d*-anfetamina; 10 min. después se introdujo a los animales en las cajas experimentales. Con las dosis de eticlopride (0.01, 0.03 mg/kg) y flupentixol (0.1, 0.3 mg/kg) se procedió de la misma forma, con la salvedad de que estas drogas se administraron 30 min antes de la sesión experimental y transcurridos 20 min se les inyectó la dosis de 1.0 mg/kg de *d*-anfetamina. Se seleccionó la dosis de 1.0 mg/kg de *d*-anfetamina porque fue la única que redujo por sí misma la tasa de lametones, permitiendo de este modo que el incremento o detrimento que se produjera en las respuestas fuera solo atribuible a las combinaciones con los antagonistas dopaminérgicos.

El tratamiento farmacológico continuó a lo largo de las diferentes fases conforme al siguiente patrón: los martes y viernes fueron días de droga, los jueves se administró exclusivamente vehículo, y los lunes y miércoles los sujetos fueron probados sin inyección. A efectos de condiciones de control, se agruparon los datos de los días precedentes a la administración de droga, separando los días de control sin inyección (lunes) de los de control con vehículo (jueves). El tratamiento farmacológico duró un total de 50 sesiones.

Procedimiento Farmacológico: Agonistas Dopaminérgicos.

Cuando la conducta de los sujetos mostró pocas variaciones de sesión a sesión, las ratas 21, 22, 23 y 24 fueron administradas i.p. con el agonista selectivo de dopamina D1 SKF-38393, a dosis de 1.0, 3.0 y 10.0 mg/kg, 30 min antes de la sesión experimental. A continuación se administró i.p. el agonista selectivo de dopamina D2 quinpirole a dosis de 0.003, 0.01 y 0.03 mg/kg, 30 min antes de la sesión. Las drogas se disolvieron en agua destilada y se inyectaron en un volumen de 1ml/kg. Para cada droga, las dosis fueron administradas en orden aleatorio y cada una de ellas en sesiones independientes.

Todos los animales fueron posteriormente administrados con dosis de 0.3, 1.0 y 3.0 mg/kg de *d*-anfetamina sulfato. La droga se disolvió en 10% de suero fisiológico salino y se inyectó en forma de 1ml/kg i.p. 10 min antes de cada sesión experimental. Cada administración de *d*-anfetamina estuvo precedida 20 min antes de una inyección de agua destilada en un volumen de 1 ml/kg.

Por último, se combinaron las dosis de *d*-anfetamina de 0.3, 1.0 mg/kg con 3.0 mg/kg de SKF-38393 y las dosis de *d*-anfetamina de 0.3 1.0 y 3.0 mg/kg se combinaron con 0.003 mg/kg de quinpirole. Los agonistas

dopaminérgicos fueron administrados 30 min antes de la sesión experimental, y 20 minutos después se administró la *d*-anfetamina; 10 minutos más tarde se colocó a los animales en las cajas. Las dosis utilizadas de SKF-38393 y quinpirole se seleccionaron porque fueron las más altas de las dosis empleadas que por si mismas fueron ineficaces para reducir la tasa de lametones.

El tratamiento farmacológico duró 35 sesiones, y se siguió el mismo patrón que el descrito anteriormente para los antagonistas dopaminérgicos.

4.3- RESULTADOS.

Como resultado del programa múltiple de TF 60-s, todas las ratas bebieron cantidades excesivas de agua. Durante los cinco últimos días del procedimiento, la ingestión media de agua fue de 18.93 ± 6.93 ml, aproximadamente 2.5 veces mayor que en la línea base (8 ± 2.23 ml). Este consumo de agua es característico de polidipsia inducida por programa, lo que garantiza que los efectos de las drogas sobre la tasa de lametones se establecieron sobre una conducta que fue excesiva. La ingestión de comida no se vio alterada durante el transcurso del experimento; todas las ratas consumieron rápidamente las bolitas de comida tanto en las sesiones en las que se administró droga como en las que no se administró.

Antagonistas Dopaminérgicos.

La Figura 4.1 muestra los efectos de las distintas dosis de SCH-23390, eticlopride y flupentixol sobre la tasa de lametones de cada rata individualmente. Se han incluido las medias de los días de control sin inyección y con vehículo, con sus respectivos errores típicos, correspondientes a todo el tratamiento farmacológico.

La administración exclusivamente de vehículo produjo un pequeño incremento en la tasa de lametones respecto a la condición de control sin inyección en las ratas 11 y 12, aunque en general este incremento fue apenas sustancial.

En general, la administración aguda de los antagonistas dopaminérgicos produjo disminuciones dependientes de la dosis en el número de lametones por minuto. La dosis de 0.001 mg/kg de SCH23390 no cambió la tasa de lametones; sin embargo, según la dosis fue incrementándose, los lametones por minuto disminuyeron en las 3 ratas. Dosis bajas o intermedias de eticlopride no produjeron reducciones sistemáticas en la tasa de bebida, pero hubo un incremento en el número de lametones por minuto en la rata 12. La dosis más alta de eticlopride (0.03 mg/kg) produjo una completa abolición de la conducta polidíptica de ingestión de agua.

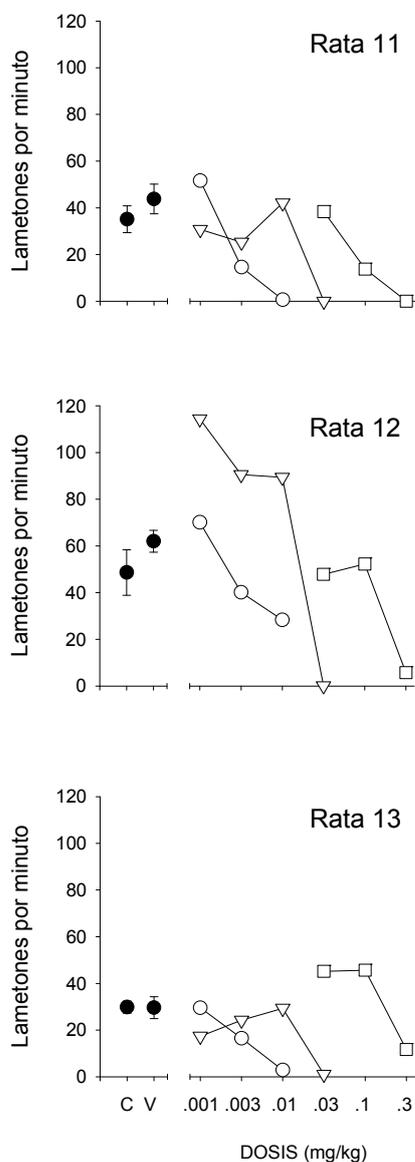


Figura 4.1. Efectos del SCH 23390 (○), eticlopride (▽) y flupentixol (□) sobre la tasa de lametones inducido por un programa de tiempo fijo 60-s de liberación de comida para cada rata individualmente. También se muestran los datos para las sesiones de control sin inyección (c) y para la administración de vehículo (v).

Los efectos del flupentixol se caracterizaron también por una disminución dependiente de la dosis en la tasa de lametones en todas las ratas. La dosis de 0.3 mg/kg redujo casi completamente el número de lametones por minuto.

La Figura 4.2 muestra las curvas de dependencia de dosis de la *d*-anfetamina (precedida por vehículo) sobre la tasa de lametones inducidos por el programa TF en cada una de las ratas individualmente. Las medias de los días de control sin inyección y con vehículo, con sus correspondientes errores típicos, son los mismos que los de la Figura 4.1. La administración de *d*-anfetamina produjo una reducción dependiente de la dosis en los lametones por minuto en las 3 ratas, con una completa abolición de la bebida a la dosis de 3.0 mg/kg.

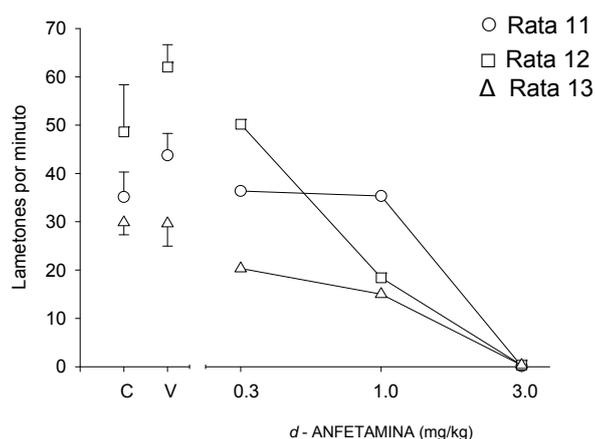


Figura 4.2. Efectos de la *d*-anfetamina sobre la tasa de lametones inducida por un programa de tiempo fijo 60-s de liberación de comida para cada rata individualmente. También se muestran los datos de las sesiones de control sin inyección (C) y de la administración de vehículo solo, sin droga (V).

La Figura 4.3 muestra los efectos sobre la tasa de lametones de la combinación de dosis de los diferentes antagonistas dopaminérgicos con 1.0 mg/kg de *d*-anfetamina, en comparación con los efectos de la *d*-anfetamina por si sola (precedida de vehículo).

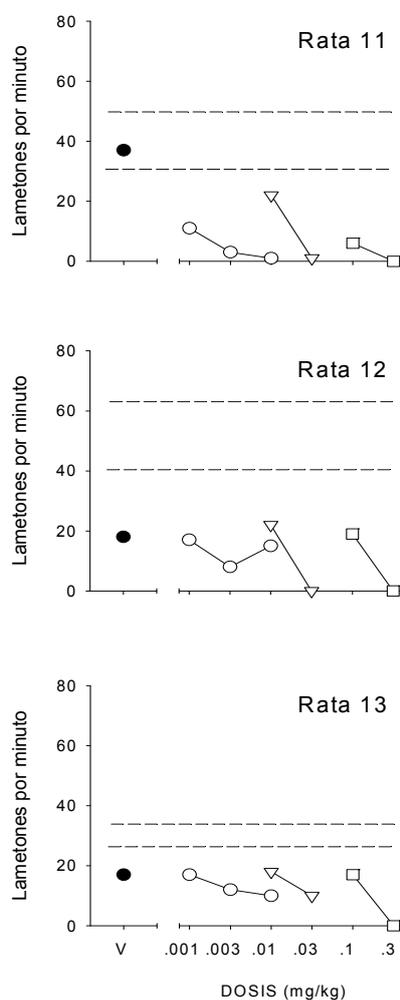


Figura 4.3. Efectos de 1mg/kg de *d*-anfetamina (●) sobre la tasa de lametones inducida por un programa de tiempo fijo 60-s de liberación de comida, y de la combinación de diferentes dosis de los antagonistas dopaminérgicos SCH 23390 (○), eticlopride (▽) y flupentixol (□) con 1.0 mg/kg de *d*-anfetamina. Las líneas horizontales son los rangos de los lametones por minuto en las condiciones de control.

Las líneas horizontales punteadas indican el rango del valor de los lametones por minuto bajo las condiciones de control. Los datos de 1.0 mg/kg de *d*-anfetamina sola (precedida de vehículo) están representados igual que en la Figura 4.2. La co-administración de SCH-23390, eticlopride o flupentixol con *d*-anfetamina, por lo general potenció de forma dependiente de la dosis la supresión de los lametones por minuto producida por la *d*-anfetamina.

La Figura 4.4 muestra los efectos de 1.0 mg/kg de *d*-anfetamina, de diferentes dosis de los antagonistas dopaminérgicos SCH-23390, eticlopride y flupentixol, y de la combinación de estas dosis de los antagonistas con 1.0 mg/kg de *d*-anfetamina, sobre el cuarto de vida de la tasa de lametones inducida por el programa de TF. Las líneas horizontales punteadas indican el rango del valor del cuarto de vida en condiciones de control. El cuarto de vida cuantifica el porcentaje del intervalo entre reforzadores que ha transcurrido cuando se han emitido el 25% de las respuestas (Gollub, 1964). Se calculó mediante las tasas locales de respuesta dentro de los segmentos de 2 seg en que se dividió cada uno de los intervalos entre reforzadores. Se sumaron las respuestas de cada segmento consecutivo de 2 segundos hasta que el total acumulativo fue igual a un cuarto del total de las respuestas producidas en el intervalo. Cada segmento se dividió por el número total de segmentos de 2 segundos en cada intervalo entre reforzadores para calcular el cuarto de vida. Un valor más bajo del cuarto de vida indica que ocurren más lametones al principio del intervalo. El cuarto de vida no resulta una medida significativa

cuando la tasa de respuesta es muy baja. Por ello, no se ha podido calcular para todas las administraciones recogidas en la Figura 4.3; por ejemplo, las dosis de 0.003 y 0.01 mg/kg de SCH23390 en la rata 11, la dosis de 0.03 mg/kg de eticlopride en las ratas 11 y 12, y la dosis de 0.3 mg/kg de flupentixol en las ratas 11, 12 y 13

Ninguno de los antagonistas dopaminérgicos, a ninguna de las dosis probadas en este estudio, redujeron por si solos el cuarto de vida de la tasa de lametones (gráficos de la izquierda de la Figura 4.4). La dosis de 1.0 mg/kg de *d*-anfetamina (datos sobre el 0 en los gráficos de la derecha de la Figura 4.4), sin embargo, redujeron en todas las ratas el cuarto de vida.

El SCH-23390 antagonizó, dependiendo de la dosis, las disminuciones producidas por la anfetamina en el cuarto de vida de la tasa de lametones; este antagonismo resultó completo en las ratas 12 y 13 a la dosis de 0.01 mg/kg, pero parcial en la rata 11 a la dosis de 0.001 mg/kg, probablemente debido a que no se pudieron evaluar los efectos de las dosis más altas. La co-administración de eticlopride y *d*-anfetamina no revirtió los efectos supresores de la *d*-anfetamina sobre el cuarto de vida. Finalmente, la dosis de 0.1 mg/kg de flupentixol antagonizó por completo el efecto de la *d*-anfetamina sobre el cuarto de vida en todos los animales.

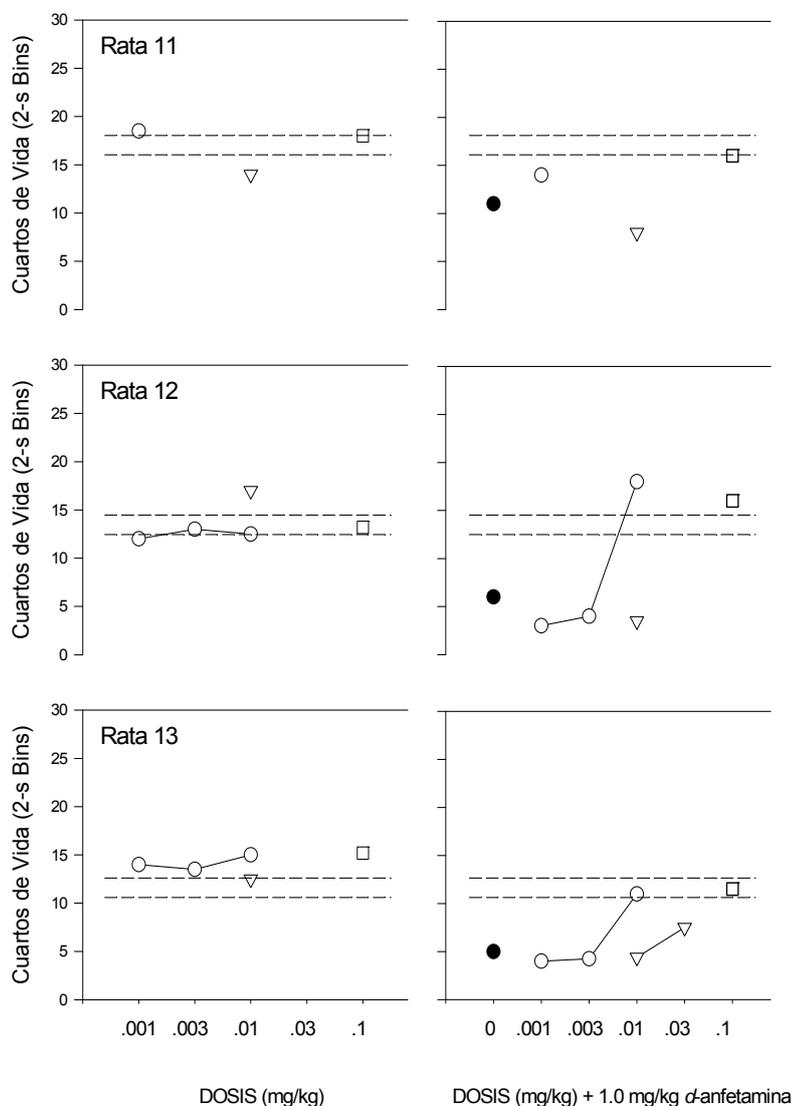


Figura 4.4. Efectos de 1 mg/kg de *d*-anfetamina, de diferentes dosis de los antagonistas dopaminérgicos, SCH 23390 (○), Eticlopride (▽) y Flupentixol (□), y de la combinación de dosis de dichos antagonistas dopaminérgicos con 1.0 mg/kg de *d*-anfetamina (●), sobre el cuarto de vida de latasa de lametones inducida por un programa de tiempo fijo 60-s. Las líneas horizontales indican el rango del valor del cuarto de vida en condiciones de control.

Agonistas Dopaminérgicos.

La Figura 4.5 muestra las curvas de dependencia de dosis de SKF-38393 y quinpirole sobre la tasa de bebida inducida por el programa de TF. Las medias y los errores típicos de las sesiones de control sin inyección y con vehículo corresponden a las sesiones inmediatamente precedentes a la administración de las dosis de cada una de estas drogas.

El SKF-38393 produjo una disminución dependiente de la dosis en la tasa de lametones, de manera que la dosis de 10.0 mg/kg redujo de forma significativa la bebida adjuntiva en todos los animales. La dosis de 1.0 mg/kg incrementó ligeramente los lametones por minuto de las ratas 22, 23 y 24. El quinpirole a la dosis de 0.003 mg/kg incrementó la tasa de lametones de las ratas 22 y 23. Se produjo una reducción en la tasa de lametones conforme se incrementó la dosis de quinpirole.

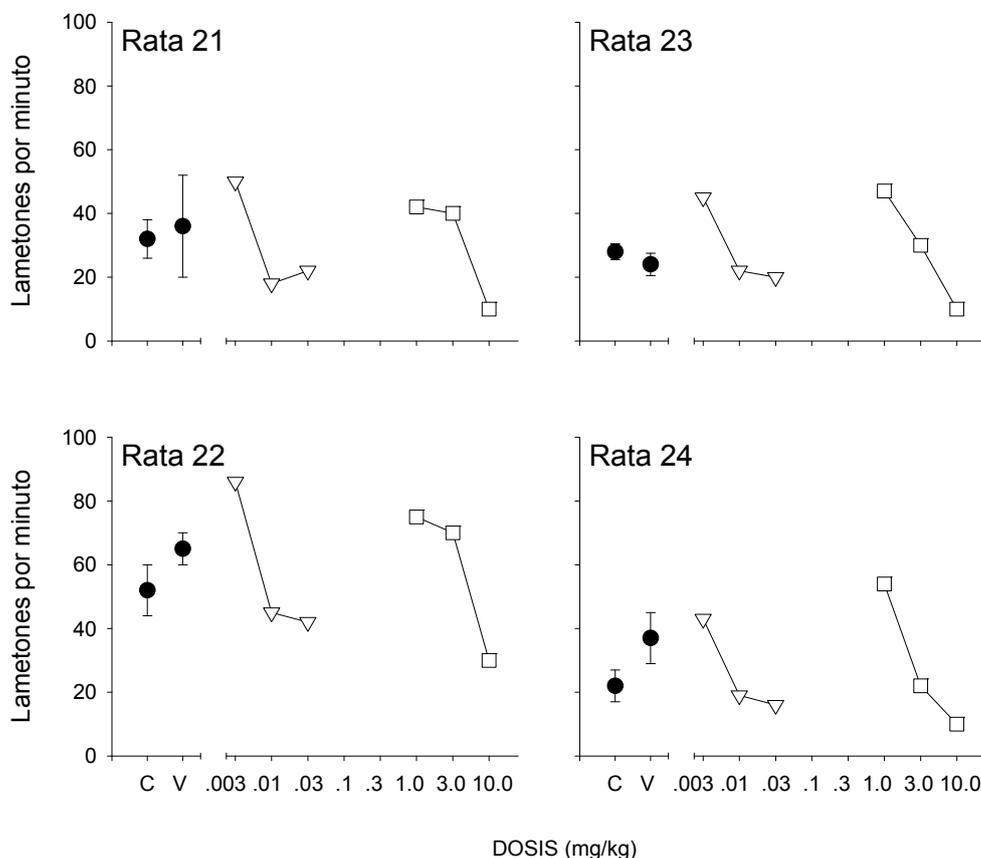


Figura 4.5. Efectos del SKF38393 (□) y quinpirole (▽) sobre la tasa de lametones inducida por un programa de tiempo fijo 60-s de liberación de comida para cada rata individualmente. También se muestran los datos de las sesiones de control sin inyección (C) y de la administración del vehículo (V).

La Figura 4.6 muestra la curva de dependencia de dosis de la *d*-anfetamina (precedida de vehículo) de la tasa de lametones para cada rata individualmente. Los efectos dependientes de la dosis de la *d*-anfetamina están también representados cuando las dosis de esta droga fueron precedidas por la

administración de SKF38393, 3.0 mg/kg. o quinpirole, 0.003 mg/kg. Puesto que estas drogas fueron ineficaces en reducir por si solas la tasa de lametones (ver Figura 4.5), estudios combinados permitirían una evaluación de la facilitación de los efectos supresores de la *d*-anfetamina con la administración previa de agonistas selectivos dopaminérgicos. Se han incluido la media y los errores típicos de las sesiones de control sin inyección, y de las sesiones con vehículo, previas a las sesiones en las que fueron administradas las drogas.

La administración de *d*-anfetamina produjo una reducción dependiente de la dosis en la tasa de lametones. La dosis de 0.3 mg/kg produjo un incremento en los lametones por minuto de la rata 23. La co-administración de 3.0 mg/kg de SKF-38393 o de 0.003 mg/kg de quinpirole con dosis de *d*-anfetamina potenció los efectos supresores de la *d*-anfetamina sobre la bebida adjuntiva. Este efecto fue más marcado para el SKF-38393 que para el quinpirole. En el caso de la rata 22 es incluso dudoso que 0.003 mg/kg de quinpirole tuviese efecto potenciador alguno.

Dado que la combinación de *d*-anfetamina con las dosis de SKF-38393 y quinpirole llevó a una reducción significativa de la tasa de lametones, muchos de estos valores resultan poco apropiados para un análisis del cuarto de vida en la forma en que se hizo con anterioridad para los antagonistas dopaminérgicos.

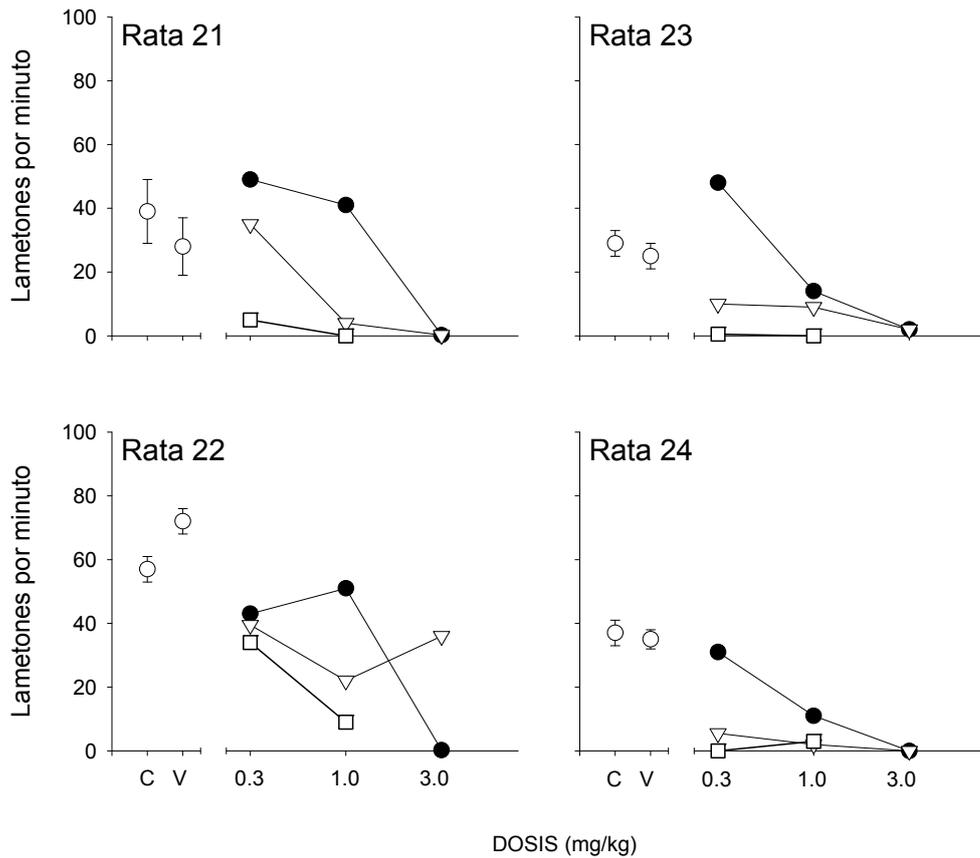


Figura 4.6. Efectos de la *d*-anfetamina sobre la tasa de lametones inducida por un programa de tiempo fijo 60-s de liberación de comida para cada rata individualmente. La administración de *d*-anfetamina fue precedida por la administración de solución salina (●), SKF 38393, 3.0 mg/kg (□), o quinpirole, 0.003 mg/kg (▽). También se muestran los datos de las sesiones de control sin inyección (C) y la administración del vehículo (V).

4.4- DISCUSIÓN.

Los objetivos de este estudio han sido dos. Por un lado, conocer los efectos de agonistas y antagonistas D1 y D2 de los receptores de dopamina sobre la polidipsia inducida por programa. Por otro lado, comprobar si los efectos de la *d*-anfetamina sobre la bebida adjuntiva se pueden antagonizar o potenciar específicamente a través de la acción sobre alguno de estos dos subtipos de receptores.

Los principales resultados indican que la administración de agonistas y antagonistas dopaminérgicos solos y en combinación con *d*-anfetamina reducen la tasa de bebida inducida por programa. El patrón temporal de la bebida sólo resultó alterado por la *d*-anfetamina y este efecto fue antagonizado por las sustancias con actividad sobre los receptores D1. Por último, el efecto supresor de la *d*-anfetamina sobre la bebida adjuntiva resultó más potenciado por el agonista D1 SKF-38393 que por el agonista D2 quinpirole. Estos resultados se han obtenido de animales repetidamente testados en diferentes condiciones de drogas.

En primer lugar, y en concordancia con los datos existentes en la literatura, los resultados de este estudio demuestran que la administración de *d*-anfetamina reduce la tasa de lametones de forma dependiente de la dosis (Sanger, 1978b; Robbins y cols., 1983; Williams y White, 1984; Mittleman y

cols., 1994; Flores y Pellón, 1995), resultado que también se observa con el antagonista dopaminérgico del receptor D1 SCH23390, con el antagonista dopaminérgico de receptor D2 eticlopride, y con el antagonista dopaminérgico de los receptores D1 y D2 flupentixol (excepto para dosis bajas o moderadas de eticlopride, ver Figura 4.1). Los efectos del SCH-23390 y del flupentixol sobre la polidipsia inducida por programa han sido probados en diversas ocasiones y todas ellas coinciden en que estas sustancias reducen la bebida adjuntiva, sin producir ningún efecto sobre la eficacia en la conducta de beber calculada como el número de lametones por ml de agua consumida (Todd y cols., 1992; Didriksen y cols., 1993; Didriksen y Christensen, 1993, 1994; Mittleman y cols., 1994). La co-administración de SCH-23390, eticlopride o flupentixol con *d*-anfetamina potenció, en general, los efectos supresores de la *d*-anfetamina sobre la tasa de lametones reducida previamente por la *d*-anfetamina (ver Figura 4.3).

Ninguno de los antagonistas dopaminérgicos tuvo efecto sobre el cuarto de vida de la tasa de lametones, pero la dosis de 1.0 mg/kg de *d*-anfetamina redujo el cuarto de vida en todas las condiciones para todos los animales. El SCH-23390 y el flupentixol, con actividad sobre los receptores D1, revirtieron el efecto de la *d*-anfetamina sobre el cuarto de vida. Este resultado no se observó con la administración previa del antagonista D2 eticlopride (ver Figura 4.4). Parece, por tanto, que el desplazamiento hacia la izquierda que la *d*-anfetamina produce sobre la polidipsia inducida por programa pudiera estar

mediado de forma selectiva por los receptores D1. En este mismo sentido, Didriksen y cols. (1993) propusieron que el patrón temporal junto con las entradas al comedero (medida que no se ha tomado en este estudio) son medidas más sensibles al bloqueo de los receptores D1 que al bloqueo de los receptores D2 ya que el SCH-23390 desplazó hacia la derecha el cuarto de vida tras un tratamiento crónico y el raclopride, un antagonista de los receptores D2, no tuvo efecto sobre esta medida.

Es conocido que las drogas dopaminérgicas afectan a la percepción del tiempo: la *d*-anfetamina incrementa la velocidad del reloj interno y produce una sobreestimación del tiempo transcurrido, los antagonistas disminuyen la velocidad del reloj interno produciendo una infraestimación del tiempo transcurrido (Maricq y Church, 1983). En nuestro caso, la anfetamina redujo el cuarto de vida, pero los antagonistas dopaminérgicos no lo alteraron. Dado que en el presente trabajo fueron solo los antagonistas con actividad D1 los que revirtieron los efectos de la *d*-anfetamina sobre el cuarto de vida podríamos pensar que este subtipo de receptor dopaminérgico podría tener una mayor implicación en la percepción del tiempo. Sin embargo, se ha demostrado que son los antagonistas dopaminérgicos con mayor afinidad por los receptores D2 los que tienen mayor capacidad para disminuir la velocidad del reloj interno (Meck, 1986). Esto, junto con el hecho de que la polidipsia inducida por programa no parece una conducta que esté tan determinada temporalmente como la conducta operante (Flores y Pellón, 1997), descarta la hipótesis de que

el efecto de los agonistas y antagonistas dopaminérgicos sobre la polidipsia inducida por programa sea a través de una alteración en la estimación temporal.

Los agonistas D1 SKF-38393 y D2 quinpirole produjeron ligeros incrementos o ausencia de efecto a las dosis más bajas, y a medida que se incrementó la dosis se redujo la tasa de lametones (ver Figura 4.5). Mittleman y cols. (1994) también encontraron que estos agonistas reducen la polidipsia inducida por programa de forma dependiente de la dosis. El quinpirole redujo la bebida adjuntiva al causar impedimentos en la iniciación o ejecución de conductas como la actividad locomotora, las entradas al comedero e incrementando la latencia para recoger la comida; el SKF-38393 redujo la bebida inducida sin afectar al resto de las medidas.

Datos recientes demuestran que los agonistas D1, a diferencia de los agonistas D2, incrementan las estereotípias (Berridge y Aldridge, 2000). Puesto que nuestro estudio y el de Mittleman y cols. (1994) demuestran que el SKF-38393 reduce la bebida adjuntiva de forma dependiente de la dosis, los datos de que ambos agonistas dopaminérgicos D1 y D2 reducen la polidipsia inducida por programa, descartaría la hipótesis de que la polidipsia inducida por programa fuese una conducta estereotipada.

Un aspecto destacable del presente trabajo es que a pesar de que los dos agonistas dopaminérgicos, cuando se co-administran con *d*-anfetamina,

potencian los efectos de esta última, de nuevo encontramos que es la actividad sobre los receptores D1 la que parece más relevante. Aunque las comparaciones son difíciles porque se testó una dosis de cada componente, el SKF-38393 potencia con mayor claridad que el quinpirole el efecto reductor de la *d*-anfetamina sobre la tasa de lametones (ver Figura 4.6). Los resultados de Mittleman y cols. (1994) que muestran que el SKF-38393 y el SCH-23390 afectan la bebida adjuntiva sin alterar la locomoción, confirmarían esta hipótesis, sugiriendo la idea de que los efectos reductores producidos por los agonistas y antagonistas D2 sobre la bebida inducida pudieran tener un carácter más indirecto e inespecífico que los producidos por los agonistas y antagonistas D1.

Está ampliamente documentado que los dos subtipos D1 y D2 de receptores dopaminérgicos tienen una función distinta en la ejecución motora (Smith, Smith, Zigmond, Amalric y Koob, 2000). La estimulación de los receptores D2 parece ser crítica para la integración sensoriomotora. Así se ha demostrado que mientras que el eticlopride altera la ejecución motora en una tarea operante de tiempo de reacción, el SCH-23390 no tiene efecto (Amalric, Berhow, Polis y Koob, 1993; Smith y cols., 2000).

Tanto agonistas como antagonistas dopaminérgicos reducen la polidipsia inducida por programa, sin embargo los antagonistas D1, y no los D2, revierten el efecto de la anfetamina sobre el curso temporal de esta

conducta y los agonistas D1 potencian los efectos de la *d*-anfetamina más que las sustancias con actividad D2. Pudiera ser entonces que los efectos supresores de estas sustancias sobre la polidipsia inducida por programa pudieran tener orígenes distintos, específico sobre la bebida adjuntiva para los D1 e inespecífico, por las alteraciones motoras que producen, para los D2. Por ejemplo, los receptores D1 parecen ser críticos para la expresión de la actividad condicionada a contextos asociados con drogas o refuerzos o para la facilitación de las conductas preparatorias (Tinsley, Rebec y Timberlake, 2000) y una de las hipótesis sobre la polidipsia inducida por programa defiende la idea de que esta conducta es la expresión de la motivación asociada a la aparición de comida de forma intermitente (Killeen, Hanson, y Osborne, 1978).

5. EXPERIMENTO II

ANÁLISIS FARMACOLÓGICO DE LOS EFECTOS DE LAS BENZODIACEPINAS SOBRE LA POLIDIPSIA INDUCIDA POR PROGRAMA CASTIGADA*

5.1- INTRODUCCIÓN.

Las benzodiazepinas son unos compuestos altamente efectivos en el tratamiento de los trastornos de ansiedad (Nutt, 2005). Uno de los efectos conductuales mejor documentados de las benzodiazepinas es su acción ansiolítica en procedimientos de conflicto. La tasa de respuesta operante reducida por la ocurrencia simultánea de reforzamiento positivo y de castigo es

* Trabajo publicado en Behavioural Pharmacology 2007, 18: 81-87.

selectivamente incrementada por sustancias con capacidad ansiolítica: las benzodiazepinas entre otras sustancias. (Houser, 1978; Millan, 2003).

El efecto anticastigo de las benzodiazepinas y otros ansiolíticos depende fundamentalmente de la intensidad y frecuencia de las descargas eléctricas utilizadas como estímulos punitivos, lo que determina la tasa de respuesta castigada. Tasas bajas de respuesta operante castigada no son incrementadas por las drogas ansiolíticas (McMillan, 1973; Jeffrey y Barrett, 1979; DworKin, Bimble y Miyanchi, 1989). El grado de los efectos anticastigo de las benzodiazepinas está unido a su eficacia clínica, con una correlación positiva avalada en estudios con palomas (Kleven y Koek, 1999), ratas (Cook y Davidson, 1973) y en monos rhesus (Rowlett, Lelas, Tornatzk y Licata, 2006).

Los efectos conductuales de las benzodiazepinas parecen estar mediados por la acción de diferentes subtipos de receptores GABAA (Rudolph, Crestani y Mohler, 2000), pudiendo investigarse mediante el bloqueo de los receptores GABAA por antagonistas benzodiazepínicos, y comprobando la desaparición o disminución de los efectos previamente observados producidos por los agonistas benzodiazepínicos. En esta misma línea, los efectos anticastigo de las benzodiazepinas y componentes relacionados, se puede atenuar si previamente se administra flumacénil, un antagonista de los receptores de benzodiazepinas (Barret y cols., 1986; Witkin, Acri, Gleeson y Barrett, 1997).

Comparando con los estudios realizados sobre conducta operante, muy pocos estudios han investigado sobre los efectos de las drogas sobre la conducta adjuntiva castigada. El término “conducta adjuntiva” se refiere a cualquier conducta que ocurra durante un programa de reforzamiento sin que haya ninguna contingencia aparente relacionada con el reforzador, en contraste con la necesidad en la obtención del reforzador de la conducta operante. El ejemplo mejor estudiado de conducta adjuntiva es la polidipsia inducida por programa en ratas, es decir, cuando un animal es privado de comida y se le somete a un programa de reforzamiento intermitente de presentación de comida, entonces, si tiene libre acceso al agua, beberá grandes cantidades de líquido concurrentemente con su ejecución en el programa de reforzamiento (Falk, 1961). La polidipsia inducida por programa es una conducta adjuntiva porque los animales no están sedientos ni tienen necesidad de beber para obtener el reforzador. A pesar de las distinciones formales entre conducta adjuntiva y conducta operante, se ha considerado que las contingencias operantes están involucradas en el mantenimiento de la polidipsia inducida por programa y en las conductas adjuntivas en general. Estas conclusiones se deben en parte de diversos estudios en los que se muestra similares efectos de las drogas sobre modelos de conducta adjuntiva y de conducta operante (Pellón y Flores 2009).

Flores y Pellón (1998) demostraron que la bebida adjuntiva reducida por presentaciones contingentes de descargas eléctricas se podía incrementar

trás la administración de la benzodiazepina diacepam, pero no después de la administración de buspirona o d-anfetamina. Por otra parte, estos efectos dependen de la intensidad de la descarga eléctrica utilizada, y no se observaron en animales que recibieron descargas no contingentes a los lametones. En un estudio posterior, Flores y Pellón (2000) observaron que el efecto anticastigo del diacepam fue mayor a medida que la bebida adjuntiva se reducía por la utilización de descargas eléctricas de diferente intensidad, el mayor efecto anticastigo vino producido cuando se utilizaron descargas suficientemente intensas. El procedimiento utilizado por Flores y Pellón (2000) consistió en inducir bebida adjuntiva en ratas mediante un programa de tiempo fijo (TF) que dispensaba comida en pellets cada 60 segundos, independientemente de la conducta de los animales, y alternando este programa con otro, el cual además de la comida, administraba descargas eléctricas cada quinto lametón. Este procedimiento basado en la presentación alternativa de los componentes de castigo y no castigo fue el empleado en la presente serie de experimentos.

Distintos estudios sobre el castigo han demostrado que a dosis moderadas las benzodiazepinas incrementan la bebida adjuntiva no castigada, aunque principalmente en términos de ingestión de agua más que de lametones (Bacotti y Barret, 1976; Sanger y Blackman, 1976; Pellón y cols., 1992), estos resultados sugieren que las benzodiazepinas pueden alterar la topografía de la bebida.

El objetivo del presente estudio fue investigar los mecanismos farmacológicos de acción de las benzodiazepinas sobre la polidipsia inducida por programa castigada, a través del estudio comparado de diferentes agonistas benzodiazepínicos y del posible antagonismo producido por el bloqueo de los receptores de benzodiazepinas con flumazenil. Para tal fin, altas tasas de bebida inducida por un programa de tiempo fijo (TF) 60 segundos de liberación de comida fueron castigadas por la presentación contingente de shocks eléctricos en periodos señalados de cinco minutos. Primeramente, se administraron los agonistas completos de benzodiazepinas diazepam, clordiazepóxido y oxacepam, y el agonista parcial RU-32698, así como dosis del agonista inverso RU-34000 (Tully, Gardner y Westwood, 1991; Gardner y Budhram, 1991), siendo medida la bebida inducida por programa en el componente de castigo y de no castigo de forma separada. Finalmente se administraron dosis de diazepam en combinación de dosis de flumazenil y RU-32698, así como dosis del agonista inverso benzodiazepínico RU-34000 (Gardner y Budhram, 1991).

El estudio de la mediación farmacológica de las acciones de las benzodiazepinas sobre la polidipsia inducida por programa castigada proporciona un avance en el entendimiento de los mecanismos involucrados en el desarrollo y mantenimiento de las conductas adjuntivas.

5.2- MÉTODO

Sujetos

Se utilizaron 6 ratas macho de la raza Wistar experimentalmente ingenuas y procedentes de la casa IFFA-CREDO (Lyon, Francia). Tuvieron una edad aproximada de 90 días y un peso medio ad libitum de 414 g (rango: 380-432 g) al comienzo del experimento. Se enjaularon individualmente en una habitación ambientalmente controlada (22°C de temperatura, 60% de humedad relativa, y un ciclo de luz/oscuridad 8:00/20:00 horas).

Después de un periodo de habituación de 10 días a las condiciones de habitabilidad, y antes del entrenamiento, se redujo gradualmente el peso de las ratas hasta el 80% de su peso ad libitum a través de restricción en la alimentación. Se pesó a las ratas antes de cada sesión experimental, y al menos 15 min después de terminada la sesión experimental se les dio un suplemento apropiado a la comida que habían obtenido en la misma. Los animales tuvieron acceso continuado a agua limpia y fresca en las jaulas hogar. Todos estos procedimientos están de acuerdo con la directiva de la Unión Europea 2003/65/EC y con el real Decreto Español 1201/2005 sobre la protección de animales utilizados para usos experimentales.

Aparatos

Se utilizaron seis cajas idénticas de condicionamiento operante para roedores LI-836 (Letica Instruments, Barcelona) con suelos de rejilla y dimensiones de 29 cm de largo x 24,7 cm de ancho x 35,5 cm de alto. Cada caja se situó dentro de una carcasa ventilada y a prueba de ruidos, con una mirilla en la pared izquierda. El panel frontal de cada caja fue de aluminio, la pared de la derecha de acrílico negro, y las otras paredes y el techo de acrílico transparente. Las palancas operantes estuvieron retraídas durante el transcurso del experimento. Las descargas eléctricas se suministraron a través del suelo de rejilla de cada caja por seis generadores independientes LI 200-20. Se adosó una botella calibrada con agua en el exterior de la pared derecha de cada caja, estando el pitorro accesible a través de un agujero de 3,2 cm de ancho x 3,9 cm de alto, situado a 20 cm de la pared frontal y 7 cm por encima del suelo. El pitorro se situó 2 cm detrás del agujero, de manera que la rata pudiera lamerlo pero no pudiera tener contacto permanente con el mismo. Cada lametón produjo el cierre de un circuito entre el pitorro de la botella y el suelo de rejilla, pero ni las descargas se suministraron a través del pitorro, ni el registro de los lametones se interrumpió con el suministro de las descargas. Cada caja de condicionamiento estuvo iluminada por dos bombillas de 3 W durante las sesiones experimentales. El ruido ambiente producido por la ventilación fue de 60 dB, lo que sirvió como ruido enmascarador. Detrás de cada panel frontal se

situó un dispensador Letica Instruments que suministró bolitas de comida estándar para roedores de 45 mg (Bio-Serv, Frenchtown, New Jersey, USA) a un receptáculo en el centro del panel frontal de la caja, situado a 3,7 cm del suelo de rejilla. La programación y registro de los sucesos experimentales se realizó a través de un microordenador BBC (Acorn Computers, Cambridge, UK) programado en SPIDER.

Procedimiento Conductual

Cuando el peso de cada rata se estabilizó al 80% de su peso ad libitum, a todas las ratas se les realizó una prueba de ingestión de agua por dos días consecutivos. Se situaron juntas en un platillo cincuenta y cinco bolitas de comida en pellets de 45 mg dentro de las jaulas hogar, y se midió la cantidad de agua consumida por cada rata durante 55 min. Esta medida proporciona una línea base con la que evaluar el grado de polidipsia inducida por programa observado posteriormente en el experimento, donde cada animal recibió intermitentemente las cincuenta y cinco bolitas de comida en sesiones experimentales de 55 min.

Al día siguiente, las ratas fueron introducidas por primera vez en las cajas de condicionamiento por un periodo de 55 min, y se les permitió comer veinte bolitas de comida que habían sido previamente depositadas en los correspondientes receptáculos. En esta sesión no se instalaron las botellas de

agua.

Después de esta sesión de adaptación, se expuso a las ratas a un programa de TF 60-s de presentación de una bolita de comida durante 14 sesiones experimentales de 55 min. Las bolitas de comida se dispensaron a intervalos regulares de un minuto, independientemente de la conducta de los animales. Las botellas se llenaron con 100 ml de agua fresca y se colocaron en las cajas inmediatamente antes de cada sesión experimental. Cada sesión comenzó con la iluminación de las cajas. Las sesiones se realizaron 5 días por semana. Se registraron las siguientes medidas para cada rata en cada sesión: (a) el número total de lametones, que permitió calcular el número de lametones por minuto; y (b) la cantidad total de agua ingerida (en ml).

La comida se siguió administrando a intervalos regulares de 60 seg en sesiones experimentales de 55 min. Ahora, sin embargo, se superpusieron dos periodos de 5 min señalados por un tono (70 dB, 40 Hz). Estos periodos señalados se iniciaron respectivamente una vez que habían pasado 15 y 35 min del comienzo de cada sesión. Cada quinto lametón dentro de estos periodos se hizo seguir de una descarga eléctrica de 0,3 seg a través del suelo de rejilla (un programa de RF-5). Se ajustó la intensidad de la descarga eléctrica para cada rata de manera que se obtuviese una supresión en la tasa de lametones del 60-70% en relación con la registrada durante los periodos no señalados (las descargas fueron entre 0,10 y 0,12 mA). Los lametones se registraron

independientemente para cada rata en los componentes de descarga y no-descarga, lo que permitió calcular el número de lametones por minuto de cada componente del programa múltiple. Se siguió midiendo el consumo de agua, pero no se informará de estos datos al no poder diferenciarse el consumo en cada componente de forma independiente. Esta fase experimental duró 28 sesiones.

Procedimiento Farmacológico

Inmediatamente se inició el Procedimiento Farmacológico, donde se continuó manteniendo el programa múltiple de reforzamiento y castigo al que se había llegado al finalizar el Procedimiento Conductual. Todos los animales recibieron entonces administraciones intraperitoneales de compuestos benzodiazepínicos en un volumen de 1 ml/kg, 10 minutos antes de la sesión experimental. En primer lugar se administraron agonistas completos de benzodiazepinas, primero diazepam a dosis de 0.1, 0.3, 1.0 y 3.0 mg/kg, después clordiazepóxido a dosis de 0.3, 1.0, 3.0 y 10.0 mg/kg, y por último oxazepam a dosis de 0.3, 1.0 y 3.0 mg/kg. Después se administró el agonista parcial de benzodiazepinas RU-32698 a dosis de 3.0, 10.0 y 17.0 mg/kg. El diazepam se suspendió en una solución compuesta de agua destilada y tres gotas de Tween 80 (Sigma-Química, Madrid), el clordiazepóxido y el RU-32698 se disolvieron en 0.9% de solución salina, y el Oxazepam se suspendió en una disolución al 50% de propilenglicol y suero salino. Para cada droga, las

dosis se administraron en un orden aleatorio, pero todas las ratas recibieron la misma dosis el mismo día. Las sesiones de droga fueron los martes y los viernes. Los animales recibieron los jueves inyecciones intraperitoneales del vehículo en un volumen de 1 ml/kg, 10 minutos antes de la sesión. Las sesiones de los lunes sirvieron como condición de control sin inyección.

Una vez determinadas las funciones dosis-respuesta de los agonistas benzodiazepínicos, se procedió a evaluar la combinación de la dosis de 0.3 mg/kg de diazepam (por haber producido el mayor efecto anticastigo: véanse los Resultados posteriormente), primero con suero salino, después con las dosis de 3.0 y 10.0 mg/kg del antagonista benzodiazepínico flumazenil (Ro 15-1788), más tarde con las dosis de 10.0 y 17.0 mg/kg del agonista parcial de benzodiazepinas RU-32698, y finalmente con las dosis de 1.0 y 3.0 mg/kg del agonista inverso de benzodiazepinas RU-34000. El flumazenil se suspendió en una solución compuesta de agua destilada y 3 gotas de Tween 80, el RU-34000 se disolvió en 0.9% de solución salina. Los animales recibieron 10 minutos antes de cada sesión experimental las dos inyecciones correspondientes, y se mantuvo el mismo procedimiento de aleatorización y el patrón de administración descrito anteriormente.

El estudio farmacológico duró 52 sesiones, donde se siguieron midiendo las tasas de lametones independientemente para los componentes castigado y no castigado. Se calculó el porcentaje de cambio producido por

cada administración farmacológica con respecto a la condición de control en ausencia de inyección, dividiendo los lametones por minuto en presencia de la droga por los de las sesiones de control, y mutiplicando el resultado por cien.

5.3- RESULTADOS

Todas las ratas desarrollaron polidipsia inducida por programa tras ser expuestas al programa de TF 60-s de presentación de la comida. Durante los últimos cinco días de exposición al programa, las ratas bebieron en torno a 28 ml de agua como promedio (rango: 19-42 ml), que fue más de cuatro veces lo que consumieron durante la prueba de ingestión de agua en sus jaulas hogar (6.5 ml como media, rango: 5.0-8.5 ml). Con la introducción del procedimiento de castigo, las tasas de lametones en el componente castigado se redujeron entre un 60% y un 70% en relación con las tasas de lametones en el componente no castigado. Específicamente, durante las últimas cinco sesiones del programa múltiple, la tasa media de lametones por minuto en el componente castigado fue de 25.33 ± 3.72 y la del componente no castigado de 75.83 ± 17.48 . Los animales comieron todos los pellets liberados en cada sesión experimental, la comida ingerida no se vio sustancialmente alterada por la introducción del procedimiento de castigo o de administración de drogas.

Agonistas Benzodiazepínicos

La Figura 5.1 muestra los efectos de las distintas dosis de diacepam, clordiazepóxido, oxacepam y RU-32698 sobre las tasas de lametones en los componentes castigado (círculos negros) y no castigado (círculos blancos). También se muestran las medias y los errores típicos de los lametones por minuto en las sesiones en las que se administró el vehículo correspondiente a cada droga (V).

Los datos se representan como el porcentaje de cambio con respecto a la tasa media de lametones en la condición de control donde no se inyectó a los animales. En ningún caso la administración de vehículo produjo cambios de interés en las tasas de lametones castigada y no castigada.

En relación con el componente no castigado, ninguna de las drogas produjo incrementos en los lametones por minuto. Para el diacepam y el RU-32698 se observaron disminuciones dependientes de la dosis; para el clordiazepóxido y el oxacepam se observó que las dosis bajas o intermedias no tuvieron efecto en los lametones por minuto no castigados, pero que la dosis más alta de ambas drogas redujo sustancialmente la bebida polidipsica.

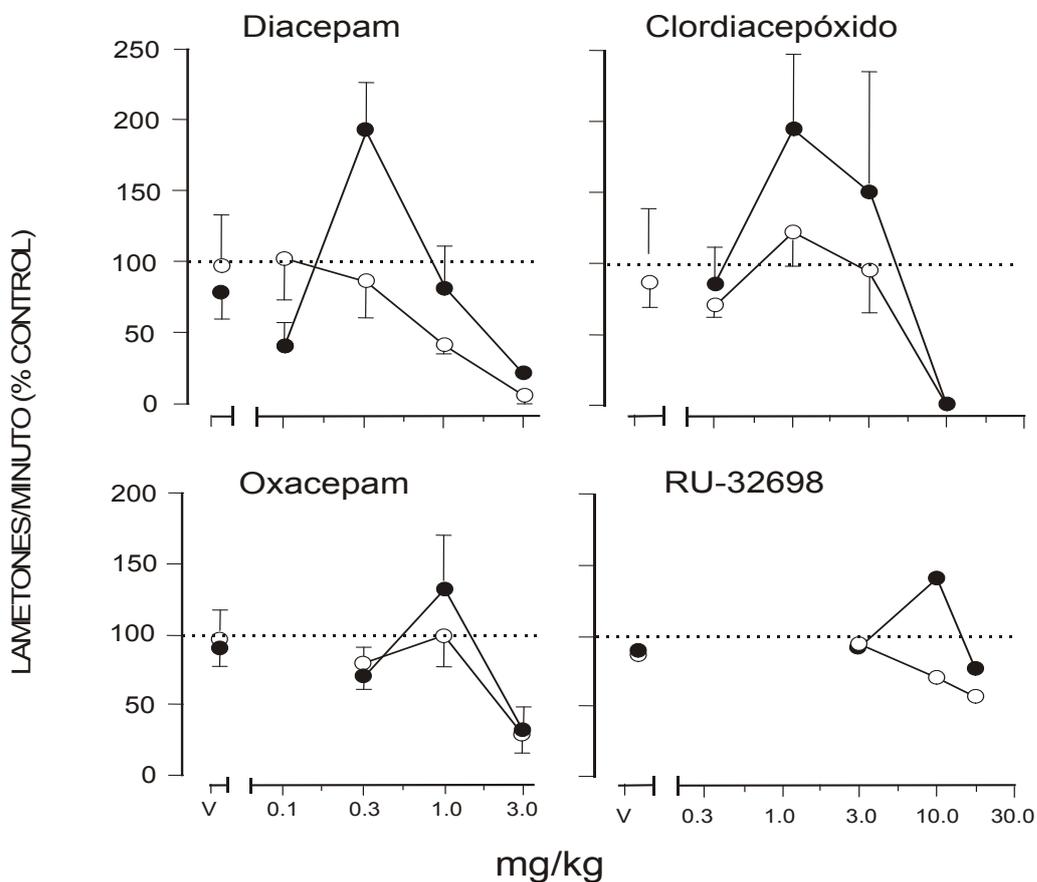


Figura 5.1. Efectos del diazepam, clordiazepóxido, oxacepam y RU-32698 sobre la tasa de lametones en el componente castigado (círculos negros) y no castigado (círculos blancos), representados como el porcentaje de cambio con respecto a la media de los lametones por minuto en la condición de control sin inyección. También se representan los resultados correspondientes a la administración de vehículo.

Con respecto al componente de castigo, se observaron efectos dependientes de dosis en todas las drogas conforme a la siguiente pauta general: las dosis más bajas no produjeron efectos en la tasa de lametones castigada (excepto la dosis de 0.1 mg/kg de diazepam que redujo la conducta),

se observaron incrementos a dosis intermedias, y disminuciones a las dosis más altas (excepto la dosis de 17.0 mg/kg de RU-32698). La tasa de lametones castigada aumentó hasta aproximadamente el doble tras las dosis de 0.3 mg/kg de diacepam y 1.0 mg/kg de clordiazepóxido, y también lo hizo, aunque en menor medida, tras las dosis de 1.0 mg/kg de oxacepam y 10.0 mg/kg de RU-32698 (y 3.0 mg/kg de clordiazepóxido). La tasa de lametones castigada disminuyó tras las dosis de 3.0 mg/kg de diacepam, 10.0 mg/kg de clordiazepóxido y 3.0 mg/kg de oxacepam.

Antagonistas Benzodiazepínicos

La Figura 5.2 muestra los efectos de la combinación de diferentes dosis de flumazenil, RU-32698 y RU-34000 con 0.3 mg/kg de diacepam sobre los lametones por minuto en el componente castigado, representados como el porcentaje de cambio con respecto a la media de los lametones por minuto en las sesiones de control en ausencia de inyección.

También se muestra el efecto de la administración de 0.3 mg/kg de diacepam precedido de vehículo (círculos negros). En este caso, se puede apreciar que la droga incrementó la tasa de lametones castigada en un orden de magnitud semejante al observado en la figura anterior cuando se administró la misma dosis de diacepam por sí sola.

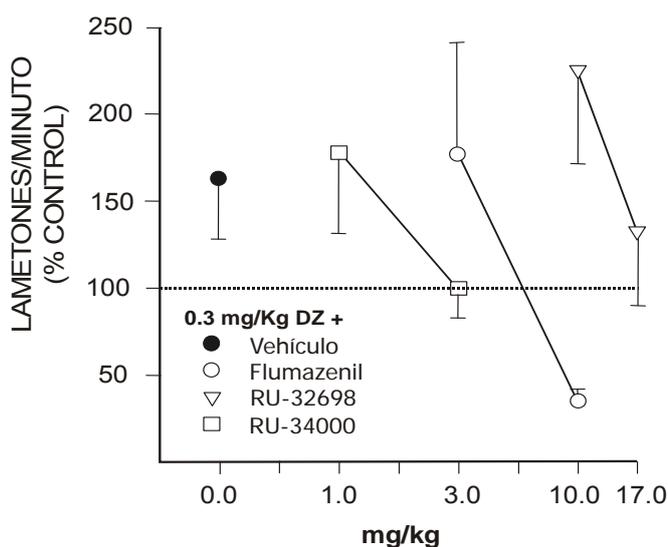


Figura 5.2. Efectos sobre la tasa de lametones de la combinación de diferentes dosis de flumazenil, RU-32698 y RU-34000 con 0.3mg/kg de diazepam, representado como el porcentaje de cambio con respecto a la media de lametones por minuto en las sesiones de control sin inyección.

La combinación de 0.3 mg/kg de diazepam con flumazenil (círculos blancos) resultó en un antagonismo del efecto anticastigo del diazepam que fue dependiente de la dosis de flumazenil: con la dosis de 3.0 mg/kg no se produjeron efectos apreciables, pero con la dosis de 10.0 mg/kg se redujeron los lametones por minuto incluso por debajo de los niveles basales de conducta castigada. Resultados parecidos se observaron tras la combinación de 0.3 mg/kg. de diazepam con el agonista inverso de benzodiazepinas RU-34000 (cuadrados blancos): con la dosis de 1.0 mg/kg no se apreció efecto alguno,

pero con la dosis de 3.0 mg/kg se bloqueó completamente el efecto anticastigo del diazepam (las dosis de 10.0 mg/kg. de flumazenil y de 3.0 mg/kg de RU-34000 por si solas, produjeron un efecto del 87.59% y del 84.89% respectivamente de cambio con respecto a la tasa de lametones de la condición de control en ausencia de inyección, no manifestando efectos apreciables por si mismos ni por lo tanto efectos ansiogénicos). Por último, la administración conjunta de 0.3 mg/kg de diazepam con el agonista parcial de benzodiazepinas RU-32698 (triángulos blancos) resultó en un incremento aún mayor de la bebida castigada cuando se combinó con la dosis de 10.0 mg/kg (del orden de un 50-75 % más) y una ausencia de efecto cuando se combinó con la dosis de 17.0 mg/kg.

5.4- DISCUSIÓN.

Los resultados del presente estudio indican, primero, que la polidipsia inducida por programa no castigada fue reducida dependiendo de la dosis por administraciones agudas de varias benzodiazepinas, tales como el diazepam (Sanger y Blackman, 1976; Mittleman y cols., 1988), el clordiazepóxido (Baccoti y Barrett, 1976), el oxazepam (otro agonista completo benzodiazepínico) y el agonista parcial benzodiazepínico RU-32698.

Segundo, todos los agonistas benzodiazepínicos mostraron efectos dependientes de la dosis en el componente de castigo. Las dosis bajas

generalmente no tuvieron efecto, dosis intermedias incrementaron la supresión de la bebida, y dosis altas suprimieron la polidipsia inducida por programa castigada. Estos resultados coinciden con estudios previos realizados con el diacepam (Flores y Pellón, 1998, 2000) y extienden el efecto anticastigo a otras benzodiazepinas, incluyendo el agonista parcial, RU-32698. El clordiazepóxido incrementó en cierto grado la bebida adjuntiva castigada tal como lo hizo el diacepam, mientras que el oxacepam y el RU-32698 sólo lo incrementaron la mitad de lo que lo hicieron el diacepam y el clordiazepóxido.

Las benzodiazepinas produjeron un incremento en la tasa de polidipsia inducida castigada a dosis más bajas que las requeridas para disminuir las tasas de polidipsia inducida no castigada, mostrando una gran especificidad en sus efectos. Estos resultados están en la misma línea que estudios previos en condicionamiento operante utilizando ratas y otros animales (Cook y Davidson, 1973; Kleven y Koek, 1999; Rowlett y cols., 2006). La potencia relativa de los efectos de las drogas sobre la polidipsia inducida por programa es comparable a los encontrados en conducta operante castigada (Houser, 1978). La clasificación con respecto a la potencia de los efectos sobre el incremento de tasa en polidipsia inducida por programa castigada fue la siguiente: diacepam>clordiazepóxido=oxacepam> RU-32698, exactamente igual a los resultados obtenidos en los efectos de detrimento de tasa en la polidipsia inducida por programa no castigada (Figura 5.1). En un estudio sobre conducta operante realizado con monos rhesus, el efecto anticastigo de las

benzodiazepinas correlaciona positivamente con el uso terapéutico de las benzodiazepinas en humanos, por ejemplo, el diazepam se mostró tres veces más potente que el clordiazepóxido (Rowlett y cols., 2006).

Los efectos anticastigo de diazepam fueron antagonizados, dependiendo de la dosis, por el antagonista benzodiazepínico flumazenil y por el agonista inverso RU-34000. Algunos estudios recientes muestran sin embargo, que las interacciones del flumazenil con el diazepam serían más complejas que las de un mero efecto antagónico, pudiendo reflejar las acciones del flumazenil como un agonista parcial inverso del GABA A (Rowlett y cols., 2006). El resultado obtenido con 10.0 mg/kg de flumazenil no solo antagonizó el efecto anticastigo de 0.3 mg/kg de diazepam, también suprimió los lametones, pudiendo reflejar un efecto anxiogénico típico de los agonistas inversos benzodiazepínicos. Las interacciones del flumazenil con el diazepam fueron similares a las interacciones del RU-34000 con el diazepam, lo que sugiere que el flumazenil puede tener una acción similar a la de un agonista inverso.

El agonista parcial RU-32698, dependiendo de la dosis, facilita o antagoniza los efectos del incremento de tasa producidos por la administración de 0.3 mg/kg de diazepam, o suprime la polidipsia inducida por programa. Los agonistas parciales benzodiazepínicos también han demostrado tener efectos mixtos en otras medidas de actividad ansiolítica (Jones, Hooks, Juncos y Justice, 1994). Cuando un agonista parcial no tiene efecto (tal como 17.0

mg/kg de RU-32698; ver Figura 5.1), se ha considerado que actúa antagonizando los efectos de los más eficaces agonistas benzodiazepínicos (Lelas, Rowlett y Spealman, 2001). Cuando los agonistas parciales tienen efecto (tal como 10.0 mg/kg de RU32698; ver Figura 5.1), estos efectos pueden aumentar los de los agonistas completos, y esto podría explicar, en teoría, la curva de respuesta dependiente de la dosis que resulta de la combinación del diazepam con diferentes dosis de RU-32698. Alternativamente, el detrimento observado en la respuesta cuando se combinaron 0.3 mg/kg de diazepam con 17.0 mg/kg de RU- 32698, podría reflejar simplemente una aditividad de las dosis.

Diversos estudios han demostrado que las benzodiazepinas ejercen efectos similares sobre la polidipsia inducida por programa y sobre la conducta operante, tanto en conducta castigada como no castigada. Las similitudes de los efectos de las drogas sobre modelos de conducta adjuntiva y conducta operante se han documentado con varias clases de drogas (Pellón y Flores, 2009). Los resultados del presente estudio extienden estas similitudes, mostrando como los efectos anticastigo del diazepam sobre la polidipsia inducida por programa castigada están mediados por el complejo de receptores benzodiazepínicos, es más, los efectos anticastigo de las benzodiazepinas sobre la respuesta operante castigada estarían mediadas por los receptores benzodiazepínicos.

6. EXPERIMENTO III

DIFERENCIAS INDIVIDUALES EN LA POLIDIPSIA INDUCIDA POR PROGRAMA: DIVERGENCIAS DOPAMINÉRGICAS NEUROANATÓMICAS*

6.1- INTRODUCCIÓN.

Desde hace tiempo se sabe que los neurotransmisores de dopamina afectan a diversas formas de procesar la conducta en mamíferos. Estas formas incluyen el aprendizaje y la formación de la memoria (Ettenberg, 1989; Wickens, 1990; Dunnett y Robbins, 1992; Beninger, 1993).

* Trabajo enviado a Behavioural Brain Research.

Los primeros trabajos de autoestimulación eléctrica intracraneal llevaron a una formulación sobre la existencia de uno o varios centros de placer en el cerebro, que serían los responsables del reforzamiento positivo observado en animales (Olds, 1956). El concepto de recompensa estaría relacionado con las consecuencias subjetivas producidas por la estimulación del o de los supuestos centros del placer existentes en el SNC, experimentadas como positivas y placenteras. El sistema mesolímbico-mesocortical actuaría como un circuito motivacional que traduciría los estímulos biológicamente relevantes, incluidos los ambientales y farmacológicos, en respuestas conductuales (Pierce y Kalivas, 1977b, Kalivas y Duffy, 1993b).

El sistema mesolímbico-mesocortical, localizado en la parte anterior del cerebro, está formado por una serie de núcleos interconectados entre sí de forma que permite una circulación relativamente fluida de información desde la porción ocupada por los núcleos del circuito límbico-estriado-pálido hacia los sistemas motores piramidal y extrapiramidal (Heimer, Alheid y Zahm, 1993; Pennartz, Groenewegen y Lopes da Silva, 1994; Wright, Beijer y Groenewegen, 1996). La porción dopaminérgica de este sistema se origina en el área tegmental ventral (del inglés, VTA) y forma una primera vía que manda eferentes desde las áreas productoras de dopamina A8, A9 y A10 del tegmento ventral del mesencéfalo a la porción lateral o concha (shell) y a la porción medial o centro (core) del núcleo accumbens (NAc), estructura situada en la porción ventral del cuerpo estriado. En la concha, a su vez, se originan eferencias gabaérgicas dirigidas hacia el tegmento

ventral, y hacia el tálamo dorsomedial y zona dorsal de la corteza prefrontal, vía el pálido ventral. Así mismo, desde la sustancia negra se envían eferencias dopaminérgicas de salida del sistema hacia los sistemas motores piramidal y extrapiramidal. Una segunda vía de este sistema parte también del VTA dirigiéndose hacia el centro del NAc y el pálido ventral dorsolateral para confluir en una vía única de carácter gabaérgico que se proyecta a tres estructuras claramente diferenciadas: la sustancia negra, la porción medial del núcleo subtalámico y el núcleo pedúnculo pontino. Las neuronas dopaminérgicas del VTA también inervan varios núcleos, incluyendo the NAc y el cortex prefrontal medial, constituyendo la base del sistema dopaminérgico mesolímbico el cual ha sido considerado como el substrato neural de las sustancias de abuso y de refuerzo en general (Wise, 2002; Pierce y Kumaseran, 2006)

Los efectos conductuales de la dopamina están mediados por receptores específicos, habiéndose identificado 5 subtipos (Gingrich y Caron, 1993; Sibley, Monsma y Shen, 1993). Éstos se agrupan en dos familias de receptores: la familia del receptor D1, que incluye los subtipos D1 y D5, y la familia del receptor D2, que incluye los subtipos D2, D3 y D4. Los receptores de ambas familias son parejas de nucleótidos de guanina ligados a proteínas, y tienen efectos diferentes en la actividad de la enzima adelinato ciclasa: los receptores del tipo D1 estimulan, y los del tipo D2 inhiben la producción del segundo mensajero AMPc.

Un gran número de investigadores ha sugerido que las conductas adjuntivas pueden tener características comunes con la excesividad conductual en humanos, y en particular con el abuso de drogas (Doyle y Samson, 1988; Riley y Weterington, 1989). Por tanto, nuestra mejor comprensión sobre la naturaleza de la conducta adjuntiva y sus correlatos neurofisiológicos, podría resultar de gran ayuda para interpretar e intervenir en el abuso de drogas. La conducta adjuntiva mejor caracterizada es la polidipsia inducida por programa, consistente en la ingestión excesiva de líquido por parte de animales que sin tener sed obtienen el reforzador comida a intervalos regulares de tiempo (Falk, 1961). Por otro lado, la forma más frecuente de autoadministración de drogas que tiene que ver con la ingestión de líquidos es el alcoholismo (Sanger, 1986a; Wayner, 2002).

Doyle y Samson (1988) demostraron que la ingestión de alcohol en el hombre puede ser una conducta adjuntiva, por relacionarse dicha ingestión con la duración del intervalo entre reforzamientos. Riley y Wetherington (1989) señalaron que la polidipsia inducida por programa puede ser un buen modelo de aproximación a la patología humana desde la investigación básica con animales, puesto que la topografía de la conducta es similar a la humana y se pueden conseguir efectos de tolerancia y dependencia a sustancias psicoactivas que puedan adulterar el agua.

Además del alcohol, existen otras drogas que los humanos toman a través de autoadministración oral. Leander y McMillan (1975) y Leander, McMillan y

Harris (1975a, 1975b) han descrito varios estudios en los cuales las ratas consumían soluciones de morfina o metadona mientras obtenían comida a través de reforzamiento intermitente. Otros trabajos han demostrado que las ratas ingieren soluciones de distintas drogas cuando son sometidas a programas de reforzamiento intermitente, por ejemplo, etonitaceno, un potente opiáceo (McMillan y Leander, 1976; Meisch y Stark, 1977); tranquilizantes tales como el pentobarbital (Meisch, 1969), el fenobarbital (Tang, Ahrendsen y Falk, 1981), el midazolam (Falk y Tang, 1987) o el clordiacepóxido (Sanger, 1977a; Falk y Tang, 1989); estimulantes como la cocaína (Tang y Falk, 1987; Falk y Tang, 1989; Falk, Ma y Lau, 1991), pequeñas dosis de d-anfetamina (Sanger 1977b) o nicotina (Lang, Latiff, McQueen y Singer, 1977).

Dantzer y cols. (1988a) y Dantzer, Terlouw, Tazi, Koolhaas, Bohus, Koob y Le Moal (1988b), estudiaron la existencia de diferencias individuales en la adquisición de polidipsia inducida por programa, y qué factores pudieran ser los responsables de las diferencias entre los animales que desarrollan polidipsia y los que no lo hacen. Estos autores argumentan que la capacidad para desarrollar polidipsia inducida por programa se debería a un perfil más general de una actividad neuroquímica y conductual que estaría relacionada con los sistemas dopaminérgicos. En esta misma línea de investigación, Mittleman y Valenstein (1986) encontraron que lesiones en la sustancia negra con 6-OHDA redujeron significativamente la polidipsia inducida por programa. La estimulación eléctrica en el hipotálamo lateral, por el contrario, favoreció la adquisición de polidipsia

inducida por programa (Mittleman y Valenstein, 1984), y lesiones con 6-OHDA en los núcleos caudado y accumbens alteraron el comer y el beber producidos por la estimulación eléctrica del hipotálamo lateral (Mittleman y Valenstein, 1985), por lo que también se puede concluir que estos resultados pudieran deberse a diferencias individuales en la actividad de los sistemas dopaminérgicos. Mittleman y cols. (1990) argumentaron que se producirían dos tipos de consecuencias según la localización de la lesión: una sería un desajuste motor que afectaría a la conducta de beber (decorticación y lesiones en el núcleo caudado) y la otra de naturaleza motivacional, que se produciría por las lesiones en el hipocampo y en el NAc.

Todas estas líneas de investigación están basadas en la hipótesis de que la polidipsia inducida por programa está eliciteda por la excitación motivacional o arousal que supone la comida al final del intervalo entre reforzadores (Killeen, Hanson y Osborne, 1978). Esta activación provocaría la aparición de conductas alternativas relacionadas con los estímulos disponibles en el ambiente, con la botella de agua en el caso de la polidipsia inducida por programa. Esta hipótesis guió la investigación del sustrato neurofisiológico responsable de la adquisición de la polidipsia inducida por programa hacia las regiones del SNC relacionadas con los sistemas de recompensa, es decir, hacía los sistemas dopaminérgicos (véanse las revisiones de Flores y Pellón, 2001; Pellón y Flores, 2009).

Para comprobar esta hipótesis, el objetivo del presente trabajo experimental ha sido profundizar sobre el sustrato neurofisiológico de la polidipsia inducida por programa. Se expuso a los animales a programas generadores de bebida adjuntiva, y dado que se suelen registrar amplias diferencias individuales en el consumo de agua (Mittleman y Valenstein, 1985; Mittleman y cols., 1986; Dantzer y cols., 1988b; López-Grancha, López-Crespo, Venero, Cañadas, Sánchez-Santed, Sandi y Flores, 2006), se estudió si dicha variabilidad conductual tendría un reflejo en el sustrato neuroquímico, medido de dos formas independientes. En primer lugar, y mediante el uso de técnicas autoradiográficas, se estudió la concentración de receptores dopaminérgicos en el cerebro de la rata (cambios en la unión a los subtipos de receptores dopaminérgicos D1 y D2) en función de la cantidad de conducta adjuntiva desarrollada. En segundo lugar, y mediante técnicas de inmunocitoquímica, se estudiaron los niveles de actividad neural en estructuras encefálicas relacionadas con el circuito motivacional a través de la inmunotinción de la proteína Fos.

6.2-MÉTODO

Sujetos

Se utilizaron 32 ratas macho de la raza Wistar experimentalmente ingenuas, obtenidas de Charles River (Lyon, Francia) con una edad aproximada de 70 días y un peso medio de 485 g (rango: 475-505 g). Una de las ratas fue

posteriormente retirada del estudio por problemas de salud. Los animales se alojaron en jaulas individuales y en un estabulario con control de temperatura (21° C), humedad (60%) y ciclo luz-oscuridad (luces encendidas entre 8.00 y 20:00 horas). Se mantuvieron con acceso continuado a la comida hasta que tuvieron 90 días de edad, momento en el cual se restringió el acceso a la comida para mantenerlas al 85% de su peso libre. Los animales tuvieron acceso libre al agua en todo momento. Todos los animales fueron tratados siguiendo la Directiva del Consejo de la Comunidad Europea 2003/65EC y el Real Decreto Español 1201/2005 sobre protección de animales utilizados para experimentación y actividades científicas.

Aparatos

Se emplearon 8 cajas de condicionamiento operante para roedores LI-836 (Letica Instruments, Barcelona) de 29 cm de largo, 24.5 cm de alto y 35.5 cm de alto. Las cajas se situaron dentro de cámaras de insonorización, asistidas con un sistema de ventilación y una pequeña ventana de observación en el panel izquierdo. El panel frontal de cada caja era de aluminio, la pared de la izquierda y la cubierta superior de metacrilato transparente, y el resto de las paredes de metacrilato negro. Se situó una botella de agua en la cara externa de la pared derecha, su tetina accesible a través de una abertura de 3.2 cm de ancho y 3.9 cm de alto, situada a 20 cm de la pared frontal y a 7 cm sobre el suelo. La tetina se dispuso a 2 cm de la abertura de la pared, de este modo las ratas podían lamer,

pero no podían mantener un contacto permanente con ella. Los lametones a la tetina fueron detectados al cerrarse el circuito eléctrico entre los pulsos formados por las 16 barras paralelas metálicas que constituían la rejilla del suelo y el de la tetina del biberón, por el contacto con la lengua del animal. La iluminación de las cajas fue a través de dos luces internas de 3W, situadas en la parte superior del panel frontal a ambos lados del comedero, y una luz ambiente de 25 W, colocada en la carcasa externa. El ruido ambiental producido por la ventilación fue de 60 dB, que sirvió para enmascarar otros posibles ruidos externos. Un expendedor de la marca Letica Instruments, localizado en la cara externa del panel frontal, permitió administrar bolitas de comida de 45 mg de peso (Bio-Serv) a un pequeño receptáculo interno situado en el centro de la pared frontal a 3.7 cm del suelo, que sirvió como comedero. La programación y el registro de los eventos fueron tomados a través de un ordenador de la serie Archimedes (Paul Fray Ltd) programado en Arachnid.

Para efectuar los cortes de tejido cerebral, se utilizó un criostato Reichert Jung Modelo 2800 Frigocut N (Letica Instruments, Barcelona) con una capacidad de precisión de entre 1 y 60 micras, y que se mantuvo refrigerado a una temperatura entre -15°C y -17°C . Los autorradiogramas se cuantificaron mediante un analizador de imágenes computerizado empleando una aplicación desarrollada por el NIH (National Institutes of Health, Estados Unidos) y comercializada por Scion Corporation (Estados Unidos). Para la cuantificación se empleó una cámara digital que se conectó mediante una tarjeta gráfica Scion a un

ordenador compatible Hewlett-Packart.

Para la cuantificación de células c-fos inmunoreactivas se utilizó un microscopio Leitz Dialux 20 con cámara lúcida (magnificación x 40), al que se acopló en los oculares una retícula de 1x1 cm, para registrar el número y localización de c-fos positivo.

Procedimiento conductual

Después de que cada rata se estabilizara al 85% de su peso libre, todos los animales fueron expuestos a una prueba de ingestión de agua en sus propias jaulas hogar. Durante dos días consecutivos, se les suministró 60 bolitas de comida de 45 mg (Bio-Serv) durante 30 minutos y se registró la cantidad total de agua consumida. A continuación, las ratas fueron expuestas durante 30 minutos a una sesión de adaptación a las cajas de condicionamiento, donde previamente se habían depositado 20 bolitas de comida en el comedero. Durante este tiempo, las cajas estuvieron iluminadas y la ventilación en funcionamiento, pero no se programó ninguna contingencia experimental ni se instalaron los biberones.

El experimento propiamente dicho comenzó al día siguiente. Las ratas fueron expuestas a un programa de tiempo fijo (TF) 30-s de presentación de bolitas de comida durante 30 minutos, 5 días por semana y por un total de 85 sesiones. Las botellas de agua se llenaron con 100 ml de agua fresca y se

colocaron en las cajas antes de cada sesión experimental. Cada sesión comenzó con la iluminación de las cajas, que se apagaron al concluir la misma. Durante el experimento se midieron, para cada rata y en cada sesión, el número total de lametones a la botella, lo que se transformó en la medida de lametones por minuto, y el volumen total de agua ingerido en ml. Estas mediciones se utilizaron posteriormente para dividir a los animales, por el valor de la mediana, en ratas muy bebedoras y poco bebedoras.

Autorradiografía cuantitativa de receptores

Una vez finalizado el Procedimiento Conductual, se asignaron 23 ratas a un experimento de autorradiografía cuantitativa de receptores, procediéndose al sacrificio de los animales mediante decapitación. Se extrajeron sus cerebros, se congelaron en isopentano (-40°C aproximadamente) durante 1 minuto y se mantuvieron a -80°C hasta que fueron cortados.

Los cerebros se montaron convenientemente protegidos en una nuez de criostato con Tissue-Tek. Se cortaron en el criostato descrito anteriormente, obteniéndose dos secciones coronales (20 micras) de cada una de las siguientes regiones cerebrales: corteza prefrontal (Fr1, Fr2 y Fr3), área tegmental ventral y núcleo accumbens (centro y concha). Todas las parejas de secciones se dispusieron en portas que habían sido previamente gelatinados y se almacenaron a -35°C hasta el día de marcaje con los ligandos radioactivos.

En el caso de los receptores dopaminérgicos de la familia D1, los portas se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos con 1nM de 3H-SCH23390 en tampón de 50mM Tris-ClH, 120mM de ClNa, 5mM de ClK, 1,5mM de Cl₂Ca y 4mM de Cl₂Mg (pH7,4). En el caso de los receptores de la familia D2, los portas se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos con 1 nM de 3H-Spiperone. La unión al subtipo de receptores dopaminérgicos D2 se obtuvo incubando con 1nM de 3H-YM 09151 y añadiendo al tampón de incubación 1 nM de 7-OH-DPAT (para desplazar la unión al subtipo de receptores D3) y 500 nM de L745870 (para desplazar la unión al subtipo de receptores D4). La unión no específica se evaluó por 10nM de Butaclamol. Tras la incubación, los portas se lavaron dos veces en el tampón de incubación (a 4°C) y dos veces en agua destilada. Una vez secados con aire frío, los portas se dejaron expuestos toda la noche al desecante Drierita (Sigma, España). Al día siguiente, los portas se expusieron a películas sensibles a tritio (3H-Hyperfilm, Amersham, España). Después de transcurrir 6-8 semanas de exposición, las películas autorradiográficas se revelaron con líquido Kodak-D19.

Una vez obtenidos los autorradiogramas, se cuantificaron mediante el analizador de imágenes descrito anteriormente. Los autorradiogramas fueron situados en un dispositivo que los iluminaba desde abajo. Todas las imágenes fueron corregidas mediante una rutina de código que igualaba la iluminación (contraste y brillo) de la imagen autorradiográfica a un fondo blanco

homogéneamente iluminado. Las imágenes fueron digitalizadas mediante un conversor analógico-digital que convertía cada pixel (correspondiente a un área de 20 x 20 μm) en valores de tonalidad de gris de 0 a 255, que representan la transmisión de la luz a través del autorradiograma. Estos valores de gris fueron a su vez convertidos en densidad óptica calibrada (OD) mediante la transformación de la escala de gris (0-255) a la inversa del logaritmo decimal ($\text{OD} = 1/\log \text{gris}$). Esta transformación lineal ayuda a corregir la falta de linealidad en los extremos de las tonalidades de gris.

Para traducir los valores de OD de los autorradiogramas a valores de radiactividad (nCi/mg), se emplearon unos patrones radiactivos compuestos de pasta de polímero conteniendo ^3H -ornitonina. La escala de grises de los patrones fue transformada a OD y ésta convertida a su vez a valores de radiactividad por unidad de área del patrón (según catálogo Amersham, España). Estos valores fueron transformados automáticamente a una escala logarítmica neperiana (Ln), resultando Ln OD versus Ln valores de radiactividad.

Para la identificación y discriminación de las estructuras, se utilizaron imágenes con diferentes niveles de umbral. Con este procedimiento se determina una Región de Interés (ROI), cuyos valores son posteriormente convertidos a concentraciones de fmol de proteína/mg de tejido equivalente. Este valor es restado del correspondiente a la imagen autorradiográfica que representa la unión no específica, obteniendo con ello el valor molar de la unión específica del

receptor. Estos datos fueron entonces convertidos mediante un programa en Visual-Basic a formato Excel, para su posterior análisis estadístico mediante el paquete SPSS 10.0 para Windows.

Inmunocitoquímica de la proteína Fos

Tras el Procedimiento Conductual descrito más arriba, 8 ratas fueron asignadas al experimento de inmunotinción de la proteína Fos. Los animales, previamente anestesiados con 1ml/100g de Tribon, fueron perfundidos intracardiamente con 0.9% de suero salino durante 5 minutos, seguido de 4% de paraformaldehído en tampón fosfato salino (PBS) 0.1M, pH 7.4, durante 20 minutos. Los cerebros fueron extraídos y postfijados en la misma solución fijadora usada para la perfusión (paraformaldehído) durante 18 horas a 4° C. Seguidamente se procedió a tres lavados en PBS cada 10 minutos, después de lo cual se mantuvieron durante dos días en sucrosa a 4°C.

Se efectuaron en el criostato cortes coronales de 40 micras de los cerebros, que fueron lavados tres veces en PBS. Como en el estudio anterior de autorradiografía de receptores, se eligieron las regiones cerebrales de la corteza prefrontal (Fr1, Fr2 y Fr3), el área tegmental ventral y el núcleo accumbens (centro y concha).

Los cortes cerebrales fueron incubados durante 20 minutos en 0.3% de H₂O₂ para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena, seguido por otros tres lavados en PBS. Las secciones fueron entonces incubadas en 10% de suero de cabra durante 45 minutos (PBS con 3% de Triton-X), después en 2% de suero de cabra durante 20 minutos, y finalmente en 0.1 mg/ml de anticuerpo Fos durante 48 horas a 4°C, dilución 1:15000 en anticuerpo policlonal de conejo (Santa Cruz Biotechnology, California, Estados Unidos), 2% de suero de cabra y 0.1% de albúmina de suero bovino en PBS. Tras dos lavados en PBS, se procedió a la incubación durante 90 minutos en un segundo anticuerpo (cabra anti-conejo IgG, concentración: 1:250).

El complejo Fos y anti Fos fue posteriormente visualizado mediante el protocolo de Vector's Vectastain Elite, sistema ABC (Vector Laboratories, Burlingame, California, Estados Unidos), seguido por incubación en 3,3'-diaminobenzidina (DAB). La reacción producida por la peroxidasa fue intensificada con clorhidrato de níquel. El procedimiento DAB se usó siguiendo el protocolo de Vector's DAB Substrate Kit para peroxidasa de rábano. Las secciones de los cerebros fueron aclaradas en PBS y montadas sobre portas gelatinados dejándolas secar al aire durante 3 días, deshidratadas mediante el paso por alcoholes y protegidas por cubreobjetos adheridos con pegamento DPX.

6.3-RESULTADOS

Autorradiografía cuantitativa de receptores

Como resultado de la exposición al programa de TF 30-s, los animales se ajustaron a la intermitencia en la presentación del reforzador y desarrollaron la conducta de ingestión de agua. La mediana de los lametones por minuto al pitorro de la botella fue de 17.23. Se dividieron los animales en altos y bajos bebedores en función de dicho valor de la mediana, resultando en dos grupos de ratas que fueron estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). Las altas bebedoras efectuaron un promedio de 46.35 lametones por minuto y las bajas bebedoras de 7.67 lametones por minuto.

En la Figura 6.1 se muestra la media y el error típico de la unión a los receptores D1 y D2 para las diferentes estructuras estudiadas en los dos grupos de animales formados según el nivel de bebida (altos y bajos bebedores). En general, se puede observar que en las ratas poco bebedoras (círculos negros) hay una mayor unión a los receptores D1 que en las ratas muy bebedoras (círculos blancos), y que hay una mayor unión a los receptores D2 en las ratas muy bebedoras con respecto a las ratas poco bebedoras.

Los análisis de varianza confirmaron la existencia de interacción significativa entre el tipo de receptor y el nivel de bebida para el córtex prefrontal

[F(1,21)=5.68, $p<0.05$] y el área tegmental ventral [F(1,21)=6.27, $p<0.05$]. Los resultados para el núcleo accumbens, sin embargo, sólo se aproximaron a la significación estadística [F(1,21)=3.16, $p=0.09$].

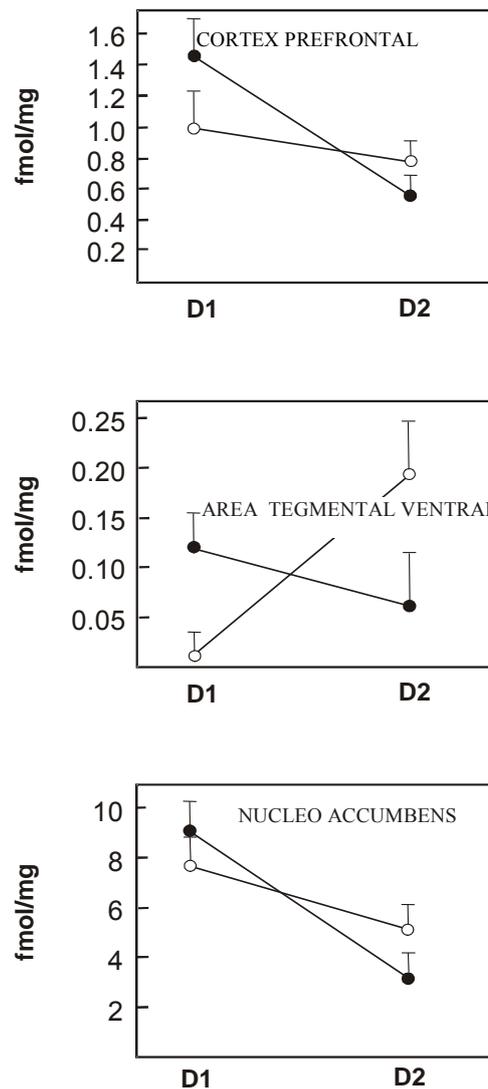


Figura 6.1. Media y error típico de la concentración de fmoles de proteína por mg de tejido equivalente para los receptores dopaminérgicos D1 y D2 en diferentes estructuras cerebrales, tanto para los animales que mostraron bebida excesiva cuando fueron expuestos a un programa de tiempo fijo 30-s de liberación de comida (Altas Bebedoras- ○), como para los que no lo hicieron (Bajas Bebedoras- ●).

Inmunocitoquímica de la proteína Fos

Como resultado de la exposición al programa de TF 30-s, los animales se ajustaron a la intermitencia en la presentación del reforzador y desarrollaron la conducta de ingestión de agua. La mediana de los lametones por minuto al pitorro de la botella fu de 30.33. Se dividieron los animales en altos y bajos bebedores en función del valor de la mediana, resultando en dos grupos de ratas que resultaron ser estadísticamente diferentes ($p < 0.05$). Los altos bebedores efectuaron un promedio de 107.35 lametones por minuto y los bajos bebedores de 0.90 lametones por minuto.

En la Tabla 6.1 se presentan las medias y desviaciones típicas del número de células fos positivas en las diferentes estructuras estudiadas para los dos grupos de animales formados según el nivel de bebida (altos y bajos bebedores). En general se puede observar que las ratas altas bebedoras mostraron una mayor actividad neuronal que las bajas bebedoras. No obstante, sólo resultó estadísticamente significativa la diferencia entre grupos en el córtex prefrontal [$t(6)=2.91$, $p=0.03$]. Todas las demás comparaciones no mostraron significación estadística ($p > 0.05$).

	ALTAS BEBEDORAS	BAJAS BEBEDORAS
CÓRTEX PREFRONTAL	86.00±12.49	42.00±23.73
ÁREA TEGMENTAL VENTRAL	29.66±13.31	13.80±12.63
NÚCLEO ACCUMBENS	63.00±37.72	50.60±25.40

Tabla 6.1. Medias y desviaciones típicas del número de células fos positivas para las ratas bebedoras y no bebedoras en las diferentes regiones cerebrales estudiadas. Los animales fueron expuestos a un programa de Tiempo Fijo 30-s de administración de comida y tuvieron agua disponible en todo momento a lo largo de las sesiones experimentales.

6.4- DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio ha sido conocer el substrato neurobiológico de la polidipsia inducida por programa, examinando las diferencias individuales en el consumo de agua mediante técnicas autorradiográficas en el estudio de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 y técnicas de inmunocitoquímica a través de la inmunotinción de la proteína Fos.

Todos los animales desarrollaron polidipsia inducida por programa como resultado de la exposición a los programas intermitentes de exposición de comida, tanto en el experimento de técnicas autorradiográficas como en el de inmunocitoquímica de la proteína Fos.

Autorradiografía cuantitativa de receptores.

En general se observan diferencias en la unión a los receptores dopaminérgicos D1 y D2 entre las ratas poco bebedoras y las muy bebedoras. Estos resultados concuerdan con los datos existentes en la literatura, los cuales muestran la implicación de la dopamina en la polidipsia inducida por programa (Williams y White, 1984; Jones y cols., 1994; Mittleman y cols., 1994; Flores y Pellón, 1995). Es sabido que la dopamina a través de los receptores dopaminérgicos D1 y D2 es un neurotransmisor que actúa en la integración sensorial, motivacional y en las funciones motoras (Miller, Wickens y Beninger, 1990; Feldman, Meyer y Quenzer, 1997; Emilien, Maloteaux, Geurts, Hoogenberg y Cragg, 1999). En concreto, se aprecia una mayor unión a los receptores dopaminérgicos D1 en las ratas poco bebedoras y una mayor unión a los receptores dopaminérgicos D2 en las ratas muy bebedoras, lo que sugiere diferentes implicaciones de estos receptores en la polidipsia inducida por programa. Estudios farmacológicos previos han mostrado la implicación de estos dos tipos de receptores dopaminérgicos en la polidipsia inducida por programa, investigando los cambios observados en ellos mediante la administración de

agonistas y antagonistas y observando sus efectos sobre la polidipsia (Snodgrass y Allen, 1988; Todd, Beck y Martin-Iverson, 1992; Didriksen y Christensen, 1993; Didriksen y cols., 1993; Mittleman y cols., 1994). En este sentido, algunos estudios han mostrado efectos diferentes en la manipulación de los receptores dopaminérgicos D1 y D2. Por ejemplo, la administración crónica del agonista dopaminérgico del receptor D1 SKF-38393 no afecta a la ingestión de agua, mientras que el tratamiento crónico con el agonista dopaminérgico del receptor D2 quinpirole incrementa la ingestión de agua, efecto que se repite con la anfetamina y que se revierte con el antagonista dopaminérgico del receptor D2 domperidone (Fraoli, Cioli y Nencini, 1997). Los efectos reforzadores del alcohol también podrían estar mediados predominantemente por la liberación de dopamina en el sistema dopaminérgico, y es sabido que el receptor dopaminérgico D2 está involucrado en el alcoholismo y en general en las drogas de abuso (Crabbe, Phillips, Kosobud y Belknap, 1990; Crabbe, 1999; Crabbe, 2002; Le Foll, Gallo, Strat, Lu y Gorwood, 2009), sugiriendo una posible vulnerabilidad en las ratas muy bebedoras respecto a la ingestión de alcohol. En este sentido, recientes estudios han propuesto que la polidipsia inducida por programa podría tener un substrato genético de susceptibilidad al alcohol (Gilpin, Badia-Elder, Elder y Stewart, 2008).

En segundo lugar, los resultados confirman la existencia de interacción significativa entre el tipo de receptor y el nivel de bebida para el cortex prefrontal y el area tegmental ventral, aproximándose a la significación estadística en el

núcleo accumbens. Es sabido que en el núcleo accumbens se localizan funciones de reforzamiento y estrés (Seligman, 1978; Le Moal y Simon, 1991; Blaha y Phillips, 1992; Bassareo y Di Chiara, 1997). Por su parte, el área tegmental ventral modula la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Spanagel y Shippenberg, 1992) y en el cortex prefrontal (Wise, 2002; Pierce y Kumaseran, 2006). Weissenborn y cols. (1996) encontraron, en un experimento sobre polidipsia inducida por programa en ratas, que la síntesis de la dopamina se incrementaba progresivamente en el núcleo accumbens a lo largo de las sesiones experimentales. Sin embargo, estudios conductuales han demostrado que una vez establecida la polidipsia inducida por programa se produce una disminución de dopamina. Por lo tanto, la mayor unión a los receptores dopaminérgicos D2 en las ratas muy bebedoras en el núcleo accumbens podría implicar la regulación al alza de este receptor.

La corteza prefrontal es el mayor blanco del sistema dopaminérgico y está caracterizada por una densa inervación dopaminérgica (Fallon y Loughlin, 1982), pudiendo estar implicada en el desarrollo de polidipsia inducida por programa, como se ha venido demostrando mediante los efectos reductores de dependencia selectiva de dosis de cocaína sobre la bebida adjuntiva, sin afectar sustancialmente a la actividad locomotora y a la presión operante de la palanca, comparado con los efectos encontrados en el núcleo accumbens (Jones y cols., 1994).

Inmunocitoquímica de la proteína Fos.

En el estudio mediante técnicas inmunocitoquímicas a través de la inmunotinción de la proteína Fos, los resultados indican una mayor actividad neuronal en ratas altas bebedoras con respecto a las bajas bebedoras, resultando significativa la diferencia entre los dos grupos en el cortex prefrontal. Es sabido que en ausencia de actividad neuronal, la actividad transcripcional del gen c-fos es baja, con una asociación escasa de transducción de actividad proteínica. El incremento en la expresión de la proteína Fos después de estimulación puede descubrir la localización de la actividad neuronal (Sagar, Sharp y Curran, 1988; Morgan y Curran 1991). El estrés induce a alteraciones en la expresión de la proteína Fos en muchas áreas del cerebro (Kovacs, 1998), entre las que se encuentran las neuronas mesencefálicas dopaminérgicas (Deutch, Lee y Gillham, 1991). El cortex prefrontal está implicado en la modulación de patrones que contribuyen a la generación de conductas ante el estrés, siendo un potencial blanco para tratamientos de drogas y desórdenes relacionados con el mismo (Spencer, Ebner y Day, 2004). La corteza prefrontal también modula las respuestas del eje pituitario adrenal ante el estrés (Van Eden y Buijs, 2000; Fuster, 2001), y existen evidencias que sugieren que la corteza prefrontal procesa las respuestas ante diferentes tipos de estresores (Diorio, Viau y Meaney, 1993; Figueiredo, Bruestle, Bodie y Dolgas, 2003). Por ejemplo, Rybinin, Melia, Cole, Bloom y Wilson (1995) informaron que la localización de la proteína Fos mediante inmunocitoquímica demuestra que el estrés moderado conduce a la

inducción de la expresión de la proteína Fos en la corteza prefrontal. Westenbroek, Den Boer y Ter Horst, Roos, Kuipers, Trentani, y Den Boer (2003), utilizando un modelo de estrés suave crónico, encontraron que el estrés indujo un incremento en el Fos en la corteza prefrontal, pero no en el núcleo accumbens. Todo ello sugiere que el sistema dopaminérgico es particularmente sensible al estrés (Horger y Roth, 1996) y que la dopamina tiene un importante papel modulador del estrés en la corteza prefrontal (Law-Tho, Hirsch y Crepel, 1994).

Discusión Final

Tanto en el estudio mediante autorradiografía cuantitativa de receptores como en el de inmunocitoquímica de la proteína Fos, se han encontrado diferencias entre las ratas poco bebedoras y las muy bebedoras. Estas diferencias pudieran estar relacionadas con diferencias individuales en la responsividad de los sistemas dopaminérgicos, como lo demuestran los diferentes efectos que ejercen las drogas dopaminérgicas en las ratas muy bebedoras y en las poco bebedoras (Lopez-Grancha y cols., 2008). Las diferencias observadas en los receptores dopaminérgicos D1 y D2 en las diferentes áreas del cerebro entre las ratas poco bebedoras y las muy bebedoras, sugieren que las diferencias individuales en la polidipsia inducida por programa podrían estar asociadas a diferencias genéticas en el sistema dopaminérgico, con una especial implicación del cortex prefrontal.

En la corteza prefrontal también se modulan patrones que contribuyen a generar conductas ante el estrés (Spencer y cols., 2004), siendo un potencial blanco para tratamientos de drogas y desórdenes relacionados con el mismo, pudiendo procesar respuestas ante diferentes estresores e indicando que los dos tipos de receptores dopaminérgicos (D1 y D2) pueden tener diferentes roles (Spencer y cols., 2004). Por todo ello, la polidipsia inducida por programa ha sido propuesta como un modelo conductual para el estudio de las drogas de abuso (Riley y Wetherington, 1989; Wayner, 2002; Myracle, Lopez-Grancha, Flores, Glowa y Riley, 2005; Gilpin y cols., 2008) y psicopatologías asociadas al trastorno obsesivo compulsivo (Woods y cols., 1993; Woods-Kettelberger, Smith, Corbett, Szewczak, Roehr, Bores, Klein y Kongsamut, 1996, 1997; Hogg y Dalvi, 2004; Rosenzweig-Lipson, Sabb, Snack, Mitchell, Lucki, Malberg, Grauer, Brennan, Cryan, Sukoff Rizzo, Dunlop, Barrett y Marquis, 2007; Schechter, Lin, Smith, Zhang, Shan, Platt, Brandt, Dawson, Cole, Bernotas, Robichaud, Rosenzweig-Lipson y Beyer, 2007; Platt, Beyer, Schechter y Rosenzweig-Lipson, 2008), los cuales podrían deberse a factores genéticos relacionados con el sistema dopaminérgico, y por tanto la polidipsia inducida por programa podría estar involucrada en la vulnerabilidad a las drogas de abuso y/o a conductas compulsivas.

En resumen, estos resultados demuestran la implicación del sistema dopaminérgico en las diferencias individuales de la polidipsia inducida por

programa. En concreto, se aprecian diferencias neuroanatómicas en la unión a los receptores dopaminérgicos D1 y D2 en diferentes áreas del cerebro del sistema mesocorticolímbico y en la expresión de la proteína Fos en el cortex prefrontal entre las ratas poco bebedoras y las muy bebedoras. Estos resultados confirman la hipótesis de la diferente función dopaminérgica entre las ratas poco bebedoras y las muy bebedoras (Lopez-Grancha y cols., 2006; Lopez-Grancha, Lopez-Crespo, Sanchez-Amate y Flores, 2008), y señala a la polidipsia inducida por programa como un modelo conductual para determinar posibles vulnerabilidades relacionadas con desordenes en el sistema dopaminérgico.

Todo ello apuntaría hacia las hipótesis de la polidipsia inducida por programa que proponen que el substrato fisiológico de adquisición de la bebida adjuntiva podría localizarse en la proyección mesolímbica, mientras que el mecanismo fisiológico de mantenimiento sería de carácter endocrino, siendo posible sugerir una relación entre los sistemas motivacionales y de refuerzo y los sistemas de respuesta al estrés y proporcionando evidencias de la vinculación del sistema dopaminérgico mesolímbico y del eje pituitario adrenal (Mittleman y cols., 1992; Samyai, McKittrick McEwen y Kreek, 1998; Lucas, Celen, Tamashiro, Blanchard, Blanchard, Markham, Sakay y McEwen, 2004) y el papel que ambos juegan en el estrés y consumo de sustancias de abuso.

7. CONCLUSIONES

EXPERIMENTO I: LOS EFECTOS DE LOS AGENTES DOPAMINÉRGICOS SOLOS Y EN COMBINACIÓN DE *d*-ANFETAMINA, SOBRE LA POLIDIOSIA INDUCIDA POR PROGRAMA.

♦ La administración de *d*-anfetamina redujo la tasa de lametones de forma dependiente de la dosis.

♦ Los antagonistas dopaminérgicos SCH23390 (antagonista del receptor D1), eticlopride (antagonista de receptor D2) y flupentixol (antagonista de los receptores D1 y D2), también redujeron la tasa de lametones de forma dependiente de la dosis.

♦ La co-administración de SCH-23390, eticlopride o flupentixol con *d*-anfetamina potenció, en general, los efectos supresores de la *d*-anfetamina sobre la tasa de lametones reducida previamente por la *d*-anfetamina.

◆ Ninguno de los antagonistas dopaminérgicos tuvo efecto sobre el cuarto de vida de la tasa de lametones, pero la dosis de 1.0 mg/kg de *d*-anfetamina redujo el cuarto de vida en todas las condiciones para todos los animales. El SCH-23390 y el flupentixol, con actividad sobre los receptores D1, revirtieron el efecto de la *d*-anfetamina sobre el cuarto de vida. Este resultado no se observó con la administración previa del antagonista D2 eticlopride.

◆ El agonista D1 SKF-38393 y el agonista D2 quinpirole, produjeron ligeros incrementos o ausencia de efecto a las dosis más bajas, y a medida que se incrementó la dosis se redujo la tasa de lametones.

◆ Los dos agonistas dopaminérgicos, cuando se co-administraron con *d*-anfetamina, potenciaron los efectos de esta última. La actividad sobre los receptores D1 es la que parece más relevante. El SKF-38393 potenció con mayor claridad que el quinpirole el efecto reductor de la *d*-anfetamina sobre la tasa de lametones.

◆ Tanto agonistas como antagonistas dopaminérgicos redujeron la polidipsia inducida por programa. Sin embargo, los antagonistas D1, y no los D2, revirtieron el efecto de la anfetamina sobre el curso temporal de esta conducta, y los agonistas D1 potenciaron los efectos de la *d*-anfetamina más que las sustancias con actividad D2.

EXPERIMENTO II: ANÁLISIS FARMACOLÓGICO DE LOS EFECTOS DE LAS BENZODIACEPINAS SOBRE LA POLIDIPSIA INDUCIDA POR PROGRAMA CASTIGADA EN RATAS

◆ La polidipsia inducida por programa no castigada fue reducida, dependiendo de la dosis, por administraciones agudas de los agonistas completos benzodiazepínicos diazepam, clordiazepóxido y oxazepam, así como el agonista parcial benzodiazepínico RU-32698.

◆ Todos los agonistas benzodiazepínicos mostraron efectos dependientes de la dosis en el componente de castigo. Las dosis bajas generalmente no tuvieron efecto, dosis intermedias incrementaron la bebida castigada, y dosis altas suprimieron aun más la polidipsia inducida por programa castigada. El clordiazepóxido incrementó la bebida adjuntiva castigada en la misma medida que lo hizo el diazepam, mientras que el oxazepam y el RU-32698 sólo la incrementó la mitad de lo que lo hicieron el diazepam y el clordiazepóxido.

◆ Las benzodiazepinas indujeron un incremento en la tasa de polidipsia inducida castigada a dosis más bajas que las requeridas para disminuir las tasas de polidipsia inducida no castigada, mostrando una gran especificidad en sus efectos.

♦ La clasificación con respecto a la potencia de los efectos sobre el incremento de tasa en polidipsia inducida por programa castigada fue la siguiente: diacepam>clordiacepóxido=oxacepam>RU-32698, exactamente igual a los resultados obtenidos en los efectos de detrimento de tasa en la polidipsia inducida por programa no castigada.

♦ Los efectos anticastigo de diacepam fueron antagonizados, dependiendo de la dosis, por el antagonista benzodiazepínico flumacenil, y por el agonista inverso RU-34000. Las interacciones del flumacenil con el diacepam fueron similares a las interacciones del RU-34000 con el diacepam, lo que sugiere que el flumacenil puede tener una acción similar a la de un agonista inverso.

EXPERIMENTO III: DIFERENCIAS INDIVIDUALES EN LA POLIDIPSIA INDUCIDA POR PROGRAMA: DIVERGENCIAS DOPAMINÉRGICAS NEUROANATÓMICAS.

♦ En la unión a los receptores dopaminérgicos D1 y D2 se apreciaron diferencias entre las ratas poco bebedoras y las muy bebedoras, observándose una mayor unión a los receptores dopaminérgicos D1 en las ratas poco bebedoras y una mayor unión a los receptores dopaminérgicos D2 en las ratas muy bebedoras. (Autorradiografía cuantitativa de receptores).

◆ El tipo de receptor y el nivel de bebida mostraron una interacción significativa para el cortex prefrontal y el area tegmental ventral, aproximándose a la significación estadística en el núcleo accumbens (Autorradiografía cuantitativa de receptores).

◆ Las ratas altas bebedoras mostraron una mayor actividad neuronal con respecto a las bajas bebedoras, resultando significativa la diferencia entre los dos grupos en el cortex prefrontal. (Inmunocitoquímica de la proteína Fos).

◆ Tanto en el estudio mediante autorradiografía cuantitativa de receptores como en el de inmunocitoquímica de la proteína Fos, se han encontrado diferencias entre las ratas poco bebedoras y las muy bebedoras. Las diferencias observadas en los receptores dopaminérgicos D1 y D2 entre las ratas poco bebedoras y las muy bebedoras, y la mayor actividad neural de las ratas muy bebedoras, tendrían una especial implicación del cortex prefrontal.

Los resultados finales de la presente Tesis Doctoral sugieren:

► Que los efectos supresores de agonistas y antagonistas dopaminérgicos sobre la polidipsia inducida por programa pudieran tener orígenes distintos: específico sobre la bebida adjuntiva para los D1 e inespecífico, por las alteraciones motoras que producen, para los D2, y una de las hipótesis sobre la polidipsia inducida por programa defiende la idea de que

esta conducta es la expresión de la motivación asociada a la aparición de comida de forma intermitente

► Los efectos anticastigo de las benzodiazepinas sobre la polidipsia inducida por programa castigado y sobre la respuesta operante castigada estarían mediados de forma parecida por el complejo de receptores benzodiazepínicos.

► Las diferencias individuales encontradas en la polidipsia inducida por programa podrían estar asociadas a diferencias genéticas en el sistema dopaminérgico, con una especial implicación del cortex prefrontal.

8. BIBLIOGRAFIA

Allen, J.D. y Kenshalo, D.R. (1976). Schedule-induced drinking as a function of interreinforcement interval in the rhesus monkey. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*. 26: 257-267.

Amalric, M., Berhow. M., Polis, I. y Koob, G.F. (1993). Selective effects of low-dose D2 dopamine receptor antagonism in a reaction-time task in rats. *Neuropsychopharmacolog*. 8:195-200.

Arday, J.y Pellón, R. (2004). Effects of withholding the opportunity to press the operant lever on the maintenance of schedule-induced drinking in rats. *Revista Mexicana de Analisis deConducta*. 30:79-91.

Atrens, D.M. (1973). Schedule-induced polydipsia and polyphagia in non deprived rats reinforced by intracranial stimulation. *Learning and Motivation*. 4: 320-326.

Azrin, N.H., Hutchinson, R.R. y Hake, D.F. (1966). Extinction-induced aggression. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*. 9: 191-201.

Bacotti, A.V. y Barrett, J.E. (1976). Effect of chlordiazepoxide on schedule-controlled responding and schedule-induced drinking. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 4: 299-304.

Barrett, J.E. y Weinberg, E.S. (1975). Effect of chlordiazepoxide on schedule-induced water and alcohol consumption in the squirrel monkey. *Psychopharmacology*. 40: 319-328.

Barrett, J.E., Stanley, J.A. y Weimberg, E.S. (1978). Schedule-induced water and ethanol consumption as a function of the interreinforcement interval in the squirrel monkey. *Physiology and Behavior*. 21:453-455.

Barrett, J.E., Brady L.S., Stanley, J.A., Mansbach, R.S.y Witkin J.M. (1986). Behavioral studies with anxiolytic drugs: II. Interactions of zopiclone with ethyl-bcarboline- 3-carboxylate and Ro 15-1788 in squirrel monkeys. *Journal of Pharmacology Experimental Therapy*. 236: 313-319.

Barrett, J.E., Witkin, J.M., Mansbach, R.S., Skolnick, P. y Weissman, B.A. (1986). Behavioral studies with anxiolytic drugs III. Antipunishment actions of buspirone in the pigeon do not involve benzodiazepine receptor mechanisms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 238: 1009-1013.

Bassareo, V. y Di Chiara, G. (1997). Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum. *Journal of Neuroscience*. 17:851-861.

Beninger, R.J. (1993). Role of D1 and D2 receptors in learning. En J.L. Waddington (Ed.). *D1-D2 dopamine receptor interactions* (pp. 115-157). Academic Press, London.

Berridge, K. C. y Aldridge J. W. (2000). Super-stereotypy 1: Enhancement of a complex movement sequence by systemic dopamine D1 agonists. *Synapse*. 37, 194-204.

Blaha, C.D. y Phillips, A.G. (1992). Pharmacological evidence for common mechanisms underlying the effects of neurotensin and neuroleptics on in vivo dopamine efflux in the rat nucleus accumbens. *Neuroscience*. 49: 867-877.

Bolles, R.C. (1961). The interaction of hunger and thirst in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 54: 580-584.

Bond, N., Blackman, D.E. y Scruton, P. (1973). Supresion of operant behaviour and schedule-induced licking in rats. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*. 20: 375-383.

Brett, L.P. y Levine, S. (1979). Schedule-induced polydipsia suppresses pituitary-adrenal activity in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 93: 946-956.

Brett, L.P. y Levine, S. (1981). The pituitary-adrenal response to minimized schedule-induced drinking. *Physiology and Behavior*. 26: 153-158.

Brett, L.P., Patterson, J. y Levine, S. (1982). Adjunctive drinking and the pituitary-adrenal response: effects of prior aversive stimulation (preshock). *Physiology and Behavior*. 29: 219-223.

Burks, C.D. (1970). Schedule-induced polydipsia: are response-dependent schedules a limiting condition ?. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*. 13: 351-358.

Byrd, L.D. (1973). Effects of d-amphetamine on schedule-controlled key pressing and drinking in the chimpanzee. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 185: 633-641.

Byrd, L.D. (1974). Modification of the effects of chlorpromazine on behavior in the chimpanzee. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 189: 24-32.

Callahan, P. M., Appel, J. B. y Cunningham K. A. (1991). Dopamine D1 and D2 mediation of the discriminative stimulus properties of d-amphetamine and cocaine. *Psychopharmacology*. 103: 50-55.

Cantor, M.B. y Wilson, J.F. (1978). Polydipsia induced by a schedule of brain stimulation reinforcement. *Learning and Motivation*. 9: 428-445.

Chen, J. (1993). Dopaminergic mechanisms and brain reward, *Neuroscience*. 5: 315-320.

Christie, M.J., Beart, P.M., Louis, W.J., Gibson, S.J., Singer, G. y Papasaya, M. (1986). 6-Hydroxydopamine and excitotoxin lesions of medial prefrontal cortex to affect schedule-induced drinking in the rat. *Behavioral Brain Research*. 19: 183-186.

Clark, I.L. (1962). Some observations of the adventitious reinforcement of drinking under food reinforcement. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*. 5: 61-63.

Cohen, I.L. (1975). The reinforcement value of schedule-induced drinking. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*. 23: 37-44.

Colpaert, F. C., Niemegeers, C. J. E. y Jansen, P. A. J. (1978). Discriminative stimulus properties of cocaine and d-amphetamine and antagonism by haloperidol: A comparative study. *Neuropharmacology*. 17:937-942.

Cook, L. y Davidson A.B. (1973). Effects of behaviorally active drugs in a conflict punishment procedure in rats. En: Garattini, S., Mussini, E., Randall, L.O., (Eds). *The benzodiazepines*. (pp. 327-345). New York: Raven.

Cooper, S.J. (1982). Specific benzodiazepine antagonist Ro15-1788 and thirst-induced drinking in the rat. *Neuropharmacology*. 21: 483-486.

Cooper, S.J. y Estall, L.B. (1985). Behavioral pharmacology of food, water and salt intake in relation to drug actions at benzodiazepine receptors. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 9: 5-19.

Crabbe, J.C., Phillips, T.J., Kosobud, A. y Belknap, J.K. (1990). Estimation of genetic correlation: Interpretation of experiments using selectively bred and inbred animals. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research*. 14:141-51.

Crabbe, J.C. (1999). Animal models in neurobehavioral genetics: Methods for estimating genetic correlation. En: Mormede, P., Jones, B.C. (Eds). *Neurobehavioral genetics: Methods and applications*. (pp. 121-138). CRC press, Boca Raton, FL.

Dantzer, R., Terlouw, C., Mormede, P. y Le Moal, M. (1988a). Schedule-induced polydipsia experience decreases plasma corticosterone levels but increases plasma prolactin levels. *Physiology and Behavior*. 43: 275-279.

Dantzer, R., Terlouw, C., Tazi, A., Koolhaas, J.M., Bohus, B., Koob, G.F. y Le Moal, M. (1988b). The propensity for schedule-induced polydipsia is related to differences in conditioned avoidance behaviour and in defense reactions in defeat test. *Physiology and Behavior*. 43: 269-273.

Deutch, A.Y., Lee, M.C., Gillham, M.H. (1991). Stress selectively increases Fos protein in dopamine neurons innervating the prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*. Vol 1 (4), Jul-Aug.: 273-292.

Dews, P.B. (1958). Studies on behavior: IV. Stimulant actions of methamphetamine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 122: 137-147.

Didriksen, M. y Christensen, A.V. (1992). Schedule induced polydipsia (SIP) A specific model for antipsychotic compounds? *Journal of Pharmacology*, Abstract Book BAP/EBPS Meeting 2-7 August Cambridge, U.K, A64.

Didriksen, M. y Christensen, A.V. (1993). The attenuation of schedule induced polydipsia by dopamine blockers is not an expression of extrapyramidal side effect liability. *Behavioural Pharmacology*. 4: 517-522.

Didriksen, M., Olsen, G. M. y Christensen, A. V. (1993). Effect of clozapine upon schedule-induced polydipsia (SIP) resembles neither the actions of dopamine D1 nor D2 blockade. *Psychopharmacology*. 113, 250-256.

Didriksen, M. y Christensen, A. V. (1994). The effects of amphetamine, phencyclidine, dopaminergic antagonists and atypical neuroleptics on schedule-induced polydipsia (SIP) are distinguishable. *Behavioural Pharmacology*. 5: 32-41.

Diorio, D., Viau, V. y Meaney, M.J. (1993). The role of the medial prefrontal cortex (cingulated girus) in the regulation of hypothalamic-pituitari-adrenal responses to stress. *Journal of Neuroscience*. 13: 3839-3847.

Dourish, C.T. (1983). Dopamine involvement in the control of drinking behavior: a brief review. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 7: 487-493.

Doyle, T.F. y Samson, H.H. (1988). Adjunctive alcohol drinking in humans. *Physiology and Behavior*. 44: 775-779.

Dunham, P.J. (1971). Punishment: method and theory. *Psychological Review*. 78: 58-70.

Dunnett, S.B. y Robbins, T.W. (1992). The funcional role of mesotelencephalic dopamine systems. *Biological Reviews*. 67: 491-518.

Dworkin, S.I., Bimle C y Miyauchi, T. (1989). Differential effects of pentobarbital and cocaine on punished and nonpunished responding. *Journal of the Experimental Anallysis Behavior*. 51: 173-184.

Emilien, G., Maloteaux, J.M., Geurts, M., Hoogemberg, K. y Cragg, S. (1999). Dopamine receptors-physiological understanding to therapeutic intervention potencial. *Pharmacology Therapeutics*, 84:133-156.

Ettenberg, A. (1989). Dopamine, neuroleptics and reinforced behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 13: 105-111.

Falk, J. L. (1961). Production of polydipsia in normal rats by an intermittent food schedule. *Science*. 133: 195-196.

Falk, J.L. (1964). Studies on schedule-induced polydipsia. En: Wayner, M.L. (Ed.). *First International Symposium on thirst in the Regulation of body water*. (pp. 95-116). Pergamon Press. New York.

Falk, J.L. (1966b). Schedule-induced polydipsia as a function of fixed-interval length. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*. 9: 37-39.

Falk, J.L. (1967). Control of schedule-induced polydipsia: type, size and spacing of meals. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*. 10: 199-206.

Falk, J.L. (1969). Conditions producing psychogenic polydipsia in animals. *Annals of the New York Academy of Science*. 157: 569-593.

Falk, J.L. (1971). The Nature and determinants of adjunctive behavior. *Physiology and Behavior*. 6: 577-588.

Falk, J.L. y Tang, M. (1987). Development of physical dependence on midazolam by oral self-administration. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 26: 797-800.

Falk, J.L. y Tang, M. (1989). Schedule induction of drug intake: differential responsiveness to agents with abuse potential. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 249: 143-148.

Falk, J.L., Ma, F. y Lau, C.E. (1991). Chronic oral cocaine self-administration pharmacokinetics and effects on spontaneous and discriminative motor functions. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 257: 457-465.

Fallon, J.H. y Loughlin, S.E. (1982). Monoamine innervation of the forebrain: Collateralization. *Brain Research Bulletin*. 9: 295-307.

Feldman, R.S., Meyer, J.S. y Quenzer, L.F. (1997). *Principles of Neuropsychopharmacology*. Sinauer Associates, Sunderland, M.A.

Figueredo, H.F., Bruestle, A., Bodie, B., Dolgas, C.M. y Herman, J.P. (2003). The medial prefrontal cortex differentially regulates stress-induced c-fos expresión in the forebrain depending on type of stressor. *European Journal of Neuroscience*. 18: 2357-2364.

Flores, P. y Pellón, R. (1995). Rate-dependency hipótesis and the rate-decreasing effects of d-amphetamine on schedule-induced drinking. *Behavioural Pharmacology*. 6: 16-23.

Flores, P. y Pellón, R. (1997). Effects of d-amphetamine on temporal distributions of schedule-induced polydipsia. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 57: 81-87.

Flores, P. y Pellón, R. (1998). Effects of d-amphetamine, diazepam, and buspirone on schedule-induced polydipsia suppressed by response-dependent and response-independent shock. *Behavioural Pharmacology*. 9: 127-135.

Flores, P. y Pellón, R. (2000). Antipunishment effects of diazepam on two levels of suppression of schedule-induced drinking in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 67: 207-214.

Flores, P. y Pellón, R. (2001). Polidipsia inducida por programa: III. Mecanismos neuroendocrinos [Schedule-induced polydipsia: III.

Neuroendocrine mechanisms]. *Revista de Psicología General y Aplicada*. 54: 47-66.

Flory, R.K. (1971). The control of schedule-induced polydipsia: frequency and magnitude of reinforcement. *Learning and Motivation*. 2: 215-227.

Fowler, S.C. y Mortell, C. (1992). Low doses of haloperidol interfere with rat tongue extension during licking: a quantitative analysis. *Behavioural Neuroscience*. 106: 386-395.

Fraoli, S., Cioli, I., Nencini, P. (1997). Amphetamine reinstates polydipsia induced by chronic exposure to quinpirole, a dopaminergic D2 agonist, in rats. *Behavioural Brain Research*. 89: 199-215.

Freed, W.J., Zec, R.F. y Mendelson, J. (1977). "Schedule-induced polydipsia: The role of orolingual factors and the new hypothesis". En: Weigen, J.A. y Mendelson, J. (Eds.), *Drinking Behavior: Oral stimulation, reinforcement and preference*. New York: Plenum.

Freed, W.J. y Mendelson, J. (1979). Control of drinking-bout magnitude in schedule-induced polydipsia by interpellet-interval duration. *Animal Learning and Behavior*. 7: 489-492.

Fregly, M.J. y Rowland, N.E. (1988). Augmentation of isoproterenol-induced drinking by acute treatment with certain dopaminergic agonists. *Physiology and Behavior*. 44: 473-481.

Fuster, J.M. (2001). The prefrontal cortex an update: time is of the essence. *Neuron*. 30: 319-333.

Gardner, C.R, Budhram, P. (1991). Bidirectional efficacy at benzodiazepine receptors of a series of imidazopyrimidines illustrated in drug discrimination studies. *Drug Development Research*. 22: 339–347.

Gilbert, R.M. (1974). Ubiquity of schedule-induced polydipsia. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*. 21: 277-284.

Gilpin, N.W., Badia-Elder, N.E., Elder, R.L. y Stewart, R.B. (2008). Schedule-induced polydipsia in lines of rats selectively bred for high and low ethanol preference. *Behavior Genetics*. 38 :515–24.

Gingrich, J.A. y Caron, M.G. (1993). Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annual Review Neuroscience*. 16: 299-321.

Gleeson, S., Ahlers, S.T., Mansbach, R.S., Foust, J.M. y Barret, J.E. (1989). Behavioral studies with anxiolytic drugs. VI. Effects on punished responding of drugs interacting with serotonin receptor subtypes. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 250: 809-817.

Gollub, L. R. (1964). The relations among measures of performance on fixed interval schedules. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*. 7: 337-343.

Hawkins, T.D., Schrot, J.F., Githens, S.H. y Everett, P.B. (1972). "Schedule-induced polydipsia: an analysis of water and alcohol ingestion". En: Gilbert, R.M. y Keehn, J.D. (Eds), *Schedule Effects: Drugs, Drinking and Aggression* (pp. 95-128). Toronto: University of Toronto Press.

Heimer, L. Alheid, G.F. y Zahm, D.S. (1993). Basal forebrain organization: an anatomical framework for motor aspects of drive and motivation. En P.W. Kalivas and C.D. Barnes (Eds.). *Limbic Motor Circuits and Neuropsychiatry*. (pp.1-32). CRS Press, Boca Raton, FL.

Hogg, S., Dalvi, A. (2004). Acceleration of the onset of action in schedule-induced polydipsia: Combinations of SSRI and 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor antagonists. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 77: 69-75.

Hollerman, J.R. y Schultz, W. (1998). Dopamine neurons report and error in the temporal prediction of reward during learning. *Nature Neuroscience*. 1: 304-309.

Horger, B.A. y Roth, R.H. (1996). The role of mesoprefrontal dopamine neurons in stress. *Critical Reviews in Neurobiology*, 10: 395-418.

Houser, V.P. (1978). The effects of drugs on behavior controlled by aversive stimuli. En: Blackman DE, Sanger DJ, (Eds). *Contemporary Research in Behavioural pharmacology*. (pp. 69–75). New York: Plenum.

Hymowitz, N. (1981b). Effects of diazepam on schedule-controlled and schedule-induced behaviour under signaled and unsignaled shock. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*. 36: 119-132.

Jeffrey, D.R., Barrett, J.E. (1979). Effects of chlordiazepoxide on comparable rates of punished and unpunished responding. *Psychopharmacology*. 64: 9–11.

Jones, G.H., Hooks, M.S., Juncos, J.L. y Justice, J.B. Jr. (1994). Effects of cocaine microinjections into the nucleus accumbens and medial prefrontal cortex on schedule-induced behaviour: Comparison with systemic cocaine administration. *Psychopharmacology*. 115: 375–82.

Jones, G.H., Schneider, C., Schneider, H.H., Seidler, J., Cole, B.J. y Stephens, D.N. (1994). Comparison of several benzodiazepine receptor ligands in two models of anxiolytic activity in the mouse: an analysis based on fractional receptor occupancies. *Psychopharmacology*. 114: 191–199.

Kachanoff, R., Leveille, R., McLelland, J.P. y Wayner, M.J. (1973). Schedule-induced behavior in humans. *Physiology and Behavior*. 11: 395-398.

Kandel, E.R. (1991). Disorders of thought: schizophrenia. En: Kandel, E.R., Schwart, J.H. y Jessell, T.H. (Eds.), *Principles of neural science*. (pp. 853-868) Elsevier, New York.

Kalivas, P.W. y Duffy, P. (1993b). Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine II. Dopamine perikarya. *Journal of Neuroscience*. 13: 276-284.

Keehn, J.D., Coulson, G.E. y Klieb, J. (1976). Effects of haloperidol on schedule-induced polydipsia. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*. 25: 105-112.

Keehn, J.D. y Riusech, R. (1977). Schedule-induced water and saccharin polydipsia under haloperidol. *Bulletin of the Psychonomic Society* 9: 413-415.

Kelleher, R.T. y Morse, W.H. (1968). Determinants of the specificity of behavioural effects of drugs. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. 60: 1-56.

Killeen, P.R., Hanson, S.J. y Osborne, S.R. (1978). Arousal: its genesis and manifestations as response rate. *Psychological Review*. 85: 571-581.

Kleven, M.S., Koek, W. (1999). Effects of benzodiazepine agonists on punished responding in pigeons and their relationship with clinical doses in humans. *Psychopharmacology*. 141 :206–212.

Kovacs, K.J. (1988). C-Fos as a transcription factor: a stressful (re) view from a functional map. *Neurochemistry International*. 33: 287-297.

Kruk, Z.L. y Pycock, C.J. (1991). *Neurotransmitters and Drugs*. Chapman and Hall, New York.

Kulkosky, P.J., Moe, K.E., Woods S.C. y Riley, A.L. (1975). Effects of ventromedial hypothalamic lesions on schedule-induced polydipsia. *Physiological Psychology*. 3: 172-174.

Lamas, E. y Pellón, R. (1995). Food-delay duration and the development of schedule-induced polydipsia in rats. *Physiology and Behavior*, 57: 1221-1224.

Lang, W.J., Latiff, A.A., McQueen, A. y Singer, G. (1977). Self-administration of nicotine with and without a food delivery schedule. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 7: 65-70.

Lashley, R.L. y Rosellini, R.A. (1980). Modulation of schedule-induced polydipsia by Pavlovian conditioned states. *Physiology and Behavior*. 24: 411-414.

Law-Tho, D., Hirsch, J.C. y Crepel, F. (1994). Dopamine modulation of synaptic transmission in rats prefrontal cortex: an in vitro electrophysiological study. *Neuroscience Research*. 21: 151-160.

Le Foll, B., Gallo, A., Strat, Y.L., Lu, L. y Gorwood, P. (2009). Genetics of dopamine receptors and drug addiction: A comprehensive review. *Behavioural Pharmacology*. 20: 1-17.

Le Moal, M., y Simons, H. (1991). Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Psychological Review*. 71: 155-234.

Leander, J.D. y McMillan, D.E. (1975). Schedule-induced narcotic ingestion. *Pharmacology Review*. 27: 475-487.

Leander, J.D., McMillan, D.E. y Harris, L.S. (1975a). Effects of narcotic agonists and antagonist on schedule-induced water and morphine ingestion. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 195: 271-278.

Leander, J.D., McMillan, D.E. y Harris, L.S. (1975b). Schedule-induced oral narcotic self-administration: acute and chronic effects. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 195: 279-287.

Lelas, S., Rowlett, J.K. y Spealman, R.D. (2001). Isobolographic analysis of chlordiazepoxide and triazolam combinations in squirrel monkeys discriminating triazolam. *Psychopharmacology*. 158:181-189.

Leone, P. y Dichiaro, G. (1987). Blockade of D1 receptors by SCH23390 antagonized morphine and amphetamine-induced place preference conditioning. *European Journal of Pharmacology*. 135: 251-254.

Levine, R. y Levine, S. (1989). Role of the pituitary-adrenal hormones in the acquisition of schedule-induced polydipsia. *Behavioral Neuroscience*. 103: 621-637.

Lin, W., Singer, G. y Pappas, M. (1988). The role of adrenal corticosterone in schedule-induced wheelrunning. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 30: 101-106.

Lin, W., Singer, G. e Irby, D. (1990). Effect of hypophysectomy on schedule-induced wheelrunning. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 35: 739-742.

Lopez-Grancha, M., Lopez-Crespo, G., Venero, C., Cañadas, F., Sanchez-Santed, F., Sandi, C. y Flores, P. (2006). Differences in corticosterone level due to inter-food interval length: Implications for schedule-induced polydipsia. *Hormones and behavior* 49: 166–72.

Lopez-Grancha, M., Lopez-Crespo, G., Sanchez-Amate, MC. y Flores, P. (2008). Individual differences in schedule-induced polydipsia and the role of gabaergic and dopaminergic systems. *Psychopharmacology*. 197: 487–98.

Lu, C.C., Tseng, C.J., Wan, F.J., Yin, T.H. y Tung, C.S. (1992). Role of locus coeruleus and serotonergic drug actions on schedule-induced polydipsia. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 43: 255-261.

Lucas, L.R., Celen, Z., Tamashiro, K.L.K., Blanchard, R.J., Blanchard, D.C., Markham, C., Sakai, R.R. y McEwen, B.S. (2004). Repeated exposure to social stress has long-term effects on indirect markers of dopaminergic activiti in brain regions associated with motivated behavior. *Neuroscience*. 124: 449-457.

Mailman, R.B. (1983). Lithium induced polydipsia: dependence on nigrostriatal dopamine pathway and relationship to changes in the rennin-angiotensin system. *Psychopharmacology*. 80: 143-149.

Maricq, A. V. y Church, R. M. (1983). The differential effects of haloperidol and methamphetamine on time estimation in the rat. *Psychopharmacology*. 79: 10-15.

McKearney, J.W. (1973). Effects of methamphetamine and clordiazepoxide on schedule-controlled and adjunctive licking in the rat. *Psychopharmacology*. 30: 375-384.

McMillan, D.E. (1973). Drugs and punished responding: III. Punishment intensity as a determinant of drug effect. *Psychopharmacology*. 30: 61-74.

McMillan, D.E. y Leander, J.D. (1976). Schedule-induced oral self administration of etonitazene. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 4: 137-142.

McMillan, D.E. (1979). Effects of d-amphetamine and caffeine on schedule-controlled and schedule-induced responding. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*. 32: 445-456.

Meck, W. H. (1986). Affinity for the dopamine D2 receptor predicts neuroleptic potency in decreasing the speed of an internal clock. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 25: 1185-1189.

Meisch, R.A. (1969). Self-administration of pentobarbital by means of schedule-induced polydipsia. *Psychonomic Science*. 16: 16-17.

Meisch, R.A. y Stark, L.J. (1977). Establishment of etonitazene as a reinforcer for rats by use of schedule-induced drinking. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 7: 195-204.

Mendelson, J. y Chillag, D. (1970). Schedule-induced air licking in rats. *Physiology and Behavior*. 5: 535-537.

Miczek, K. A. y Yoshimura, H. (1982). Disruption of primate's social behaviour by *d*-amphetamine and cocaine: Differential antagonism by antipsychotics. *Psychopharmacology*. 76: 163-171.

Millan, M.J. (2003). The neurobiology and control of anxious states. *Progress in neurobiology*. 70: 83-244.

Miller, R., Wickens, J.R. y Beninger, R.J. (1990). Dopamine D1 y D2 receptors in relation to reward and performance: a case for the D1 receptors as a primary

site of therapeutic action of neuroleptic drugs. *Progress in neurobiology*. 34: 143-183.

Mittleman, G. y Valenstein, E.S. (1984). Ingestive behavior evoked by hypothalamic stimulation and schedule-induced polydipsia are related. *Science*. 224: 415-417.

Mittleman, G. y Valenstein, E.S. (1985). Individual differences in non-regulatory ingestive behavior and catecholamine systems. *Brain Research*. 348: 112-117.

Mittleman, G. y Valenstein, E.S. (1986). Unilateral substantia nigra lesions and schedule-induced polydipsia. *Physiology and Behavior*. 36: 437-440.

Mittleman, G., Castañeda, E., Robinson, T.E y Valenstein, E.S. (1986). The propensity for nonregulatory ingestive behavior is related to differences in dopamine systems: behavioral and biochemical evidence. *Behavioural Neuroscience*. 100: 408-412.

Mittleman, G., Jones, G.H., Robbins, T.W. (1988). Effects of diazepam, FG7142, and Ro 15-1788 on schedule-induced polydipsia and the temporal control of behavior. *Psychopharmacology*. 94:103-109.

Mittleman, G., Robbins T.W. y Jones, G.H. (1988). The relationship between schedule-induced polydipsia and pituitary-adrenal activity: pharmacological and behavioral manipulations. *Behavioral Brain Research*. 28: 315-324.

Mittleman, G., Whishaw, I.Q., Jones, G.H., Koch, M. y Robbins, T.W. (1990). Cortical, hippocampal and striatal mediation of schedule-induced behaviors. *Behavioural Neuroscience*. 104: 399-409.

Mittleman, G., Blaha, C.D. y Phillips, A.G. (1992). Pituitary-adrenal and dopaminergic modulation of schedule-induced polydipsia: behavioural and neurochemical evidence. *Behavioural Neuroscience*. 106: 408-420.

Mittleman, G., Rosner, A.I. y Schaub, C.L. (1994). Polydipsia and dopamine: behavioural effects of dopamine D1 and D2 receptors agonists and antagonists. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 271: 638-650.

Moore, K.E. (1978). Amphetamines: biochemical and behavioral actions in animals. En: Iversen, L.L., Iversen, S.D. y Zinder, S.H. (Eds.), *Handbook of psychopharmacology*, vol.11. (pp. 41-98). Raven Press, New York.

Morgan, J.I. y Curran, T. (1991). Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annual Review of Neuroscience*. 14: 421-451.

Myracle, A., Lopez-Grancha, M., Flores, P., Glosa, J. y Riley, AL. (2005). Differential effects of morphine and LiCl on schedule-induced polydipsia. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 80: 195–202.

Nader, K., Bechara y Vander Kooy, D. (1997). Neurobiological constraints on behavioral models of motivación. *Annual Review of Psychology*. 48: 85114.

Nielsen, E. B. y Jepsen, S. A. (1985). Antagonism of amphetamine cue by both classical and atypical antipsychotic drugs. *European Journal of Pharmacology*. 111: 167-176.

Nutt, D.J. (2005). Overview of diagnosis and drug treatments of anxiety disorders. *CNS Spectrums*. 10: 49–56.

Olds, J. (1956). Pleasure centers in the brain. *Scientific American*. 195: 105-116.

Olsen, G.M., Didriksen, M. y Christensen, A.V. (1992). Schedule-induced polydipsia (SIP): Readministration of clozapine, raclopride and SCH 23390 withdrawal period. *Behavioural Pharmacology*. 3, Suppl 1: 73-74.

Ongini, E. (1993). Role of D1 versus D2 receptors in the modulation of states of arousal and sleep. En J.L. Waddington (Ed.). *D1-D2 dopamine Receptors Interactions*. (pp. 175-201). Academic Press, London.

Pal, G.H., Bharathi, B. y Thombre, D.P. (1992). Modulation of daily water intake by dopamine in caudate and accumbens nuclei in rats. *Physiology and Behavior*. 51: 851-856.

Palya, W. L. (1993). Bipolar control in fixed interfood intervals. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*. 60: 345-359.

Pellón, R. y Blackman, D.E. (1987). Punishment of schedule-induced drinking in rats by signaled and unsigaled delays in food presentation. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*. 48: 417-434.

Pellón, R. y Blackman, D. E. (1992). Effects of drugs on the temporal distribution of schedule-induced polydipsia in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 43: 689-696.

Pellón, R. Mas, B. y Blackman, D.E. (1992). Effects of d-amphetamine and of diazepam on non-punished and punished schedule-induced drinking in rats. *Behavioural Pharmacology*. 3: 75-81.

Pellón, R. y Castilla, J.L. (2000). Punishment of Schedule-induced drinking by lick- dependent delays in food presented at different frequencies. *The Psychological Record*. 50:141-153.

Pellón, R., Flores, P. y Blackman, D.E. (1998). Influencias ambientales sobre la conducta inducida por programa. En: R. Ardila (Ed.). *Manual de Análisis Experimental del Comportamiento*. (pp. 309-331). Madrid, Biblioteca Nueva.

Pellón, R. y Flores, P. (2009). Psychopharmacology of adjunctive behavior. En Bernalov A.Y, Zvartau, E.E, Beardsley P.M. y Katz J.L, (Eds). *Behavioral pharmacology*. St. Petersburg: Pavlov Medical University Press (en prensa).

Pennartz, C.M., Groenewegen, H.L. y Lopes da Silva, F.H. (1994). The nucleus accumbens as a complex of functionally distinct neuronal ensembles: an integration of behavioural, electrophysiological and anatomical data. *Progress in neurobiology* 42: 719-61.

Pierce, R.C. y Kalivas, P.W. (1977b). Repeated cocaine modifies the mechanism by which amphetamine releases dopamine. *Journal of Neuroscience*. 17: 3254-3261.

Pierce, R.C. y Kumaresan, V. (2006). The mesolimbic dopamine system: The final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 36: 229-240.

Platt, B., Beyer, C.E. (2008). Schechter LE, Rosenzweig-Lipson S. Schedule-induced polydipsia: A rat model of obsessive-compulsive disorder. *Current Protocols in Neuroscience*. 9. 27: 1-7.

Porter, J. H., Goldsmith, P. A., McDonough, J. J., Heath, G. F. y Johnson, D. N. (1984). Differential effects of dopamine blockers on the acquisition of schedule-induced drinking and deprivation-induced drinking. *Physiological Psychology*. 12: 302-306.

Ranaldi, R. y Beninger, R. J, (1993). Dopamine D1 and D2 antagonists attenuate amphetamine-produced enhancement of responding for conditioned reward in rats. *Psychopharmacology*. 113: 110-118.

Reberg, D. (1980). Reinforcing the occurrence or nonoccurrence of interim drinking. *Animal Learning and Behavior*. 8: 120-128.

Redgrave, P., Prescott, T.J. y Gurney, K. (1999). Is the short-latency dopamine response too short to signal reward error? *Trends in Neurosciences*. 22: 146-151.

Riley, A.L. y Wetherington, C.L. (1989). Schedule-induced polydipsia: is the rat a small furry human? (An analysis of animal model of human alcoholism). En Klein, S.B. y Mowrer, R.R. (Eds.). *Contemporary learning theories. Instrumental conditioning theory and the impact of biological constraints on learning*. (p.p. 205-236). Lawrence Erlbaum Associates, Publishers, Hillsdale, New Jersey.

Robbins, T.W. y Koob, G.F. (1980). Selective disruption of displacement behavior by lesions of the mesolimbic dopamine system. *Nature*. 285: 409-412.

Robbins, T W., Roberts, D. C. S. y Koob, G. F. (1983). Effects of *d*-amphetamine and apomorphine upon operant behavior and schedule-induced licking in rats with 6-hydroxydopamine-induced lesions of the nucleus accumbens. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 224: 662-673.

Robbins, T.W., Mittleman, G., O'Brien, J. y Winn, P. (1990). The neuropsychological significance of stereotypy induced by stimulant drugs. En S. J. Cooper and C. T. Dourish (Eds.), *Neurobiology of stereotyped behaviour* (pp. 25-63). Oxford: Oxford University Press.

Rosenzweig-Lipson, S., Sabb, A., Snack, G., Mitchell, P., Lucki, I., Malberg, J.E., Grauer, S., Brennan, J., Cryan, J.F., Sukoff Rizzo, S.J., Dunlop, J., Barrett, J.E. y Marquis, K.L. (2007). Antidepressant-like effects of the novel, selective, 5-HT_{2C} receptor agonist WAY-163909. *Psychopharmacology*. 192: 159-70.

Rowlett, J.K., Lelas, S., Tornatzk, W. y Licata, S.C. (2006). Anti-conflict effects of benzodiazepines in rhesus monkeys: relationship with therapeutic doses in humans and role of GABA A receptors. *Psychopharmacology*. 184: 201–211.

Rudolph, U., Crestani, F. y Mohler, H. (2000). GABA A receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. *Trends in Pharmacological Sciences*. 22: 188–194.

Ryabinin, A.E., Melia, K.R., Cole, M., Bloom, F.E. y Wilson, M.C. (1995). Alcohol selective attenuates stress-induced c-fos expression in rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience*. 15 (1): 721-730.

Sagar, S.M., Sharp, F.R y Curran, T. (1988). Expresión of c-fos protein in brain: Metabolic mapping at the cellular level. *Science* (Wash. D.C.). 240: 1328-1331.

Salomone, J.D., Cousins, M.S. y Snyder, B.J. (1997). Behavioral functions of nucleus accumbens dopamine: empirical and conceptual problems with the anhedonia hypothesis. *Neurosciences and Biobehavioral Reviews*. 21: 341-359.

Samyay, Z., McKittrick, C.R., McEwen, B.S. y Kreek, M.J. (1998). Selective regulation of dopamine transporter binding in the shell of the nucleus accumbens by adrenalectomy and corticoeterone- replacement . *Synapse*. 30: 334-337.

Sanger, D.J. (1977a). Schedule-induced drinking of chlordiazepoxide solutions by rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 7: 1-6.

Sanger, D.J. (1977b). *D*-amphetamine and adjunctive drinking in rats. *Psychopharmacology*. 54: 273-276.

Sanger, D.J. (1978b). The effects of d-amphetamine and scopolamine on drinking induced by a multiple schedule. *Psychopharmacology*. 58: 311-315.

Sanger, D.J. (1986a). Drug taking as adjunctive behavior. En: Golberg, S.R. y Stolerman, I.P. (Eds.), *Behavioral analysis of drug dependence*. (p.p 123-160). Academic Press, New York.

Sanger, D.J. y Blackman, D.E. (1976). Effects of diazepam and ripazepam on two measures of adjunctive drinking in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 5: 139–142.

Sanger, D. J. y Blackman D. E. (1978). The effects of drugs on adjunctive behavior. En D. E. Blackman and D. J. Sanger (Eds.), *Contemporary research in behavioral pharmacology* (pp. 239-287). New York: Plenum Press.

Sanger, D.J. y Blackman, D.E. (1989). Operant behavior and the effects of centrally acting drugs. En Boulton, A.A., Baker, G.B. y Greenshaw, A.J. (Eds.), *Neuromethods: Vol. 13. Psychopharmacology*. (pp. 299-348). Humana Press, Clifton, N.J.

Schechter, L.E., Lin, Q., Smith, D.L., Zhang, G., Shan, Q., Platt, B., Brandt, M.R., Dawson, L.A., Cole, D., Bernotas, R., Robichaud, A., Rosenzweig-Lipson, S. y Beyer, C.E. (2007). Neuropharmacological profile of novel and selective 5-HT₆ receptor agonists: WAY-181187 and WAY-208466. *Neuropsychopharmacology*. (2008). 33(6): 1323-1335. Published online 11 July 2007.

Segal, E.F. y Holloway, S.H. (1963). Timing behavior in rats with water drinking as a mediator. *Science*. 140: 888-889.

Segal, E.F., Oden, D.L. y Deadwyler, S.A. (1965a). Determinants of polydipsia: Free reinforcement schedules. *Psychonomic Science*. 3:11-12.

Seligman, M.E.P. (1978). Depression and learned helplessness. En Van Praag, H. (Ed.), *Research in neurosis*. (pp. 73-107). Spectrum Press, New York.

Shanab, M.E. y Peterson, J.L. (1969). Polydipsia in the pigeon. *Psychonomic Science*. 15: 51-52.

Sibley, D.R., Monsma, F.J. Jr. y Shen, Y. (1993). Molecular neurobiology of dopaminergic receptors. *International Review of Neurobiology*. 35: 391-415.

Smith, J.B. y Clark, F.C. (1975). Effects of d-amphetamine, chlorpromazine, and chlordiazepoxide on intercurrent behavior during spaced-responding schedules. *Journal of the Experimental Analysis Behavior*. 24: 241-248.

Smith, A. D., Smith, D. L, Zigmond, M, J., Amalric, M. y Koob, G. F. (2000). Differential effects of dopamine receptor subtype blockade on performance of rats in a reaction-time paradigm. *Psychopharmacology*. 148: 355-360.

Snodgrass, S.H. y Allen, J.D. (1987). Effect of dopamine agents on schedule- and deprivation-induced drinking in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 27: 463-475.

Snodgrass, S.H., Allen, J.D. (1988). The effects of apomorphine on the acquisition of schedule-induced polydipsia in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 29: 483-8.

Snodgrass, S.H. y Allen, J.D. (1989). Time-response effects of pimozide on operant behavior and schedule-induced polydipsia. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 43: 949-955.

Spanagel, R., Herz, A. y Shippenberg, T.S. (1992). Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 89: 2046-2050.

Spencer, S.J., Ebner, K. y Day, T.A. (2004). Differential involvement of rat medial prefrontal cortex dopamine receptors in modulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to different stressors. *European Journal of Neuroscience*. 20:1008-1016.

Staddon, J.E.R. y Simmelhag, V.L. (1971). The superstitious experiment: a reexamination of its implications for the principles of adaptive behavior. *Psychological Review*. 78: 3-43.

Staddon, J. E. R. (1977). Schedule-induced behavior. En W. K. Honig and J. E. R. Staddon (Eds), *Handbook of operant behavior* (pp. 125-152). Englewood Cliffs, NJ; Prentice-Hall.

Stahl, S.M. (1998). Ansiolíticos y sedantes-hipnóticos. *Essential Psychopharmacology Neuroscientific Basis and Clinical Applications*. (pp. 189-242). Cambridge University Press.

Stein, L. (1964). Excessive drinking in the rat: superstition or thirst?. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 58: 237-242.

Stoof, J.C. y Keabian, J.W. (1984). Two dopamine receptors: Biochemistry, physiology and pharmacology. *Life Science*. 35: 2281-2296.

Stricker, E.M. y Adair, E.R. (1966). Body fluid balance, taste and post-prandial factors in schedule-induced polydipsia. *Journal of comparative and Physiological Psychology*. 62: 449-454.

Tabakoff, B. y Hoffman, P.L. (2000). Animal models in alcohol research. *Alcohol Research and Health: The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*. 24: 77-84.

Taghzouti, K., Simon, H., Tazi, A., Dantzer, R. y Le Moal, M. (1985). The effect of 6-OHDA lesions of the lateral septum on schedule-induced polydipsia. *Behavioural Brain Research*. 15: 1-8.

Tang, M. y Falk, J.L. (1987). Oral self-administration of cocaine: chronic excessive intake by schedule induction. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 28: 517-519.

Tang, M., Ahrendsen, K. y Falk, J.L. (1981). Barbiturate dependence and drug preference. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 14: 405-408.

Tazy, A., Dantzer, R., Mormede, P y Le Moal, M. (1986). Pituitary-adrenal correlates of schedule-induced polydipsia and wheel running in rats. *Behavioural Brain Research*. 19: 249-256.

Tazi, A., Dantzer, R. y Le Moal, M. (1988). Schedule-induced polydipsia experience decreases locomotor response to amphetamine. *Behavioural Brain Research*. 445: 211-215.

Tinsley, M. R., Rebec, G. V. y Timberlake, W. (2000). Facilitation of preparatory behavior in an artificial prey paradigm by DI-subfamily dopamine receptor activation. *Behavioural Brain Research*. 114: 23-30.

Todd, K., Beck, C.H.M. y Martin-Iverson, M.T. (1992). Effects of D1 and D2 dopamine antagonists on behavior of polydipsic rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 42: 381-388.

Tschanz, J. T. y Rebec, G. V. (1988). Atypical antipsychotic drugs block selective components of amphetamine-induced stereotypy. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 29: 385-392.

Tully, W.R., Gardner, C.R. y Westwood, R. (1991). General approach leading to the development of imidazoquiline and imidazopyrimidine benzodiazepine receptor ligands. *Drug Development Research*. 22:299-308.

Van Eden, C.G. y Buijs, R.M. (2000). Functional neuroanatomy of the prefrontal cortex : autonomic interactions. *Progress in Brain Research*. 126: 49-62.

Villarreal, J. (1967). Schedule-induced pica. Ponencia presentada en la *Eastern Psychological Association*, Boston, MA.

Wallace, M., Singer, G., Finlay, J. y Gibson, S. (1983). The effect of 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septum on schedule-induced drinking, wheelrunning and corticosterone levels in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 18: 129-136.

Wayner, M.J. (1970). Motor control functions of the lateral hypothalamus and adjunctive behavior. *Physiology and Behavior*. 5: 1319-1325.

Wayner, M.J. y Greenberg, I. (1972). Effects of septal lesions on palatability modulation of schedule-induced polydipsia. *Physiology and Behavior*. 9: 663-665.

Wayner, M.J., Greenberg, I. y Trowbridge, J. (1973). Effects of *d*-amphetamine on schedule induced polydipsia. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 1: 109-111.

Wayner, M.J., Greenberg, I. y Trowbridge, J. (1973). Effects of *d*-amphetamine on schedule induced polydipsia. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 1: 109-111.

Wayner, MJ. (2002). Craving for alcohol in the rat: Adjunctive behavior and the lateral hypothalamus. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 73:27-43.

Weisenborn, R., Blaha, C. D., Winn, P. y Phillips, A. G. (1996). Schedule-induced polydipsia and the nucleus accumbens: Electrochemical measurements of dopamine efflux and effects of excitotoxic lesions in the core. *Behavioural Brain Research*. 75: 147-158.

Westenbroek, C., Ter Horst, G.J., Roos, M.H., Kuipers, S.D., Trentani, A. y Den Boer, J.A. (2003). Gender-specific effects of social housing in rats after chronic mild stress exposure. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*. 27: 21-30.

Wetherington, C.L. (1982). Is an adjunctive behavior a third class of behavior? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 6: 329-350.

Wickens, H. (1990). Striatal dopamine in motor activation and reward mediated learning: steps towards a unifying model. *Journal of Neural Transmission. General Section*. 80: 9-31.

Williams, J.L. y White, J.M. (1984). The effects of amphetamine and scopolamine on adjunctive drinking and wheel-running in rats. *Psychopharmacology*. 82: 360-367.

Wise, R.A. (1982). Neuroleptics and operant behavior: the anhedonia hypothesis. *Behavioural and Brain Science*. 5: 39-87.

Wise, R.A. (2002). Brain reward circuitry: Insights from unsensed incentives. *Neuron*. 36: 229-240.

Witkin, J.M., Acri, J.B., Gleeson, S. y Barrett, J.E. (1997). Blockade of behavioral effects of bretazenil by flumazenil and ZK 93426 in pigeons. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 56: 1-7.

Woods-Kettemberg, A.T., Smith, C.P., Szewczak, M.R., Dunn, R.W., Cornfeldt, P. y Corbett, R. (1993). Selective serotonin reuptake inhibitors decrease schedule-induced polydipsia in rats: a potential model for obsessive compulsive disorder. *Psychopharmacology*. 112: 195-198.

Woods, A.T., Smith, C.P., Corbett, R., Szewczak, M.R., Roehr, J.E., Bores, G.M., Klein, J.T. y Kongsamut, S. (1996-1997). Besipirdine (HP 749) reduces schedule-induced polydipsia in rats. *Brain Research Bulletin*. 41: 125-30.

Wright, C.I., Beijer, V.J. y Groenewegen, H.J. (1996). Basal amygdaloid complex afferents to the rat nucleus accumbens are compartmentally organized. *Journal of Neuroscience*. 16: 1877-1893.

Wuttke, W. y Innis, N.K. (1972). Drug effects upon behavior induced by second order schedules of reinforcement: the relevance of ethological analyses. En: Gilbert, R.M. y Keehn, J.D. (Eds.), *Schedule effects: drugs, drinking and aggression*. (pp. 129-147). University of Toronto Press, Toronto.