



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación

Trabajo Fin de Grado

Implicación de la Corteza insular en la evocación de las preferencias gustativas condicionadas.

Alumna: Ana Fontalba Sayago

Tutor: Antonio David Rodríguez Agüera
Dpto.: Psicobiología

Junio, 2021

ÍNDICE:

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	1
1. Introducción	2
2. Método y procedimiento	4
2.1 Sujetos	4
2.2 Procedimiento quirúrgico	4
2.2.1. Implantación de dos catéteres intragástrico	4
2.2.2. Implantación de dos cánulas intracerebrales.....	5
2.3 Procedimiento comportamental	6
2.4 Histología.....	7
2.5 Análisis estadístico	8
3. Resultados.....	9
4. Discusión.....	11
Referencias Bibliográficas	12

RESUMEN:

Se llevó a cabo un estudio del papel de la corteza insular (CI) en las preferencias del sabor pareado con consecuencias apetitivas viscerales por administración intragástrica de glucosa. Se llevaron a cabo por un procedimiento de aprendizaje de tipo concurrente, donde se presentaron dos estímulos con diferente sabor al mismo tiempo y mientras uno de los estímulos se emparejo con glucosa, el otro con suero fisiológico. El objetivo de este estudio fue investigar la participación de la CI como la responsable para evocar la adquisición de un aprendizaje apetitivo gustativo (AApG). Los resultados mostraron que la inactivación de la CI limita la evocación del AApG adquirido y como la glucosa produce los mismos efectos recompensantes que la droga, por tanto, un posible tratamiento para la drogadicción podría ser la inactivación de la CI.

Palabras claves: Aprendizaje apetitivo-gustativo (AApG), Corteza insular (CI), Drogadicción.

ABSTRACT:

A study of the role of the insular cortex (IC) in paired taste preferences with visceral appetitive consequences by intragastric glucose administration was carried out. They were carried out by a concurrent learning procedure, where two stimuli with different taste were presented at the same time and while one of the stimuli was paired with glucose, the other with physiological saline. The objective of this study was to investigate the participation of IC as responsible for evoking the acquisition of taste appetitive learning (AApG). The results showed that IC inactivation limits the evocation of acquired AApG and that glucose produces the same rewarding effects as the drug, therefore, a possible treatment for drug addiction could be the inactivation of IC.

Keywords: Appetitive-taste learning (AApG), Insular cortex (IC), Drug addiction.

1. Introducción

La drogadicción podría definirse como un trastorno caracterizado por la búsqueda y toma compulsiva de una sustancia, la pérdida de control y la presencia de un estado emocional negativo en ausencia o limitación de ésta (Koob y Volkow, 2016). Además, los sujetos en periodos de desintoxicación muestran recaídas crónicas, debidas a los efectos gratificantes que produce el consumo de la droga, lo que lleva a seguir consumiéndola cuando aparecen esas señales asociadas a la misma (Koob y Volkow, 2016; Namba *et al.*, 2018). Así, uno de los factores claves en el mantenimiento de la drogadicción es la experiencia subjetiva de deseo irrefrenable por el consumo de la droga (*craving*), lo que produce el impulso consumatorio (búsqueda de la droga) para reducirlo (Beck *et al.*, 1999).

Según la fundación de la organización Alcohólicos Anónimos (1930) existen tres posibles desencadenantes del *craving*, a saber, la propia exposición a la droga, el estrés y la exposición a las señales ambientales asociadas con el consumo de ésta, todo lo cual aumentaría la probabilidad de la recaída en aquellos sujetos que se encuentran en un periodo de desintoxicación de la droga (Gardner, 2011; Martin-Fardon y Weiss, 2017).

Por otro lado, el *craving* ayuda a explicar el deseo de la persona por la sustancia y el consumo de la misma ante situaciones en las que provocan estados emocionales negativo (Koob y Volkow, 2016), estados que parecen estar implicados en la activación de circuitos cerebrales implicados en la adicción y asociados con la droga, mayor activación de la corteza prefrontal, la ínsula y la corteza cingulada anterior (Kober *et al.*, 2015).

Con respecto al sustrato neurobiológico subyacente a la drogadicción, las neuroadaptaciones inducidas por el consumo crónico de las drogas en el sistema de recompensa cerebral dopaminérgico mesolímbico parecen ser las responsables de los síntomas de la drogadicción, considerándose a la corteza insular (CI) como uno de los componentes relevantes en el procesamiento del *craving* inducido por las drogas (Naqvi *et al.*, 2014). En este sentido, se ha observado que en humanos tanto los estímulos asociados a la droga, así como el *craving* inducido por dichos estímulos activan la CI (Wang *et al.*, 1999; Bonson *et al.*, 2002; Moran *et al.*, 2017) Además, la lesión de la CI producida por un accidente cerebrovascular isquémico agudo bloquea el *craving* inducido por las drogas (Naqvi *et al.*, 2007; Abdolahi *et al.*, 2017), lo que prevendría las posibles recaídas tras la abstinencia de la droga (Volkow *et al.*, 2019).

La CI es una estructura cerebral que se localiza en la profundidad de la cisura de Silvio, en el punto donde confluyen los lóbulos temporal, parietal y frontal (Türe *et al.*, 1999), siendo

la zona cortical donde converge la información intero- y exteroceptiva (Craig, 2007), claves sensoriales relevantes en las asociaciones responsables del *craving* inducido por los estímulos condicionados a las propiedades recompensantes de las drogas (Naqvi y Bechara, 2009; Paulus y Stewart, 2014; Dionisio *et al.*, 2019). Por lo tanto, dada la implicación de la información interoceptiva en la drogadicción (Craig, 2002; Paulus y Stewart, 2014) y que dicha señal sensorial puede ser asociada con la información exteroceptiva (Contreras *et al.*, 2008), la CI podría ser uno de los sustratos neuroanatómicos donde se localizaría el engrama de la asociación intero-exteroceptiva implicado en el *craving* inducido por los estímulos condicionados a las drogas (Contreras *et al.*, 2008, 2012). Además, según Contreras (2008) el deseo por el consumo de la droga se puede desencadenar por el lugar donde se habituaba a obtenerla o consumirla. Y son numerosos estudios los que demuestran que la CI juega un papel importante en el deseo compulsivo por el consumo de la droga y, por tanto, la posibilidad de que la inactivación de la misma bloquee el recuerdo del lugar asociado a la droga.

Por otra parte, dado que la CI también es la zona cortical donde se produce la integración de la información visceral y gustativa (Duque *et al.*, 2004; Rosenblum, 2008; Palma y Iriarte, 2012; Lin *et al.*, 2015), se podría especular con la idea de que la inactivación de la CI también podría impedir la adquisición y la memoria de un modelo de aprendizaje apetitivo gustativo (AApG), donde el sujeto establece una asociación entre un estímulo condicionado gustativo (EC; p.ej. extracto de fresa o coco) y un estímulo incondicionado con propiedades recompensantes viscerales (EI; p.ej. administración intragástrica de glucosa), llegando a preferir dicho EC en base a la asociación establecida (Zafra *et al.*, 2002). De hecho, existen estudios llevados a cabo con dicho modelo gustativo que muestran que la lesión de varios componentes del sistema cerebral que procesa la información viscerogustativa (p.ej. nervio vago, núcleo del trato solitario, parabraquial lateral externo...) bloquea la adquisición del AApG (p.ej. Zafra *et al.*, 2002, 2017). Por lo tanto, dado que este sistema proyecta hacia la CI (García *et al.*, 2013), su lesión/inactivación podría también impedir la evocación de la preferencia gustativa condicionada.

En base a la literatura revisada en este apartado, el objetivo de la presente investigación sería contrastar la hipótesis de que la CI es la estructura cerebral responsable de la expresión/evocación de la adquisición de un AApG. Los resultados serán discutidos en relación con el engrama de memoria responsable del *craving* inducido por los estímulos asociados a las propiedades recompensantes de las drogas para intentar proponer un posible tratamiento

preventivo para las recaídas sufridas por las personas que están bajo un programa de desintoxicación.

2. Método y procedimiento

2.1 Sujetos

En el presente estudio se usaron 20 ratas machos de la cepa Wistar obtenidas de la colonia de crías de la Universidad de Jaén con un peso de entre 280-310g al comienzo del experimento. Los animales fueron asignados aleatoriamente a uno de los dos grupos: 10 animales en el grupo inactivación de la CI (Grupo Experimental) y los otros 10 animales en el grupo control. Los sujetos se alojaron individualmente en jaulas de metacrilato de 30 x 15 x 30 cm, donde tenían acceso a agua y comida en un periodo de adaptación de 3 días. Además, se mantuvieron en periodos de luz-oscuridad de 12h cada uno, aunque todas las sesiones experimentales se realizaron durante la fase de luz, mantenidos a una temperatura ambiente de 21-23°. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo siguiendo las pautas de cuidado animal establecidas por la Directiva del Consejo de la Comunidad Europea (86/609/CEE) y la legislación española (Real Ley 1201/2005), con el objetivo de hacer todo lo posible por minimizar el sufrimiento animal y el número de animales utilizados (Zafra et al., 2002, 2017).

2.2 Procedimiento quirúrgico

2.2.1. Implantación de dos catéteres intragástrico.

Se implantaron dos catéteres intragástricos siguiendo un procedimiento previamente reportado (Zafra *et al.*, 2017), a través de los cuales se administrarán los estímulos incondicionados para inducir la preferencia gustativa (glucosa o suero fisiológico). Con este objetivo, bajo anestesia general con pentotal sódico administrado intraperitonealmente (50 mg/Kg; Tiopental sódico, ABBOTT Laboratories, Madrid), se extrajo el estómago con sumo cuidado después de realizar la laparotomía y se hizo una incisión de unos 2 cm en la región de la curvatura mayor de los cardias donde se insertó un tubo de *silastic* con una pequeña protuberancia de silicona alrededor para evitar el desplazamiento del catéter hacia fuera del estómago. Este mismo procedimiento se repitió para implantar el segundo catéter. Los órganos externos se irrigaron continuamente con suero fisiológico isotónico con el objetivo de que permanecieran constantemente hidratados. Posteriormente, el estómago se devolvió a la cavidad gástrica en su posición original y los catéteres se llevaron a través del abdomen por la

pared muscular siendo tunelizados subcutáneamente cada uno a uno de los lados del animal hasta la superficie dorsal del cuello. Finalmente, se cosieron las heridas y se taparon los catéteres con tamponcillos de hierro inoxidable en la punta para evitar fugas del contenido gástrico y el desplazamiento dentro del túnel subcutáneo. Para evitar la posible infección, se aplicó povidona yodada (Betadine, Sarget Lab, Merignac, Francia) y se administró por vía intramuscular 0,1 cc de penicilina (Penilevel, Lab. Erm, Barcelona, España). Se realizó el mismo procedimiento para ambos grupos de animales (Zafra *et al.*, 2017).

2.2.2. Implantación de dos cánulas intracerebrales.

Para la implantación de las dos cánulas intracerebrales a través de las cuales se administrará el anestésico local lidocaína para la inactivación de la CI en el Grupo Experimental (y administración de suero fisiológico en el Grupo Control) se llevará a cabo una cirugía estereotáxica (Stoelting Stereotaxic 51.600) bajo anestesia general con pentotal sódico administrado intraperitonealmente (50 mg/Kg; Tiopental sódico, ABBOTT Laboratories, Madrid). Las coordenadas neuroanatómicas utilizadas para la implantación de las cánulas en la superficie dorsal de la CI fueron obtenidas a partir del atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1996) utilizando como referencia el punto de Bregma: AP= 1.2 mm; DV=6.7 mm; LM=5.4 mm.

Para llevar a cabo la intervención quirúrgica de la implantación de las dos cánulas intracerebrales se siguió el procedimiento propuesto por Xavier y colaboradores (2018):

1. Anestesiarse el animal con pentotal sódico administrado intraperitonealmente (50 mg/Kg; Tiopental sódico, ABBOTT Laboratories, Madrid).
2. Comprobar que el animal está totalmente dormido pellizcándole los dedos de los pies.
3. Colocar la rata sobre la almohadilla térmica y fijarla en el marco estereotáxico.
4. Afeitar la cabeza, desde los ojos hasta detrás de las orejas.
5. Inyectar lidocaína debajo del cuero cabelludo para que haga función de analgesia local.
6. Proteger los ojos del animal de la luz.
7. Hacer una incisión desde la parte más anterior a la más posterior, es decir, desde los ojos hasta la parte más trasera del cráneo.
8. Raspar la parte superior del cráneo y limpiar con un algodón con agua destilada.

9. Marcar bregma y calcular las coordenadas de la ínsula donde se va a implementar las cánulas.

Más aún, según dichos autores, para la inserción de las cánulas deben llevarse a cabo los siguientes pasos:

1. Retirar cada cánula de la jeringa que teníamos llena de aCSF (líquido cefalorraquídeo artificial), mientras se mantiene la aguja 30G que está en el extremo posterior del tubo.
2. Se conecta dicha aguja con una jeringa llena de agua destilada.
3. Se extrae el aire que pueda estar insertado en cada cánula, con la ayuda de una bomba de jeringa.
4. Tras perforar el cráneo se implantan las cánulas en las coordenadas calculadas para la CI.
5. Posteriormente se fijan las cánulas echando cemento dental y se pasa a coser la incisión hecha anteriormente.
6. Por último, se deja el animal en su jaula tras inyectarle un anti-inflamatorio y se les permiten varios días para su recuperación. (Xavier *et al.*, 2018; Sebastián, 2016).

2.3 Procedimiento comportamental

Después de 9 días de recuperación de la cirugía, los sujetos se sometieron a un pre-entrenamiento de 3 días con restricciones de agua y comida. Donde a los animales se les permitió beber agua de dos buretas que se les presentan por los orificios frontales de las jaulas con el objetivo de evitar posibles preferencias por la posición de las buretas. Los dos primeros días, se les ofreció agua en una sola bureta (Día 1 a la izquierda y Día 2 a la derecha) durante 7 minutos, mientras que el tercer día, también durante 7 minutos, se les ofreció las 2 buretas simultáneamente. Si el tercer día de pre-entrenamiento algún animal tiende a beber de una sola bureta, se retirará dicha bureta durante los últimos 3 minutos de cada sesión, para así poder controlar que todos los animales hayan aprendido a alternar entre ambas buretas. Pasados 30 minutos después de estas sesiones de 7 minutos se les ofreció a los animales 15g de alimento sólido (Panlab S.L., Barcelona, España).

Después de este periodo de pre-entrenamiento, comenzó la fase experimental propiamente dicha en la que durante 5 días adquisitivos se asociará un estímulo gustativo [0,5% de extracto de fresa (F) o coco (C) diluido en el agua; McCormick, Co. Inc., San Francisco,

CA, USA] con unas consecuencias apetitivas viscerales a través de la icadministración intragástrica de glucosa (10%). En cada sesión adquisitiva, se le ofreció a los animales ambos estímulos gustativos presentados simultáneamente durante 7 minutos donde la ingestión de uno de ellos será asociada con la administración intragástrica concurrente de glucosa a través de uno de los catéteres, mientras que la ingestión del otro estímulo gustativo se emparejó con la administración intragástrica concurrente de suero fisiológico a través del otro catéter (una ilustración gráfica de este procedimiento fue previamente publicada por Mediavilla *et al.* 2005). Se contrabalanceó el estímulo gustativo asociado con glucosa para eliminar posibles efectos inespecíficos de preferencia por alguno de los 2 sabores. La administración intragástrica de ambos productos (glucosa o suero fisiológico) se produjo simultáneamente a la ingestión del estímulo gustativo a través de una bomba de infusión Mod. A-98 (Razel, USA) a una razón de 1mL/1mL por estímulo gustativo ingerido. El 6º día del presente procedimiento experimental, en el grupo experimental, se les vuelve a presentar ambos sabores, pero esta vez sin administración intragástrica alguna, donde al grupo experimental se le inactivó la CI administrando Lidocaína (10 µl/seg) a través de las cánulas intracerebrales, mientras que en el grupo control se administró suero fisiológico a la misma dosis. El 7º día que se volvió a presentar ambos sabores, pero esta vez sin administración intragástrica ni intracerebral alguna.

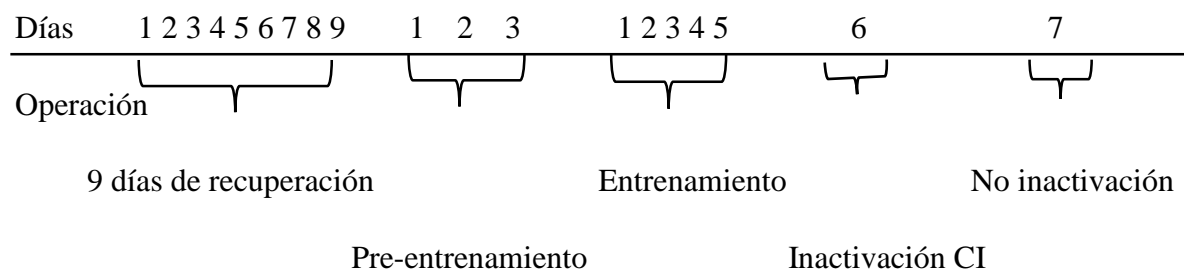


Fig. 1. Secuencia experimental.

2.4 Histología

Al concluir el experimento, todos los animales del grupo experimental fueron anestesiados profundamente con una sobredosis de pentotal sódico (80 mg/Kg, ABBOTT, Madrid) y perfundidos intracardialmente con solución una salina isotónica seguida de formaldehído (10%). Posteriormente, se procedió a la extracción de los cerebros que fueron

almacenados durante al menos 1 semana en formaldehído (10%) antes de su posterior laminación en secciones coronales de 40µm mediante un criostato (Leica, CM1850 UV, USA). Las secciones fueron colocadas en portaobjetos y teñidas con violeta de cresilo para ser examinadas a través de un microscopio óptico (Olympus, CO 11) con el objetivo de determinar la ubicación y la extensión de las intervenciones, y así tener la certeza de que las cánulas intracerebrales estaban localizadas en la CI en todos los casos (Zafra *et al.*, 2017) (Figura 1).

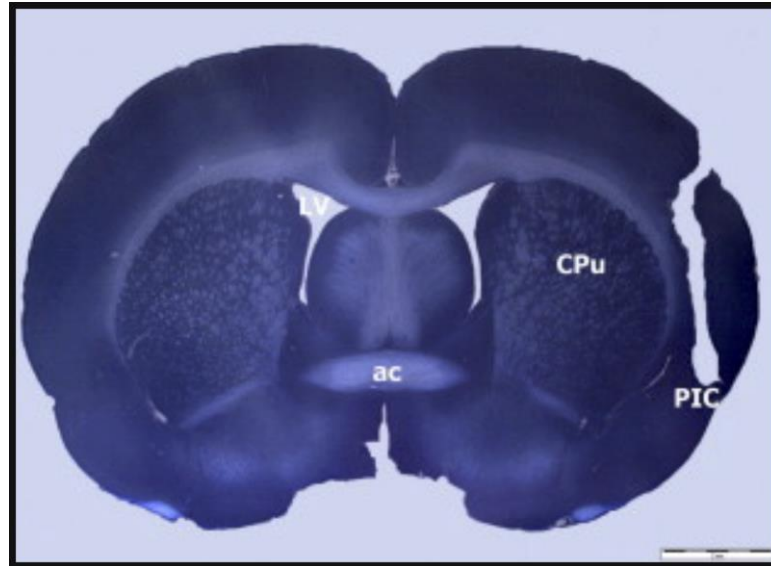


Fig. 2. Imagen de una sección coronal del cerebro de un animal del Grupo Experimental, mostrando la localización de la cánula intracerebral. *Abreviaciones:* ac: comisura anterior; PIC: Corteza Insular Posterior; PuC: Núcleo Putamen-Caudado; LV: Ventrículo Lateral.

2.5 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico del presente experimento se ha usado la versión 23 del programa estadístico IBM SPSS Statistic Subscription. La media de ingesta de agua durante los 3 días de pre-entrenamiento y la media de la ingesta de los sabores durante los 7 días experimentales fueron analizados mediante un ANOVA (Grupo x Días x Agua y Grupo x Días x Sabores, respectivamente). Los valores fueron expresados como medias \pm el error estándar de medida. Los efectos significativos fueron analizados mediante un análisis *pos hoc* a través de un test de Tuckey y las diferencias estadísticamente significativas se fijó en el nivel del 5% ($p < 0.5$), (Zafra *et al.*, 2002).

3. Resultados

El ANOVA llevado a cabo en la **Etapa I (pre-entrenamiento de 3 días)** no mostró diferencias entre los animales del grupo experimental y grupo control con respecto a la cantidad de agua consumida a lo largo de esta etapa (datos no mostrados).

Prueba concurrente de aprendizaje apetitivo-gustativo y discriminación. El ANOVA llevado a cabo durante los 7 días experimentales muestra un efecto de Días x Sabor de $[F(6, 280) = 354,112, p < 0,001]$, un efecto de Grupo x Sabor de $[F(6, 280) = 116,959, p < 0,001]$ y un efecto de Grupo x Días x Sabor de $[F(6, 280) = 79,898, p < 0,001]$.

Etapa II (ensayos concurrentes de aprendizaje apetitivo-gustativo; días 1 a 5). Los análisis *post hoc* de interacción entre grupo x días x sustancia mostraron diferencias significativas en ambos grupos en la ingesta entre el sabor pareado (P) y el no pareado (NP) a partir del día 2 (en ambos grupos; Día 2 $p < 0,001$; Día 3 $p < 0,001$; Día 4 $p < 0,001$; Día 5 $p < 0,001$). (Figura 3).

Etapa III (prueba de discriminación días 6 y 7). El día 6 (Test 1) el grupo experimental o inactivo no muestra diferencias significativas en la ingesta entre el sabor P y NP, lo que muestra que no es capaz de evocar/expresar el AAPG adquirido previamente, mientras que en el día 7 (Test 2) sin administración intracerebral alguna si se observan dichas diferencias ($p < 0,001$).

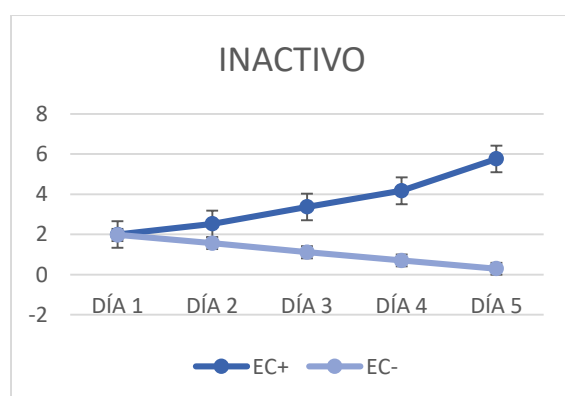


Fig. 3A.

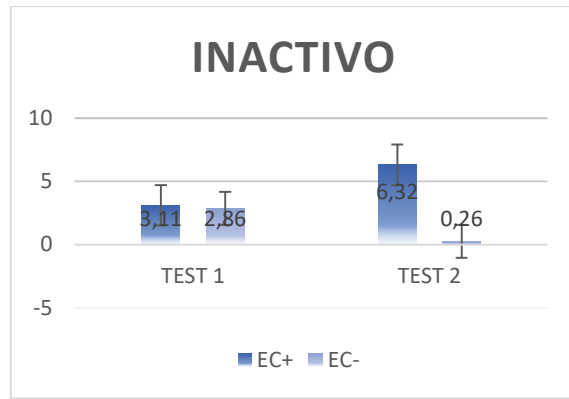


Fig. 3B.

Fig. 3. Ingesta de agua asociada a Glucosa o suero fisiológico en el grupo experimental (inactivación de CI) donde presentar el agua con la sustancia sería el EC+ y la falta de la misma el EC-, al apetitivo sabor concurrente en los días de aprendizaje (Fig. 3A) y los test de discriminación (Fig. 3B).

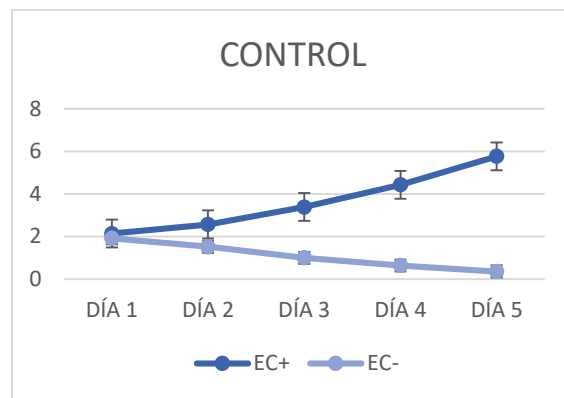


Fig. 4A.

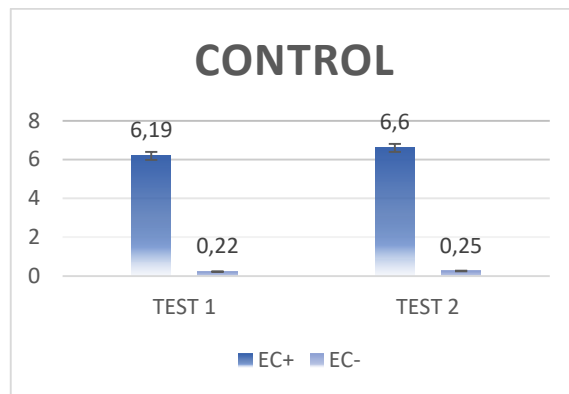


Fig. 4B.

Fig. 4. Ingesta de agua asociada a Glucosa o suero fisiológico en el grupo control (inactivación de CI) donde presentar el agua con la sustancia sería el EC+ y la falta de la misma el EC-, al apetitivo sabor concurrente en los días de aprendizaje (Fig. 4A) y los test de discriminación (Fig. 4B).

4. Discusión

El presente estudio muestra que la inactivación de la CI bloquea la evocación de un AAPG adquirido previamente donde se asoció un sabor con las consecuencias apetitivas viscerales inducidas por la administración intragástrica de glucosa, como se observa en el día 6 (Test 1) donde, tras la inactivación de la CI, no existe diferencias significativas entre los dos sabores utilizados en este proceso discriminativo.

Estos datos están en consonancia con artículos relacionados que indican que la CI es de gran importancia para la memoria gustativa ya que la exposición ante un sabor nuevo y que este desde ese momento se convierta en familiar y apetitivo depende de la CI y, por tanto, la inactivación de la misma bloquearía el recuerdo de que hemos estado expuestos a ese sabor anteriormente. Además, si la CI se inactiva antes de aprender que es un sabor apetitivo igualmente bloquearía dicho aprendizaje, estos artículos utilizan el modelo apetitivo gustativo y demuestran que con una sola exposición a un estímulo nuevo sin refuerzo postingestivo es suficiente para un aprendizaje apetitivo (Bermúdez-Rattoni, 2014; Parkes., *et al.*, 2014).

Acorde con esta idea, se ha visto la implicación de la CI en el procesamiento de las propiedades recompensantes tanto en estímulos naturales (comida, sexo, etc) como artificiales (droga, estimulación eléctrica, etc) (Cubero y Puerto, 2000). Para ello, García y sus colaboradores (2013) estudiaron el efecto reforzante de la estimulación eléctrica en la CI usando como paradigma la preferencia del lugar, observando que la estimulación eléctrica de la CI puede actuar como un estímulo visceral sustitutivo para reforzar las pruebas de aprendizaje gustativas y de preferencia del lugar (García *et al.*, 2013; Agüera *et al.*, 2016).

Más aún, cabe mencionar que hay artículos con humanos que demuestran que un daño o lesión de la CI conlleva una alta probabilidad de dejar la adicción a la nicotina al desaparecer el deseo (*craving*) por la sustancia (Naqvi *et al.*, 2007).

Así mismo, hay estudios que hacen uso del paradigma sobre la preferencia hacia un lugar asociado con la droga donde demuestran igualmente la implicación de la CI y su función de memoria relacionada en la drogadicción (Contreras *et al.*, 2012).

Sin embargo, también hay otros artículos que lo han realizado con el modelo aversivo gustativo donde estudian igualmente la implicación de la CI en la memoria gustativa y cómo afectaría la lesión o bloqueo de la misma en la adquisición de un nuevo aprendizaje o la evocación de un aprendizaje ya adquirido (Roman, *et al.*, 2009). Según Agüera y sus

colaboradores (2016) hace uso del modelo aversivo gustativo para estudiar la implicación de los opiáceos en la adquisición donde demuestran con el uso de la Naloxona como con los opiáceos se puede bloquear igualmente la adquisición de un nuevo aprendizaje.

Además, a pesar de los resultados obtenidos tanto en este como en otros estudios que aseguran la implicación de la CI en el paradigma de la memoria del gusto hay artículos que contradicen o cuestionan dicha implicación y muestran que la lesión de la CI produce deficiencias, pero no una interrupción completa del aprendizaje y recuerdo gustativo, lo que puede deberse a que en el experimento realizado hacen uso de un sabor con mayor concentración que el otro (Stehberg *et al.*, 2011; Touzani y Sclafani, 2007). Aunque son pocos los estudios que lo cuestionan, es señal de que se necesita más investigación para resolverlo.

Por tanto, ya que la glucosa produce los mismos efectos de recompensa que la droga y activa los mismos mecanismos innatos. Esto indicaría que un posible tratamiento eficaz podría ser el que inactive la CI en personas con enfermedad de drogadicción para así bloquear el recuerdo que conlleva estímulos asociados con la droga y con ello la aparición del *craving*. Se llega a dicha conclusión ya que, bloqueando la CI, se inhibiría la evocación del recuerdo asociado a la droga de igual manera que se hace con la asociación del gusto-visceral y que evitaría el *craving* y con este la recaída.

Referencias Bibliográficas

- Abdollahi, A., Williams, G.C., Benesch, C.G., Wang, H.Z., Spitzer, E.M., Scott, B.E., Block, R.C. y van Wijngaarden, E. (2017). Immediate and Sustained Decrease in Smoking Urges After Acute Insular Cortex Damage. *Nicotine Tob 19* (6), 756-762. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntx046>.
- Agüera, A.D.R., Bernal, A. y Puerto, A. (2016). Naloxone Impairs Concurrent but Sequential Flavor Aversion: Resorting to a Flexible/Explicit Learning. *Behavioral Neuroscience* 130(1), 19-28. <https://doi.org/10.1037/bne0000120>.
- Beck, A.T., Wright, F.D., Newman, C.F. y Liese, B.S. (1999). *Terapia cognitiva de las drogodependencias*. Paidós.
- Bermúdez-Rattoni, F. (2014). The forgotten insular cortex: Its role on recognition memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory* 109, 207-216. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.01.001>.
- Bonson, K.R., Grant, S.J., Contoreggi, C.S., Links, J.M., Metcalfe, J., Weyl, H.L., Kurian, V., Ernst, M. y London, E.D. (2002). Neural Systems and Cue-Induced Cocaine Craving.

- Neuropsychopharmacology* 26, 376-386. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00371-2](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00371-2).
- Contreras, M., Bolleke, P., Vicencio, S., Madrid, C., Perdomo, G., González, M. y Torrealba, F. (2012). A role for the insular cortex in long-term memory for context-evoked drug craving in rats. *Neuropsychopharmacology* 37(9), 2101-2108. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.59>.
- Contreras, M., Ceric, F. y Torrealba, F. (2008). The negative side of emotions: addiction to drugs of abuse. *Rev Neurol* 15;47(9), 471-476.
- Craig, A.D. (2002). How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body. *National Library of Medicine* 3(8), 655-666. <https://doi.org/10.1038/nrn894>.
- Craig, A.D. (2007). Interoception and emotion: A neuroanatomical perspective. *Handbook of Emotions*, 272-290.
- Cubero, I. y Puerto, A. (2000). Electrical stimulation of the insular cortex induces flavor-preferences in rats. *Brain research* 872, 134-140. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02516-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02516-6).
- Dionisio, S., Mayoglou, L., Cho, S.M., Prime, D., Flanigan, P.M., Lega, B., Mosher, J., Leahy, R., Gonzalez-Matinez, J. y Nair, D. (2019). Connectivity of the human insula: A cortico-cortical evoked potential (CCEP) study. *Cortex; a journal devoted to the study of the nervous system and behavior* 120, 419-442. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2019.05.019>.
- García, R., Simón, M.J y Puerto, A. (2013). Conditioned place preference induced by electrical stimulations of the insular cortex: effects of naloxone. *Experimental Brain Research* 226, 165-174. <https://doi.org/10.1007/s00221-013-3422-7>.
- Gardner, E.L. (2011). Addiction and brain reward and anti-reward pathways. *Advances in psychosomatic medicine*, 30, 22-60 <https://doi.org/10.1159/000324065>.
- Kober, H., y Mell, M.M. (2015). Neural mechanisms underlying craving and the regulation of craving. *The Wiley handbook on the cognitive neuroscience of addiction*, 195-218. <https://dx.doi.org/10.1037/t60575-000>.
- Koob, G.F. y Volkow, N.D. (2016). Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The lancet. Psychiatry*, 3 (8), 760-773. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00104-8).
- Martin-Fardon, R. y Weiss, F. (2017). Perseveration of craving: effects of stimuli conditioned to drugs of abuse versus conventional reinforcers differing in demand. *Addiction biology*, 22 (4), 923-932. <https://doi.org/10.1111/adb.12374>.
- Mediavilla, C., Molina, F. y Puerto, A. (2005). Concurrent conditioned taste aversion: a learning mechanism based on rapid neural versus flexible humoral processing of visceral noxious substances. *Neurosciences and biobehavioral* 29(7), 1107-1118. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.06.002>.

- Namba, M.D., Tomek, S.E., Olive, M.F., Beckmann, J.S. y Gipson, C.D. (2018). The Winding Road to Relapse: Forging a New Understanding of Cue-Induced Reinstatement Models and Their Associated Neural Mechanisms. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 12 (17). <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00017>.
- Naqvi, N.H. y Bechara, A. (2009). The hidden island of addiction: the insula. *Trends in Neurosciences* 32(1), 56-67. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.09.009>.
- Naqvi, N.H., Gaznick, N., Tranel, D. y Bechara, A. (2014). The insula: a critical neural substrate for craving and drug seeking under conflict and risk. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1316, 53-70. <https://doi.org/10.1111/nyas.12415>.
- Naqvi, N.H., Rudrauf, D., Damasio, H. y Bechara, A. (2007). Damage to the insula disrupts addiction to cigarette smoking. *Science* 315 (5811), 531-534. <https://doi.org/10.1126/science.1135926>.
- Naqvi, N.H., Rudrauf, D., Damasio, H. y Bechara, A. (2007). Damage to the insula disrupts addiction to cigarette smoking. *Science* 315(5811), 531-534. <https://doi.org/10.1126/science.1135926>.
- Parkes, S.L., De la Cruz, V., Bermúdez-Rattoni, F., Coutureau, E. y Ferreira, G. (2014). Differential role of insular cortex muscarinic and NMDA receptors in one-trial appetitive taste learning. *Neurobiology of Learning and Memory* 116, 112-116. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.09.008>.
- Paulus, M.P. y Stewart, J.L. (2014). Interoception and drug addiction. *Neuropharmacology* 76B (0), 342-350. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.07.002>.
- Roman, C., Lin, JY. Y Reilly, S. (2009). Conditioned taste aversión and latent inhibition following extensive taste preexposure in rats with insular cortex lesions. *Brain Res.* 1259, 68-73. <https://doi.org/10.1016/j.breiners.2008.12.058>.
- Stehberg, J., Moraga-Amaro, R. y Simón, F. (2011) The role of the insular cortex in taste function. *Neurobiology of Learning and Memory* 96(2), 130-135. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2011.03.005>.
- Touzani, K. y Sclafani, A. (2007). Insular cortex lesions fail to block flavor and taste preferences in rats. *Eur J Neurosci* 26(6), 1692-1700. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05798>.
- Türe, U., Yaşargil, D.C., Al.Mefty, O. y Yaşargil, M.G. (1999). Topographic anatomy of the insular región. *Journal of neurosurgery* 90(4), 720-733. <https://doi.org/10.3171/jns.1999.90.4.0720>.
- Volkow, N.D., Michaelides, M. y Baler, R. (2019). The Neuroscience of Drug Reward and Addiction. *Review* 99 (4), 2115-2140. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2018>.

- Wang, G.J., Volkow, N.D., Fowler, J.S., Cervany, P., Hitzemann, R.J., Pappas, N.R., Wong, C.T. y Felder, C. (1999). Regional brain metabolic activation during craving elicited by recall of previous drug experiences. *Life Sciences* 64 (9), 775-784.
[https://doi.org/10.1016/s0024-3205\(98\)00619-5](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(98)00619-5).
- Xavier, A., Hauglund, N.L., von Holstein-Rathlou, S., Li, Q., Sanggaard, S., Lou, N., Lundgaard, I. y Nedergaard, M. (2018). Cannula implantation into the Cisterna Magna of Rodents. *Neuroscience*, (135). <https://doi.org/10.379/57378>.
- Zafra, M.A., Agüera, A.D., Molina, F. y Puerto, A. (2017). Relevance of the nucleus of the solitary tract, gelatinous part, in learned preferences induced by intragastric nutrient administration. *Appetite* 118, 90-96.
- Zafra, M.A., Simón, M.J., Molina, F. y Puerto, A. (2002). The role of the external lateral parabrachial subnucleus in flavor preferences induced by predigested food administered intragastrically. *Brain Research* 950(1-2), 155-164.
[https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)03032-9](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)03032-9).