

Pontificia Universidad Católica de Chile
Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas
Mención Ciencias Fisiológicas



ROL DEL SISTEMA INTEROCEPTIVO EN EL MIEDO CONDICIONADO

*Tesis entregada a la Pontificia Universidad Católica de Chile en cumplimiento parcial de
los requisitos para optar al Grado de Doctor en Ciencias con mención en ciencias
fisiológicas*

CARLOS ANDRES MADRID GOMEZ

Director de Tesis: Dr. Fernando Torrealba López

Facultad de Ciencias Biológicas.

ii. Página de aprobación por el Comité de la Tesis.

COMITÉ DE TESIS

Dr.Fernando Torrealba

Dr. Rodrigo Iturriaga

Dr. Felipe Court

Dr. Francisco Aboitiz

iii. AGRADECIMIENTOS

A Conicyt por el financiamiento de gran parte de mis estudios en el programa de doctorado.

A la Dirección de Relaciones Académicas Internacionales de la Pontificia Universidad Católica de Chile, por el financiamiento de mi estadía en el extranjero.

Al Dr. Fernando Torrealba de la Pontificia Universidad Católica de Chile, por su apoyo científico y académico.

Al Dr. Marco Contreras, por el interés en el desarrollo de esta tesis, con quien sostuvimos largas discusiones de ideas que hicieron posible este trabajo.

Al Dr. Francisco Ceric por el apoyo brindado en la comprensión de la neuroanatomía de la corteza insular y por su apoyo en mi formación como docente.

A todos los integrantes del laboratorio del Dr. Torrealba por hacer grato el desarrollo de mi tesis.

Especialmente quiero agradecer a mis padres y hermanas por todo el amor, comprensión y apoyo incondicional en todos estos años.

A Jessica Santana por ser luz en momentos difíciles y por su apoyo laboral e intelectual en el desarrollo de esta tesis. Por su amor, paciencia y compañía en estos años.

iii. INDICE DE CONTENIDOS

iv. INDICE DE CONTENIDOS	Página
i . PORTADA.....	1
ii. COMITÉ DE TESIS.....	2
iii.AGRADECIMIENTOS.....	3
iv. INDICE DE CONTENIDOS.....	4
v. INDICE DE FIGURAS.....	6
vi. ABREVIATURAS.....	10
vii. RESUMEN.....	12
I. INTRODUCCIÓN.....	15
I.I Emociones: El miedo.....	15
I.II El Sistema Interoceptivo.....	16
I.III Organización cortical y talámica del sistema interoceptivo.....	21
I.IV El sistema interoceptivo y los núcleos amigdalinos.....	24
I.V El sistema interoceptivo en el miedo condicionado.....	27
I.VI Visión general.....	31
I.VII Formulación del Proyecto.....	31
II. HIPÓTESIS.....	32
III. OBJETIVOS.....	33
IV. METODOLOGÍA.....	35
IV.I General.....	35
IV.II Inyección de trazadores en la corteza insular granular.....	35
IV.III Inyección de trazador anterógrado en el tálamo.....	36

IV.IV Inmunohistoquímica BDA.....	37
IV.V Inmunohistoquímica CTB.....	38
IV.VI Lesiones exitotóxicas cruzadas.....	38
IV.VII Implantación de cánulas crónicas.....	39
IV.VIII Inyección Cortical.....	40
IV.IX Perfusión transcárdial y cortes seriados del cerebro.....	41
IV.X Procedimientos Conductuales.....	42
IV.XI Análisis estadístico.....	47
V. RESULTADOS	48
V.I Primera parte: Organización de la región granular o interoceptiva de la corteza insular.....	48
V.II Segunda Parte: Relación de la región interoceptiva de más alto orden con la Amígdala.....	91
V.IV Tercera Parte: El rol de la corteza insular en el miedo condicionado.....	112
VI. DISCUSION.....	140
VII. CONCLUSION.....	184
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	186
IX APENDICE (FIGURAS SUPLEMENTARIAS).....	197

vi. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática sencilla del flujo de información que ocurre en los sistemas sensoriales

Figura 2: Inyección de trazador anterógrado BDA en el núcleo talámico Ventral posterolateral, parte parvocelular (VPLpc)

Figura 3: Representación esquemática de las aferencias provenientes del VPLpc hacia regiones de la corteza insular y somatosensorial

Figura 4: Inyección de trazador anterógrado BDA en el núcleo talámico VPMpc

Figura 5: Representación esquemática de las aferencias provenientes del VPMpc hacia regiones de la corteza insular y somatosensorial

Figura 6: Fotomicrografía del sitio de inyección de BDA en la Corteza insular granular anterior (ICgA)

Figura 7: Proyecciones axonales desde ICgA. Representación esquemática de la marca de BDA presente en las secciones seleccionadas a través de las diferentes áreas corticales.

Figura 8: Fotomicrografía de las proyecciones córtico-corticales desde ICgA hacia ICgPAr ipsilateral.

Figura 9: Esquema representativo de la aferencias presente en el núcleo reticular del tálamo (Thalamus Reticular Nucleus, RT)

Figura 10: Representación esquemáticas de las principales aferencias talámicas desde ICgA.

Figura 11: Inyección de trazador anterógrado BDA en la región posterior de la corteza insular granular (ICgP).

Figura 12: Representación esquemática de la marca de BDA presente en las secciones seleccionadas a través de las diferentes áreas corticales.

Figura 13: Fotomicrografía de la proyección córtico-cortical desde ICgP hacia AIp

Figura 14: Esquema representativo de la aferencia presente en el núcleo reticular del tálamo (Thalamus Reticular Nucleus,RT) provenientes de ICgP

Figura 15: Fotomicrografía de la proyección desde ICgP hacia el núcleo RT visto en la fig. 14.

Figura 16: Representación esquemática de las principales aferencias talámicas desde ICgP.

Figura 17: Inyección de trazador anterógrado BDA en la región parietal rostral de la corteza insular granular (ICgPAr)

Figura 18: Proyecciones corticales de ICgPAr

Figura 19: Fotomicrografías de las proyecciones de la región ICgPAr hacia otras subdivisiones de la ínsula granular

Figura 20: Esquema representativo de la aferencias presente en el núcleo reticular del tálamo (Thalamus Reticular Nucleus,RT) provenientes de ICgPAr

Figura 21: Representación esquemática de las principales aferencias talámicas desde ICgPAr.

Figura 22: Fotomicrografías de las proyecciones hacia el núcleo talámico VPLpc desde ICgPAr.

Figura 23: Fotomicrografías de las proyecciones hacia el núcleo talámico Central medial (CM) desde ICgPAr

Figura 24: Inyección de trazador retrógrado CTB en la región posterior de la corteza insular granular (ICgP).

Figura 25: Representación esquemática de la marca de CTB presente luego de la inyección en ICgP, en las secciones seleccionadas a través de las diferentes áreas corticales

Figura 26: Representación esquemática de las proyecciones desde el tálamo hacia ICgP.

Figura 27: Inyección de trazador Retrógrado CTB en la región parietal caudal de la corteza insular granular (ICgPAc).

Figura 28: Representación esquemática de la marca de CTB luego de la inyección en ICgPAc, presente en las secciones seleccionadas a través de las diferentes áreas corticales

Figura 29: Representación esquemática de las principales eferencias talámicas hacia ICgPAc.

Figura 30: Inyección de trazador anterógrado BDA en la corteza insular agranular ventral (AIv).

Figura 31: Representación esquemática de las eferencias corticales y subcorticales desde AIv.

Figura 32: Representación esquemática de las eferencias desde AIv hacia diferentes núcleos y áreas de la amígdala.

Figura 33: Inyección de trazador anterógrado BDA en la corteza insular agranular dorsal (AId).

Figura 34: Representación esquemática de aferencias desde AId presentes en las secciones seleccionadas a través de las diferentes áreas corticales y subcorticales

Figura 35: Representación esquemática de las conexiones desde AId hacia diferentes núcleos y áreas de la amígdala.

Figura 36: Inyección de trazador retrógrado en la corteza insular agranular ventral (AIv).

Figura 37: Principal marca retrógrada en la amígdala, que envía aferencias hacia AIv

Figura 38: Proyecciones desde las cortezas prefrontales mediales hacia AIv.

Figura 39: Inyección de trazador retrógrado en la corteza insular agranular dorsal (AId).

Figura 40: Principal marca retrógrada en la amígdala, que envían sus proyecciones hacia AId

Figura 41: Proyecciones desde las cortezas prefrontales mediales hacia AId.

Figura 42: La inactivación de la corteza insular granular parietal rostral altera la expresión del miedo condicionado.

Figura 43: La inactivación de la corteza insular granular parietal rostral (pIC) con muscimol, previo a la exposición al tono, no modifica la expresión de *freezing*.

Figura 44: La desconexión de la corteza insular con la amígdala, mediante la lesión cruzada de la corteza insular agranular rostral y la amígdala basolateral con ácido iboténico altera la adquisición y expresión del miedo condicionado

Figura 45: Esquemas representativos de las lesiones realizadas con ácido iboténico correspondiente al gráfico anterior.

Figura 46: La desconexión de la corteza insular y la amígdala, mediante la inactivación cruzada de la corteza insular agranular rostral (RAIC) y la amígdala basolateral (BLA) con muscimol altera la adquisición del miedo condicionado de manera lateralizada.

Figura 47: La inactivación bilateral de la corteza insular agranular rostral (RAIC) con muscimol no altera la adquisición ni la extinción del miedo condicionado pero bloquea la recuperación

Figura 48: La consolidación del miedo condicionado es dependiente de la comunicación entre RAIC y BLA.

Figura 49: La lateralización es fundamental en la consolidación del miedo condicionado.

Figura 50: La desconexión de la corteza insular y la amígdala, mediante la inactivación cruzada de la corteza insular agranular rostral y la amígdala basolateral con muscimol altera la expresión del miedo condicionado.

Figura 51: Representación esquemática de la organización jerárquica en la corteza insular granular.

Figura 52: Representación de las conexiones con el núcleo reticular del tálamo.

Figura 53: Representación del flujo de información interoceptiva hacia la RAIC.

Figura 54: Principales conexiones de las subdivisiones ventral y dorsal de la RAIC hacia la corteza prefrontal medial y los núcleos amigdalinos.

Tabla 1: Coordenadas de Inyección trazadores Corteza insular granular y Tálamo.

vii. LISTA DE ABREVIATURAS.

ABREVIATURAS

- i. Aip Corteza insular agranular posterior
- ii. AMY amígdala
- iii. ANDEVA Análisis de varianza
- iv. BLA nucleo basolateral de la amígdala
- v. BDA Biotinilated Dextran Amine
- vi. CEA Nucleo central de la amígdala
- vii. CTB Cholera Toxin β -subunit
- viii. CS estimulo condicionado
- ix. DAB 3-3' hidrocloreuro de diaminobenzidina
- x. DI corteza insular disgranular
- xi. IC corteza insular
- xii. ICg corteza insular granular
- xiii. ICgA corteza insular granular anterior
- xiv. ICgP corteza insular granular posterior
- xv. ICgPAr corteza insular granular parietal rostra
- xvi. ICgPAc corteza insular granular parietal caudal
- xvii. IL Infralímbica
- xviii. ILA Área infralímbica
- xix. i.p. Intraperitoneal
- xx. LA amígdala lateral
- xxi. LHA Área hipotalámica lateral
- xxii. LO Orbital lateral
- xxiii. MeA nucleo medial de la amígdala
- xxiv. MD Mediodorsal del tálamo
- xxv. mlf Fascículo del lemnisco medial
- xxvi. Mop área motora primaria
- xxvii. Mos Area motora secundaria
- xxviii. NTS Núcleo del tracto solitario
- xxix. ORBm Orbitofrontal medial
- xxx. PAG sustancia gris periaqueductal
- xxxi. PBN Núcleo parabraquial
- xxxii. PBS Buffer fosfato-salino
- xxxiii. PFC Corteza prefrontal
- xxxiv. PL Prelímbica
- xxxv. Po núcleo posterior del tálamo
- xxxvi. PoT núcleo posterior del tálamo, parte triangular
- xxxvii. PTSD Desorden de estrés post traumático
- xxxviii. RAIC corteza insular agranular rostral
- xxxix. RAICd corteza insular agranular rostral, parte dorsal
- xl. RAICv corteza insular agranular rostral, parte ventral
- xli. Rt nucleo reticular del tálamo
- xl. SSp corteza somatosensorial primaria

- xliii. SSs corteza insular somatosensorial secundaria
- xliv. US estimulo no condicionado
- xliv. VLO Orbitofrontal central lateral
- xlvi. VPL núcleo talámico ventroposterolateral
- xlvi. VPL,pc núcleo talámico ventroposterolateral, parte parvocelular
- xlvi. VPM núcleo talámico ventroposteromedial
- xlvi. VPM,pc núcleo talámico ventroposteromedial, parte parvocelular
- l. ZI zona incerta

ii. RESUMEN

La región interoceptiva de la corteza insular es responsable de monitorear continuamente las condiciones fisiológicas internas, por lo que sería una región clave para la elaboración de respuestas conductuales consistentes con las necesidades internas del organismo. Asimismo, la amplia red de conexiones con estructuras autonómicas, viscerales y límbicas, como las fuertes y reciprocas conexiones con los núcleos amigdalinos, sugiere que esta corteza desempeña un importante papel en la integración de funciones autonómicas y emocionales que subyacen a la expresión de conductas complejas. La amígdala, una región que presenta abundantes y reciprocas conexiones con la corteza insular, se la ha señalado ampliamente como una estructura clave en el procesamiento de estímulos emocionales y en la formación de memoria emocional, particularmente en las memorias asociadas a miedo. De acuerdo a estos antecedentes nosotros proponemos que la desconexión entre el sistema interoceptivo y la amígdala alteran el aprendizaje del miedo condicionado. Primero, por medio de la inyección de trazadores anterógrado (BDA) y uno retrógrado (CTB), definimos cuatro subregiones de la corteza insular granular describiendo además el flujo de información interoceptiva hacia la RAIC. Segundo, estudiamos en detalle las conexiones de la región más rostral de la corteza insular (RAIC). Observamos que la RAIC presenta amplias y diversas conexiones con la amígdala y la corteza prefrontal medial, lo cual reafirma su rol como corteza de alto orden y sugiere un papel importante en memorias emocionales y posiblemente un rol diferencial de las dos subregiones de la RAIC. Tercero, a través de procedimientos conductuales nosotros evaluamos la importancia de la conexión entre el sistema interoceptivo y la amígdala. La desconexión permanente por medio de lesiones cruzadas con ácido iboténico entre la corteza insular y la amígdala, altera el aprendizaje del condicionamiento a miedo. La desconexión transiente de las mismas

estructuras mediante nactivaciones cruzadas realizadas con muscimol inmediatamente después del condicionamiento, altera la consolidación del aprendizaje asociativo del miedo. Además, por medio de un protocolo que se asemeja al desorden de estrés posttraumático, determinamos que la inactivación prolongada de región interoceptiva primaria de la corteza insular con Neosaxitoxina acelera la extinción del miedo condicionado. Estos resultados demuestran la participación de la región interoceptiva de la corteza insular en el procesamiento de memorias emocionales y que el vínculo con la amígdala es fundamental en la adquisición y consolidación de las memorias de miedo condicionado.

ABSTRACT

The interoceptive insular cortex region is responsible for continuously monitor internal physiological conditions, so it would be a key region for the elaboration of behavioral responses consistent to the internal needs of the organism. Furthermore, the extensive network of connections with autonomic, visceral and limbic structures, such as the strong and reciprocal connections with amygdaloid cores. Also, the extensive network of connections with autonomic, visceral and limbic structures, such as the strong and reciprocal connections with amygdaloid nuclei, suggests that this cortex plays a significant role in the integration of autonomic and emotional functions that underlie the expression of complex behaviors. The amygdala, a region with abundant and reciprocal connections with the insular cortex has been widely identified as a key structure in the processing of emotional stimuli and emotional memory formation, particularly in the acquisition and storage of memories associated with fear. According to these antecedents, we propose that the disconnection between interoceptive system and the amygdala disrupt the learning and

expression of conditioned fear. First, by injecting the anterograde (BDA) and the retrograde tracer (CTB), we defined four subregions of the granular insular cortex, which allowed us to know the flow of interoceptive information to the RAIC. Second, we described the connection of the most anterior area of insular cortex (RAIC). We note that the RAIC has extensive and diverse connections to the amygdala and medial prefrontal cortex, thus reaffirming its role as high order cortex and also suggests an important role in emotional memories and possibly a differential role of the two subregions of the RAIC. Third, by behavioral procedures we evaluate the relevance of the connection between the interoceptive system and amygdala. Permanent disconnection by cross-lesion between insular cortex and amygdala, made with ibotenic acid, disturbs the learning of fear conditioning. Transient disconnection by cross-inactivation induced with muscimol immediately after conditionings prevent the consolidation of associative fear learning. In addition using a protocol protocol that resembles a posttraumatic stress disorder (PTSD), we described that extended inactivation of primary interoceptive insular cortex region with neosaxitoxin accelerates extinction of conditioned fear. These results demonstrate the participation of the interoceptive region of the insular cortex in the processing of emotional memories and that the link with the amygdala is critical in the acquisition and consolidation of conditioned fear memories.

I. INTRODUCCION

1.1 Emociones: El miedo

Las conductas defensivas son un conjunto de respuestas expresadas en presencia de un peligro real o aparente, desplegadas como consecuencia de la actividad fisiológica y de circuitos neuronales que constituyen el substrato neural del miedo. De acuerdo al principio de evolución, las condiciones bajo las cuales las conductas ocurren tienen una importancia relevante, de tal manera que determinados comportamientos son adaptativos si ellos se producen en la situación propicia para su éxito (Whishaw I. and Kolb B.2004). En la rata, las conductas defensivas ocurren constantemente en un ambiente natural, las cuales pueden tener consecuencias positivas o pueden ser catastróficas, generando un aprendizaje asociativo que permite reaccionar de manera adecuada frente a un estímulo emocionalmente relevante cuando se presente nuevamente. Este aprendizaje de eventos aversivos es conservado a través de todas las especies, lo cual es crucial para su sobrevivencia.

Se ha descrito que este aprendizaje asociativo del miedo ocurre cuando se genera un vínculo entre el estímulo que potencialmente señalará el peligro y la respuesta a este estímulo que genera diversas conductas defensivas en las ratas. Diversos sistemas sensoriales que participan en la detección de estímulos como lo es un sonido u olor del depredador proveen información de la ubicación exacta y/o de la identidad de la amenaza potencial o presente, y son relevantes en la detección del peligro real o potencial. Frente a este estímulo los animales son capaces de evaluar el riesgo y así desplegar conductas que minimizan las opciones de ser detectado; entre las más estudiadas está la respuesta conocida como *freezing*. El *freezing* es una conducta defensiva de los roedores y otros

animales que se caracteriza por una evidente inmovilidad total en respuesta a un estímulo amenazante. Este despliegue conductual ha sido estudiado en animales de laboratorio, como respuesta condicionada a una clave pareada con un estímulo aversivo (Whishaw I. and Kolb B., 2004) y ha permitido describir diversas regiones cerebrales encargadas de este despliegue conductual y, más importante aún, ha sido la base para comprender el sustrato neural del miedo.

Cuando se discute sobre las bases neurales del aprendizaje asociativo del miedo, las principales estructuras estudiadas han sido (y son) el complejo amigdalóide, la corteza orbitofrontal, el hipocampo y regiones del cerebro basal como el hipotálamo y la sustancia gris periacueductal (PAG). De acuerdo a la teoría de emociones de Williams James (James 1884), la experiencia emocional del miedo se desencadenaría al sentir aquellos cambios fisiológicos y conductuales que ocurren luego que un estímulo emocional es presentado y por tanto es crucial entender ese proceso. Este conjunto de estructuras que sienten los cambios fisiológicos (autónómicos y somáticos) y que permiten la percepción de los cambios autonómicos es conocido como el sistema interoceptivo.

I.II El Sistema Interoceptivo

El sistema sensorial interoceptivo, en el cual participan regiones viscerosensoriales ubicadas en el troncoencéfalo, tálamo y corteza cerebral, es el encargado de registrar y procesar las señales corporales, y en particular la corteza insular, de llevar a cabo la toma de conciencia de un estado emocional (Craig 2002; Contreras 2008). Las señales provenientes de la activación de los diversos interoceptores ubicados en la piel, músculos, tendones cuyo soma neuronal se encuentra en el ganglio sensitivo de la raíz dorsal, y receptores en las vísceras cuyo soma neuronal está en los ganglios simpáticos y

parasimpáticos, son transportadas por fibras sensoriales de pequeño diámetro (Aδ y C) las cuales hacen sinapsis con neuronas de la lámina I de la médula espinal (lamina I de Rexed) o del núcleo del tracto solitario (NTS). El NTS tiene una organización viscerotópica y recibe información aferente gustatoria, orofaríngea, gástrica, intestinal, cardiovascular y respiratoria. Así mismo recibe información nociceptiva del asta dorsal y del núcleo trigeminal caudal y algunas de las neuronas del NTS responden a estímulos nociceptivos y viscerales. La mayoría de las neuronas del NTS envían sus aferencias hacia el tálamo y diferentes subnúcleos del núcleo Parabraquial (PBN), el cual también recibe información nociceptiva y visceral proveniente de la lámina I. El PBN proyecta al núcleo central de la amígdala, tálamo, hipotálamo, PAG y médula.

El núcleo talámico que recibe la información interoceptiva desde el el NTS y PBN es conocido como núcleo talámico ventroposterolateral parvocelular o VPLpc. Este núcleo talámico que recibe información visceral proveniente del PBN está adyacente a la región que recibe información nociceptiva y termoreceptiva del tracto espinotalámico y la vía trigémino talámica, y proyecta a diferentes regiones de la corteza insular. La información interoceptiva transportada por el subsistema de la lámina I también asciende directamente hasta el tálamo interoceptivo, el núcleo ventroposterolateral parvocelular (VPLpc) y envía colaterales al NTS. El VPLpc envía sus inputs de manera directa a un área acotada de la corteza insular, la corteza insular visceral o interoceptiva primaria.

La corteza insular, que ha sido definida en términos anatómicos como una región cortical situada alrededor de la fisura rhinal, y en términos de conectividad por su relación con los núcleos Ventroposterolateral (VPL) y Dorsal Medial del tálamo (MD) (Saper C. B. 1982; Cecheto 1990; Yasui 1991; Shi 1998), responde a diferentes estimulaciones

viscerales, y estas respuestas, al parecer, están organizadas en un mapa viscerotópico (Cecheto 1990; Yasui 1991). De acuerdo a criterios citoarquitectónicos, se ha dividido dorso-ventralmente en tres regiones. Una región ventral agranular, una región intermedia disgranular y una región dorsal granular, que limita con las cortezas somatosensorial primaria y secundaria (Cecheto 1990; Saper C. B. 1995). Se conoce que la región interoceptiva primaria, visceral o granular primaria, envía aferencias hacia regiones frontales de la corteza insular (ínsula agranular anterior), ubicada en la región prefrontal lateral, la que señala a regiones del cerebro ejecutivo como la corteza orbitofrontal y la corteza cingulada anterior y por tanto podría ser la región jerárquicamente más elevada del sistema interoceptivo. Sin embargo, el ensamble en el flujo de la información interoceptiva a nivel talámico y cortical que se ha propuesto es básico y poco claro. Los límites y la sub-organización de la corteza insular de la rata que se han descrito en trabajos previos (Krettek 1977; Guldin 1983; Cechetto 1987; Allen 1991; Ray 1992; Shi 1998), dan ideas elementales de una posible organización jerárquica del sistema sensorial interoceptivo, el cual se organizaría de manera semejante a los sistemas exteroceptivos, como lo han propuesto algunos autores para el sistema visual y que revisaremos a continuación (Guillery RW, 2002).

Organización general de los sistemas sensoriales

Esencialmente todas las áreas corticales sensoriales reciben *inputs* provenientes de los receptores periféricos por medio del núcleo talámico correspondiente a la modalidad sensorial y envían sus *outputs* hacia diferentes centros motores para la ejecución de una respuesta. Se ha planteado que este flujo de información en los sistemas sensoriales tiene

una organización jerárquica, que da cuenta del procesamiento en serie de la información correspondiente.

Para el sistema visual existe abundante evidencia anatómica y electrofisiológica que da cuenta del orden jerárquico. La información proviene desde la retina realiza su primera sinapsis en el núcleo talámico geniculado lateral dorsal (LGN), desde aquí las neuronas envían sus axones hacia la región cortical conocida como visual primaria (V1) (o de primer orden) esencialmente en la capa iv de la corteza. Esta área cortical de primer orden se comunica con otra(s) región(es) cortical(es), denominadas de segundo orden, V2 en el sistema visual, por medio de una vía que es directa córtico-cortical y otra vía indirecta córtico-tálamo-cortical (transtalámica), a menudo organizada en forma paralela. Se conoce que las aferencias de una corteza que proyectan hacia otra región cortical provienen principalmente desde las capas superficiales ii y iii, y desde las capas profundas, principalmente capa vi y terminan ya sea en la capa iv, aferencia conocida como de primer orden (FO) o en las capas i, ii, iii, v y vi (ausencia de proyecciones en la capa iv), aferencia que se conoce como de alto orden (HO). La aferencia transtalámica en el sistema visual, ocurre inicialmente a través del núcleo talámico pulvinar, el cual no recibe información del mundo externo directamente, sino que desde V1, estas aferencias salen desde la capa v y son excitatorias y el núcleo pulvinar envía sus proyecciones hacia la corteza visual de segundo orden. Todos los núcleos talámicos además reciben información de vuelta (*Feedback*) desde la capa vi de la corteza (para una revisión más detallada ver Sherman 2005; o Guillery y col 2002)

Cuando una neurona actúa sobre otra, su efecto post-sináptico puede variar enormemente. En los sistemas sensoriales se pueden distinguir inputs que son “*drivers*”

(clase 1) de los que son “*moduladores*” (clase 2). El driver puede ser identificado como el transmisor de las propiedades del campo receptivo, y el modulador como el que altera la efectividad de esta transmisión (cambian el patrón de actividad). En muchos relevos sensoriales los inputs *drivers*, son reconocidos porque transportan su mensaje desde la periferia, mientras que la información cortical que va hacia el tálamo puede ser *driver* o moduladora. Existe una clara evidencia morfológica que ha permitido la distinción de ambos tipos de aferencias. Los inputs drivers son de mayor tamaño, parecidos a las fibras musgosas del cerebelo, mientras que los inputs moduladores son de pequeño tamaño y con diferentes características neuroanatomicas de sus terminales (Guillery y Col 2002)

En el sistema visual los axones que van desde la retina al LGN serían *drivers*, mientras que las aferencias corticales desde la capa vi hacia los núcleos talámicos son moduladoras. Para los núcleos de primer orden (FO) como el LGN esta es su única inervación cortical. Otros grupos de núcleos talámicos, los denominados de alto orden (HO) reciben aferencias desde la capa v, lo cual es un *driver input* ya que el patrón su efecto post-sináptico es parecido al de los drivers que provienen desde la periferia, y axones que van desde la capa vi de la corteza con inputs que son *moduladores*. Junto con esto los inputs clase 1 (FO) envían sus ramas colaterales hacia regiones motoras del tronco encéfalo y centros motores espinales.

Además de este flujo de información, en todos los sistemas sensoriales se cumple que el flujo de información sensorial entre el tálamo y la corteza es regulado por una región particular para cada modalidad sensorial del núcleo reticular del tálamo, a través de las conexiones inhibitorias que éste tiene con el tálamo, por lo que se le ha considerado una estructura clave en procesos atencionales (Guillery et al., 1998).

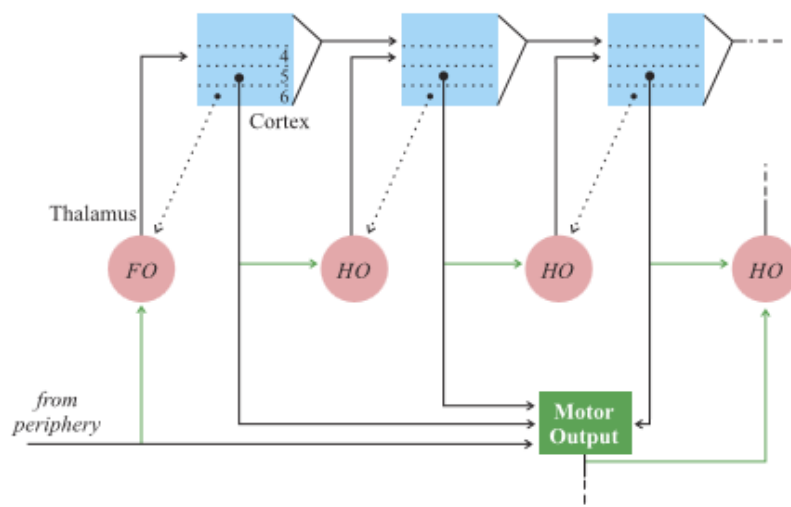


Figura 1. Representación esquemática sencilla del flujo de información que ocurre en los sistemas sensoriales (Sherman SM y Guillery RW 2011). La organización jerárquica propuesta para el sistema visual se sugiere que se extendería a otros sistemas sensoriales.

Más allá del sistema que estemos ejemplificando, se ha descrito que esta compleja organización está presente en los sistemas auditivos y somatosensorial, y se sugiere que podría estar presente en todos los sistemas sensoriales, incluyendo el sistema interoceptivo.

I.III Organización cortical y talámica del sistema interoceptivo

La corteza insular (IC) tiene una extensión que va desde los 4 mm anterior a bregma hasta aproximadamente 4 mm detrás de bregma. La zona posterior de la corteza insular donde se encuentra la región interoceptiva primaria, que comprende la región granular desde bregma hasta 1,8 detrás de bregma¹, es aquella zona que recibe aferencias desde el VPLpc, y por tanto se ha denominado como corteza visceral. La zona insular disgranular,

¹ De acuerdo a la nomenclatura existente bregma es el punto 0 antero-posterior, por lo cual de aquí en adelante lo que este delante de bregma será denominado con el símbolo + mientras que lo que se encuentre detrás de esta punto será denominado con el signo -.

que recibe aferencias principalmente del tálamo gustatorio (VPMpc) se ha denominado corteza gustatoria, mientras que la región agranular de la corteza insular, la región jerárquicamente más elevada, se ha descrito como un área de asociación multimodal, y su núcleo talámico principal es el dorsal medial. Los criterios para determinar estas extensiones y las diferentes subdivisiones de la corteza insular son citoarquitectónicos y de conectividad con otras áreas del cerebro, tanto corticales como subcorticales (Saper C.B. 1995). Estos trabajos han mostrado de manera parcial que la zona interoceptiva de la ínsula se relaciona principalmente con la corteza insular granular, cortezas somatosensoriales y con los núcleos ventroposteromedial, ventroposterolateral y posterior del tálamo.

Por otra parte, trabajos han descrito que la región anterior de la corteza insular, la corteza insular agranular rostral (RAIC), contiene representaciones interoceptivas que proveen una base para los sentimientos subjetivos desde el cuerpo y podría participar de la conciencia emocional (*emotional awareness*), y sería el lugar donde reside una integración de la información interoceptiva (Contreras y col 2008; Craig, A. D. 2009). Evidencias neuroanatómicas y electrofisiológicas han propuesto que la corteza insular agranular sería una corteza multimodal, ya que recibe y procesa información de varias modalidades sensoriales incluyendo visceral y gustatoria; además de recibir aferencias de estructuras que forman parte del sistema límbico² como la corteza infralímbica, la amígdala y el núcleo mediodorsal del tálamo (Saper C. B. 1982; Cecheto 1990; Allen 1991). Se ha propuesto que esta región de la corteza insular es una zona de integración de respuestas autonómicas y límbicas (Saper C. B. 1982; Cechetto 1987; Cecheto 1990; Allen 1991; Saper C. B. 1995).

² Sistema Límbico: Conjunto de estructuras corticales y subcorticales que son importantes para el procesamiento de información emocional y en procesos de memoria. Dentro de sus principales componentes podemos mencionar el Hipocampo y la Amígdala (Nestler E. J., 2001).

Aun cuando existe un amplio conocimiento en términos anatómicos de la corteza insular, poco se ha detallado sobre las relaciones intra-cortical dentro de la misma ínsula granular y con otras áreas insulares, y por tanto se desconoce aún si existe una jerarquía en esta zona de la ínsula, tal como lo existe para las cortezas visuales (Coogan y Col. 1990), lo cual es fundamental para entender cómo la ínsula procesa las señales autonómicas, las cuales participan en desencadenar distintos y variados estados emocionales. Así también, se ha descrito por medio de estudios citoarquitectónicos (Paxinos y Watson 2007) que la región granular de la ínsula se extiende más allá de los dos milímetros, aunque se desconoce si esta zona es una proyección más rostral de la corteza posterior o es un área cortical completamente diferente. Entonces, de acuerdo a la organización que conocemos hoy del sistema interoceptivo, la corteza insular es la región jerárquicamente más alta, responsable de monitorear continuamente las condiciones fisiológicas internas, y sería un área clave para la elaboración de respuestas conductuales consistentes con las necesidades internas del organismo. Por lo que conocer, describir y comprender su compleja organización interna es necesario para analizar su participación en la respuesta emocional del miedo.

Además la amplia red de conexiones con estructuras autonómicas, viscerales y límbicas, sugiere que esta corteza desempeña un importante papel en la integración de funciones autonómicas y emocionales que subyacen a la expresión de conductas complejas, como el estado emocional del miedo. Entre las estructuras relevantes que han sido estudiadas con mayor énfasis en las conductas de miedo están los núcleos amigdalinos, con los cuales el sistema interoceptivo tiene conexiones importantes.

I.IV El sistema interoceptivo y los núcleos amigdalinos

'Amígdala' y 'complejo amigdalario' son términos que ahora se refieren a una región altamente diferenciada cerca del polo temporal del hemisferio cerebral de los mamíferos y consiste en una variedad de núcleos diferentes, entre los que se destacan el grupo basal y lateral, referidos como núcleo basolateral de la amígdala (BLA), y el núcleo central (CeA) (Krettek 1978). Estudios de conexiones en primates (Van Hoesen 1981) establecen que la amígdala recibe proyecciones desde las regiones corticales de la corteza temporal, además de aferencias provenientes de cortezas de procesamiento sensorial de alto orden, donde particularmente se destacan las aferencias visuales y auditivas (Krettek 1978; Price 1981; Mesulam 1982; Petrovich 1997; Stefanacci 2000; Stefanacci 2002; Sheila 2005). Otras aferencias son las provenientes de núcleos talámicos, hipocampo, hipotálamo y regiones del tronco cerebral como el núcleo del tracto solitario (NTS).

Las aferencias descritas anteriormente reflejan un patrón de conexiones que es importante para responder a reforzadores primarios y secundarios, lo cual nos ayuda a entender como la amígdala junto con otras regiones o sistemas cerebrales participan en el procesamiento de emociones (Rolls 1999). Trabajos previos han mostrado diferencias en las proyecciones hacia la amígdala desde la región interoceptiva de más alto orden, es decir, desde la corteza insular agranular rostral (McDonald y Col 1996; Reep 1982; Mesulam 1982; Reep 1994; Shi 1998; Stefanacci 2000; Stefanacci 2002; Jasmin L 2004 ; Sheila 2005) la cual conecta principalmente con regiones basolaterales y mediales de la amígdala. Se desconoce si estas proyecciones desde la corteza insular pudiesen participar como reforzadores o moduladores de la actividad de la amígdala, como lo hacen las regiones de la corteza prefrontal medial, para las cuales se han descrito diversas funciones relacionadas

con el condicionamiento clásico (Quirk GJ y Col 1997; Quirk GJ y Col 2000; Santini E. y Col 2004; Quirk GJ y Col 2008; Sierra-Mercado D. y Col 2011)

Uno de los roles mejor estudiados para la amígdala es precisamente el condicionamiento pavloviano a miedo, en donde un estímulo condicionado neutral (como un sonido) es pareado con un estímulo nocivo (como por ejemplo un shock eléctrico en las patas, o *footshock*); luego frente a la reexposición al estímulo condicionado, el organismo exhibe respuestas estereotipadas naturalmente asociadas al estímulo incondicionado; en general para el shock en las patas ocurre *freezing*. Clásicamente se ha propuesto que durante el condicionamiento a miedo la transmisión de información sobre el estímulo condicionado (CS) y el estímulo no condicionado (US), convergen en la amígdala (LeDoux 2000). Las vías del estímulo condicionado han sido estudiadas en una serie de trabajos por medio de lesiones y registros electrofisiológicos, principalmente entradas sensoriales auditivas provenientes tanto del tálamo como de la corteza auditiva (LeDoux 1991; Campeau 1995; Shi 1999; LeDoux 2000). Estos estudios han establecido un rol diferencial de estos *inputs* en las distintas etapas del condicionamiento, y además han establecido que la región lateral (LA) de la amígdala es donde ocurriría la convergencia de los estímulos (LeDoux 2000). Sin embargo las vías del estímulo no condicionado, en este caso el *footshock*, aún son controversiales (Lanuza 2008), y se han vinculado al tálamo y cortezas somatosensoriales, así como a la región más caudal de la corteza insular, por sus conexiones con el sistema somatosensorial (Shi and Davis 1999). Pero han dejado de lado los cambios a nivel autonómicos que ocurren durante la asociación del estímulo condicionado, omitiendo el rol clave que tiene el sistema interoceptivo durante el aprendizaje y expresión de la respuesta a miedo.

Estudios de lesiones electrolíticas bilaterales (LaBar K y Col 1996; Nader K. y Col 2001) o lesiones unilaterales electrolíticas mezcladas con lesiones contralaterales neurotóxicas (Goosens K.A. y Col 2001) en diferentes subnucleos de la amígdala han mostrado que la región lateral de la amígdala (LA) es fundamental en la adquisición del miedo condicionado inducido por clave y miedo contextual, previenen la expresión del miedo, y que es necesaria la participación de al menos una amígdala para que la adquisición sea exitosa. Por otro lado, diversos estudios han puesto evidencia el rol esencial del núcleo central de la amígdala en la expresión del miedo condicionado y su correlato con respuestas autonómicas y conductuales de miedo (e. gr.: Quirk 2003). Otros hallazgos donde se ha descrito un rol de la amígdala en memorias, son estudios donde se infundió ácido 2-Amino-5-fosfonovaleriánico (APV), el cual previene la potenciación a largo plazo (LTP), y que mostraron que si se infunde previo al condicionamiento bloquea el aprendizaje, aunque si es infundido previo al test no previene la expresión de miedo, concluyendo que receptores de ácido N-metil-D-aspartico (NMDA) estarían involucrados en la plasticidad que subyace al aprendizaje y no en la transmisión de señales a través de la amígdala. La amígdala basolateral se ha descrito como la principal área para la adquisición y consolidación de las memorias asociadas a miedo (LeDoux 1991; LeDoux 1993; Petrovich 1997; Ehrlich I. Humeau Y. 2009; Maren 2004). Estudios sobre consolidación de memoria han descrito un periodo de tiempo luego del aprendizaje donde las memorias son establecidas (Alvarez P. y Col 1994; Dudai 1996; Davis y Squire, 1984). Estos trabajos han determinado que la intervención o manipulación mediante diversos fármacos que alteran la síntesis de proteínas en el periodo de consolidación de memorias ha perturbado el proceso de aprendizaje a miedo en ratas cuando es evaluado en una evocación posterior (Schaffe y Col 2000). De acuerdo a los trabajos en memorias de miedo, se ha descrito que en la amígdala

existe una ventana de tiempo donde un aprendizaje puede ser alterado, lo cual es relevante si se piensa por ejemplo en que el aprendizaje a miedo puede llegar a ser perjudicial si se cae en un miedo y ansiedad excesivos. De manera semejante se ha intervenido en el proceso de recuperación de memorias consolidadas mediante manipulaciones farmacológicas en la amígdala durante la ventana de reconsolidación, donde se ha eliminado el miedo condicionado (Nader y Col 2009; Monfils y Col 2009; Schiller y Col 2009), proceso celular que es completamente diferente al de consolidación (Lee J y Col 2004) y que hasta el momento ha demostrado ser dependiente de síntesis proteica en la región basolateral de la amígdala y no dependiente de la actividad eléctrica en la misma zona (Wilensky A. y col 1999).

Es ampliamente aceptado que es en la neocorteza y no el hipocampo donde las memorias declarativas son almacenadas (Alvarez P. y Col 1994; Squire L 2004). La evidencia actual indica que en la amígdala no se almacenan las memorias de largo plazo. Es por ello que nosotros sugerimos que estas memorias asociativas podrían ser consolidadas y posteriormente evocadas en la corteza insular. La corteza insular como una región donde se integra la información interoceptiva, podría participar de la formación y recuperación de memorias interoceptivas que permita vincular las diversas claves con los estados corporales inducidos por el miedo, ya sea de manera propia o en su vínculo con la amígdala.

I.V El sistema interoceptivo en el miedo condicionado

Estudios previos han tratado de evaluar el rol de la ínsula en memorias emocionales y particularmente en el condicionamiento a miedo. Principalmente los grupos de Ledoux y Davis (Rosen J. y Col 1992; Romanski L. y Col 1992; R; Campeau y Col 1995; Shi y Col 1999;), han realizado lesiones bilaterales electrolíticas, excitotóxicas y de aspiración en la

región parietal de la ínsula (desde -1.8 a -4 mm con respecto a bregma). Estos trabajos, no han logrado definir cómo la ínsula puede estar vinculada con la expresión de miedo (Brunzell DH, Kim JJ.2001). De manera general ninguno de estos trabajos (Rosen J. y Col 1992; Romanski L. y Col 1992) ha encontrado efectos en el aprendizaje, aunque han logrado establecer que se perjudica el incremento del reflejo de sobresalto por un estímulo visual o auditivo asociado a miedo (*fear potentiated startle*) pero sólo con lesiones electrolíticas post-entrenamiento, lo cual permite sospechar de la validez que tendrían este tipo de lesiones, principalmente al involucrar fibras de paso que podrían influir en otras áreas. Esto se estudió con lesiones excitotóxicas en la misma región las que revelaron ausencia de efecto de la lesión de esta región insular caudal en el miedo condicionado (Romanski 1992; Rosen 1992; Campeau 1995; Shi 1999; Romanski 1992).

Otros estudios han involucrado a la ínsula en la respuesta inicial a estímulos emotivos. La región agranular anterior de la corteza insular, posee conexiones recíprocas con la amígdala (Mesulam 1982; Shi 1998; Stefanacci 2000; Stefanacci 2002; Jasmin L 2004 ; Sheila 2005) y forma parte de una red de estructuras que parecen participar en la percepción y organización de las respuestas autonómicas a estímulos aversivos o amenazantes (Öngur 2000). Los estudios se han enfocado principalmente en condicionamiento aversivo a sabores. Los trabajos realizados por Federico Bermúdez-Rattoni y col, (Bermúdez-Rattoni 1991; Bermúdez-Rattoni 1997; Bermúdez-Rattoni 2004) han tratado de relacionar áreas de la corteza insular con patrones conductuales como inhibición de la evitación (*inhibitory avoidance task*). De acuerdo a este grupo, existe un loop entre ínsula y amígdala que es responsable del almacenamiento de memorias aversivas. Trabajos que muestran lesiones bilaterales en la corteza insular (lesiones en la

zona disgranular), lesiones excitotóxicas usando N-metil-D-aspartato (NMDA), han descrito efecto de la lesión en la adquisición de aversión a sabor (CTA, *conditioned taste aversión*) y aprendizaje espacial (*Morris water maze*). Ellos describieron efectos para la región central de la ínsula en aversión a sabor y para la región posterior en aprendizaje espacial. Interesantemente, se ha reportado que la administración de ácido 2-amino-5-fosfonopentanoico (AP5) -un antagonista de los receptores de glutamato de tipo NMDA- directamente en la corteza insular impide la adquisición y retención, pero no la expresión del condicionamiento aversivo a sabores (Nerad 1996; Gutiérrez 1999). Dado el conocido rol de los receptores de NMDA en plasticidad sináptica y memoria, este último resultado provee evidencias directas de que la corteza insular participa activamente en la formación de memorias.

Si bien es conocido que la amígdala presenta gran cantidad de *inputs* provenientes de regiones prefrontales, como corteza prefrontal medial (prelímica e infralímica) (Hoover 2007), con regiones de la corteza orbitofrontal y con la RAIC (Ghashghaiea 2002; Sheila 2005), aún se desconocen cómo interactúan las regiones frontales y la amígdala en emociones. Trabajos realizados por Gregory Quirk han asociado un control inhibitorio de la corteza prefrontal medial sobre la amígdala, y además han asociado la función de la corteza Infralímica (IL), una subregión de la corteza prefrontal medial, en extinción a miedo condicionado (Quirk 2000; Milad 2002; Myers 2007; Burgos-Robles 2007; Quirk 2008). El rol de la corteza infralímica en consolidación de la extinción fue sugerida por experimentos en animales que han sido lesionados en la IL, ya que estos animales podían adquirir la extinción dentro de una sesión, pero tenían dificultad en recuperar (*retrieving*) la extinción al día siguiente, es decir, presentaban miedo (Quirk 2000; Lebrón 2004). Estudios

realizando infusiones de diferentes fármacos en la corteza prefrontal medial han encontrado resultados similares (Myers 2007; Burgos-Robles 2007 ; Quirk 2008). Por otra parte se cree que la corteza prelímbica podría participar de manera opuesta en la extinción del miedo condicionado, promoviendo la respuesta de *freezing* (Quirk 2008). El rol que tendrían otras regiones prefrontales en la respuesta emocional y en modular la actividad de la amígdala aún es incierto, a pesar que existen algunos avances como por ejemplo aquel sobre la corteza cingulada (Bissière 2008). Sin embargo aún se desconoce cómo el sistema interoceptivo interactúa con la amígdala en respuestas emocionales como el miedo.

El objetivo de la tesis está orientado a estudiar el rol de la de la corteza insular en vincular información interoceptiva con claves externas en la amígdala. Para ello, en la primera parte de esta tesis hemos descrito en detalle cómo son las conexiones de la corteza insular interoceptiva, lo cual nos ha dado los conocimientos para entender cómo la RAIC integra la información interoceptiva. Junto con ello, en nuestro segundo objetivo, hemos descrito las conexiones de la RAIC con la amígdala lo cual nos ha permitido entender la forma en que estos dos sistemas interactúan. Nuestro tercer propósito fue evaluar mediante estudios conductuales, utilizando el paradigma de condicionamiento a miedo, si el sistema interoceptivo es preponderante en la expresión del miedo condicionado.

I.VI Visión general

El sistema sensorial interoceptivo tiene una organización jerárquica que aún no ha sido descrita completamente y donde la corteza insular agranular rostral (RAIC) sería la región jerárquicamente más elevada, que integraría la información sensorial interoceptiva proveniente de la corteza insular primaria, participando de la percepción consciente de los estados emocionales. En este sentido se puede postular a la RAIC como un nodo clave en la red que es el sustrato neural de las memorias emocionales, vinculando esta información interoceptiva con la amígdala durante la expresión de emociones. Los estudios de trazadores axonales han descrito conexiones bidireccionales entre estas dos regiones; además los estudios en humanos han mostrado actividad en ambas zonas frente a estímulos emocionales relevantes. Trabajos realizados en ratas sobre la percepción de dolor han vinculado a estas dos áreas en la respuesta emocional del dolor. De esta manera proponemos que en la RAIC y la amígdala participan de modo conjunto en el proceso de adquisición y expresión de memorias emocionales, vinculando un estímulo con el estado interno del animal, siendo esta interacción relevante en el despliegue de las conductas motivadas, evaluadas en forma particular en la expresión del miedo mediante el *freezing*.

I.VII Formulación del Proyecto

Proponemos que el sistema interoceptivo y la amígdala participan en conjunto en los procesos de aprendizaje y consolidación de memorias emocionales, lo que permite la asociación entre estímulos exteroceptivos condicionados y una emoción. En particular nos hemos preguntado ¿Qué ocurre si desconectamos estas dos estructuras en los procesos de aprendizaje y expresión del miedo condicionado?

II. HIPOTESIS

La desconexión del sistema interoceptivo y la amígdala perturba al aprendizaje y la expresión del miedo condicionado.

Hipótesis de trabajo

“La Corteza insular agranular rostral (RAIC) es determinante en vincular información interoceptiva con claves externas (exteroceptivas) en la amígdala, en la adquisición de memorias emocionales”

III.OBJETIVOS

1) Determinar si la región anterior de la corteza insular corresponde a un área de asociación multimodal del sistema interoceptivo.

1.1) Definir los límites de la corteza insular interoceptiva. Evaluar las conexiones talámicas y córtico-corticales de la ínsula comparándolas con las de sistemas sensoriales ampliamente descritos.

1.2) Definir la existencia de una corteza de alto orden jerárquico para la vía interoceptiva, de acuerdo a criterios establecidos para el sistema visual.

2) Determinar las diferencias en el patrón de conexiones que tienen las subregiones de la corteza insular agranular.

2.1) Determinar las eferencias de las dos subdivisiones de la corteza insular agranular rostral.

2.2) Determinar las aferencias de las dos subdivisiones de la corteza insular agranular rostral, principalmente desde regiones prefrontales y la amígdala

3) Determinar si la corteza insular participa en el proceso de adquisición y expresión de memorias emocionales.

3.1) Determinar si la inactivación prolongada de la región interoceptiva primaria altera el aprendizaje y expresión del miedo condicionado.

3.2) Determinar el efecto de la inactivación parcial de la RAIC, región interoceptiva de alto orden, altera las memorias vinculadas al miedo condicionado.

3.3) Determinar si la desconexión irreversible del sistema interoceptivo con la amígdala afecta el aprendizaje y la expresión del miedo condicionado.

3.4) Determinar si la desconexión parcial del sistema interoceptivo con la amígdala, durante el proceso de consolidación de memorias, afecta la adquisición del miedo condicionado.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.I General

Se utilizaron 130 ratas Sprague-Dawley macho adultas (270-300 g), las que fueron mantenidas en jaulas individuales bajo temperatura controlada (21-22 °C) y con un ciclo de luz-oscuridad 12/12 horas con agua y comida *ad libitum*. Los estudios fueron llevados a cabo de acuerdo a la guía del NIH para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (Publicación NIH No. 80-23, revisada 1996).

IV.II Inyección de trazadores en la corteza insular granular

Las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de ketamina (100mg/kg) /Xilazina 2% (20mg/kg) i.p., y luego puestas en un aparato estereotáxico. Inyecciones suplementarias de anestesia (30% de la dosis inicial) fueron administradas durante la cirugía cuando fue necesario. Bajo condiciones asépticas, los animales recibieron inyecciones a presión con una micropipeta de vidrio. El volumen de inyección fue de acuerdo al tipo de trazador utilizado y a la región de inyección de acuerdo a trabajos realizados previamente en nuestro laboratorio (Stehberg J y Col 2001; Contreras y Col 2007). Para la inyección de trazador anterógrado en diferentes regiones de la corteza insular granular se inyectó 15 nl de *Biotinilated Dextran Amine* (BDA) al 1% en salino con micropipetas con punta de ca. 10 µm (0.25 mm de diámetro interno) mediante pulsos de 20 psi de presión de aire con una bomba de presión (PV 800, Neumatic-picopump, WPI Instruments). Luego de 5 minutos de espera para facilitar la difusión del trazador se retiró la pipeta del cerebro y se procedió a la sutura de la piel.

De la misma manera que con el trazado anterógrado se procedió a inyectar el trazador retrógrado *Cholera Toxin β -subunit* (CTB) 3 nl al 1% en salino en 12 ratas macho Sprague Dawley.

IV.III Inyección de trazador anterógrado en el tálamo

Las inyecciones en los núcleos talámicos siguieron los mismos protocolos utilizados para las inyecciones de trazadores en la corteza insular granular. Catorce ratas macho Sprague Dawley fueron inyectadas con BDA. En este caso solo se modificaron los volúmenes de inyección. Las inyecciones en los núcleos talámicos Ventroposteromedial parvocelular (VPMpc), Ventroposterolateral parvocelular (VPLpc) y Posterior del tálamo (Po) el volumen de inyección de BDA fue 3nl. Las coordenadas de inyección se determinaron de acuerdo al atlas de Swanson (Swanson 1998) y se resumen en la tabla 1. Al final de la cirugía las ratas recibieron una inyección de antibiótico (Enrofloxacin 5%; 19 mg/Kg i.p., Bayer, Santiago de Chile) y de anti-inflamatorio (Ketophen 0.2 mg/Kg i.p., Rhodia Merieux) lo cual además fue administrado durante los tres días siguientes a la cirugía. Los animales se mantuvieron en sus cajas durante siete días para luego ser sacrificados y evaluar

Tabla 1 Coordenadas de Inyección trazadores Corteza insular granular y Tálamo

Antero- Posterior (mm)	Lateral (mm)	Profundidad (mm)	Trazador	Sitio de inyección
-4,2	3	5,8	BDA	VPLpc
-3,9	1,2	6	BDA	VPMpc
+2,8	5	2,8	BDA	ICgA
+0,95	5,4	5	BDA ,CTB	ICgP
-0,51	5,4	5,3	BDA, CTB	ICgPAr
-2,00	6	5	CTB	ICgPAc
+2,8	3,6	4,2	BDA, Fluorogold	RAICv
+2,8	4,2	4,4	BDA, Fluorogold	RAICd

IV Inmunohistoquímica BDA

Para visualizar la inyección del trazador BDA y sus proyecciones se realizó un revelado con el complejo ABC diluido 1:250 en PB por 2h a temperatura ambiente, seguido por la incubación en Niquel, DAB y H₂O₂ en PB por 8min .. Los sitios de inyección se definieron de acuerdo a criterios citoarquitectónicos mediante el uso de la tinción de Nissl, y evaluación con microscopio de luz y el atlas de Swanson.

IV.V Inmunohistoquímica CTB

Para visualizar CTB el protocolo fue usar un anticuerpo primario diluido 1:50.000 en suero de cabra, posteriormente un anticuerpo secundario “raised” en Burro, diluido 1:2000 por 1 h., y el kit ABC 1:500 por 1h (Vector Labs). Y luego incubación en 0,05% de níquel, 0,05% de 3,3PDiaminobenzidina (DAB) y 0,01% de solución H₂O₂ en PB por 8 m

IV.VI Lesiones excitotóxicas cruzadas

Las ratas fueron anestesiadas i.p. con Ketamina (50 mg/Kg i.p.; Imalgene, Aventis Pasteur SA, Santiago, Chile) y Xylazina (10 mg/Kg i.p.; Rompún, Bayer, Santiago, Chile). Inyecciones suplementarias de anestesia (30% de la dosis inicial) fueron administradas durante la cirugía cuando fue necesario. Al final de la cirugía las ratas recibieron una inyección de antibiótico (Floxagen 5 mg/kg, i.p., Chemie, Santiago, Chile) y analgésico (Ketofen, 0.2 mg/Kg, i.p.).

Los animales anestesiados fueron colocados en un estereotáxico, se expuso el cráneo a través de una incisión parasagital en la piel para localizar bregma. Para proceder a la lesión se realizaron 2 perforaciones con un taladro en la región prefrontal lateral (RAIC), y 2 perforaciones para la amígdala. Se introdujo una pipeta de microinyección en las coordenadas antes establecidas. Para la RAIC se inyectaron entre 45 a 65 nl totales en un hemisferio, mientras que para la amígdala se inyectaron 30nl en el hemisferio opuesto. La infusión de ácido iboténico (15µg/µL, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) fue realizada por pulsos de presión de nitrógeno utilizando un aparato Pneumatic PicoPump modelo PV800 (World Precision Instruments, New Haven, CT). El ácido iboténico es una droga excitotóxica que actuando sobre los receptores glutamatérgicos tipo NMDA, en altas

concentraciones produce muerte neuronal. El tejido dañado es reemplazado por tejido glial. El ácido iboténico tiene la particularidad de dejar intactos los axones de paso. Finalmente, la piel fue suturada con hilo quirúrgico y desinfectada con povidona yodada. Una vez recuperadas de la anestesia, las ratas fueron llevadas a la pieza de mantenimiento y dejadas en sus cajas hogar. Se les dio 10 días de recuperación antes de iniciar el protocolo de condicionamiento a miedo.

IV.VII Implantación de cánulas crónicas

Las ratas fueron anestesiadas i.p. con Ketamina (100 mg/Kg i.p.; ImalgeneTM, Rhodia Merieux, Santiago de Chile) y Xylazina (20 mg/Kg i.p.; RompunTM, Bayer, Santiago de Chile). Inyecciones suplementarias de anestesia (30% de la dosis inicial) fueron administradas durante la cirugía cuando fue necesario. Al final de la cirugía y durante los 3 días posteriores al implante, las ratas recibían una inyección de antibiótico (Enrofloxacin 5%; 19 mg/Kg i.p., Bayer, Santiago de Chile) y de anti-inflamatorio (Ketophen 0.2 mg/Kg i.p., Rhodia Merieux).

Los animales anestesiados se colocaron en un estereotáxico, se expuso el cráneo a través de una incisión parasagital en la piel y bregma fue localizado. Los ojos de la rata fueron protegidos de la deshidratación y daño agregando ungüento oftálmico. Dos cánulas guías de 26 GA de acero inoxidable (Plastics One Inc, Roanoke, VA) se implantaron bilateralmente o de manera cruzada, de acuerdo a cada protocolo, usando una fresa y dremel, siguiendo las coordenadas del atlas de Swanson (Swanson 1998) en la Corteza Insular Granular posterior (Bregma -0.51 mm, 5.0 mm de la línea media, profundidad 4.5 mm desde la superficie del cráneo y con un ángulo de 10° de inclinación), en la Corteza Insular Agranular Rostral (Bregma +2.8 mm, 4.0 mm de la línea media, profundidad 4.5

mm desde la superficie del cráneo) en la Corteza Somatosensorial Primaria (Bregma -0.46 mm, 4.5 mm de la línea media y profundidad 1.5 mm desde la superficie del cráneo) y en la amígdala basolateral (Bregma +2,45mm, 5mm de la línea media, profundidad 7mm desde la superficie del cráneo) en grupos de animales diferentes, siguiendo las coordenadas estereotáxicas del atlas de Swanson (Swanson 1998) (Tabla 1). Las cánulas se fijaron al cráneo a través de tres pernos de acero inoxidable atornillados al hueso (Figura 3), los que fueron cubiertos con acrílico dental (MarcheTM, Santiago, Chile). Una vez realizado este procedimiento, a las cánulas guías se les colocó un obturador de acero inoxidable de 33 GA (Plastics One Inc, Roanote, VA) que se proyectaba 1 mm desde la punta de la cánula, con el fin de evitar que se obstruyeran durante el desarrollo del protocolo experimental. Las cánulas y los pernos fueron esterilizados con una solución de alcohol al 70% durante 24 horas para luego pasarlos por solución salina estéril minutos antes de colocarlos en el animal. Una vez recuperadas de la anestesia, las ratas fueron llevadas a la pieza de mantenimiento y colocadas en sus cajas hogar, donde se les administraba comida y agua.

IV.VIII Inyección cortical

Para realizar la inyección cortical se sacaban los obturadores y se insertaban las cánulas de inyección de 33 GA (Plastics One Inc, Roanote, VA), acopladas a una jeringa Hamilton de 10 µl a través de un tubo de polietileno (1.27 mm de diámetro interno, Plastics One Inc, Roanote, VA) cargado con el tratamiento respectivo, en las cánulas guías. Se inyectaba entre 0,5 o 1 µl del tratamiento correspondiente durante 1 minuto en cada lado, lentamente se removía la cánula de inyección y se colocaban inmediatamente los obturadores. La cánula de inyección se proyectaba 2 mm desde la punta de la cánula guía

con lo cual accedíamos a la corteza insular, la corteza somatosensorial primaria y/o la amígdala basolateral provocando el menor daño posible.

IV.IX Perfusión transcardial y cortes seriados del cerebro.

Luego de 7 días de sobrevivencia, para aquellos animales con inyecciones de trazadores, y al final de cada procedimiento conductual para el resto, las ratas se anestesiaron con hidrato de cloral en salino al 7% (350mg/kg), y fueron perfundidas transcardialmente con paraformaldheido. La perfusión transcardial se realizaron con el animal en anestesia profunda con hidrato de cloral al 7% (Merck, Darmstadt, Alemania) diluído en suero salino en una dosis de 350mg/Kg. Se abrió la cavidad torácica y se expuso el corazón. Se realizó un drenaje sanguíneo por la aurícula izquierda mientras se introdujo una aguja de 25G truncada en su punta en el ventrículo derecho permitiendo la perfusión de 500 ml de suero salino al 0.9% por 20 minutos y luego del fijador. El fijador, paraformaldehído al 4% (Sigma, Alemania) preparado en tampón fosfato salino (PBS, pH 7,4), en un volumen de 500 ml por rata. Una vez finalizada la perfusión, el cerebro fue cuidadosamente extraído del cráneo y mantenido en el mismo fijador por 2 h, para luego ser transferido a sacarosa 30% en PBS por 2 días como criopreservante.

Una vez embebidos completamente en sacarosa, los cerebros se cortaron en su plano coronal en un micrótomos de congelación mantenidos en hielo seco a -27°C . Los cortes fueron de 50 μm de espesor. Se obtuvieron 3 series de cada cerebro, las que permanecieron en PBS con azida de sodio hasta la inmunohistoquímica o la tinción de Nissl.

IV.X Procedimientos Conductuales

Diseños experimentales para determinar la contribución del sistema interoceptivo en el condicionamiento a miedo

- i. Con el propósito de determinar si la corteza insular interoceptiva primaria participa en el aprendizaje y/o la expresión de miedo condicionado, inhibimos bilateralmente la región parietal rostral de la corteza insular, por un periodo prolongado de tiempo, y evaluamos el despliegue de la conducta de miedo frente a la clave condicionada (tono).
- ii. Con el propósito de determinar la participación en conjunto del sistema interoceptivo y la amígdala en el aprendizaje asociativo y la expresión del miedo condicionado, realizamos lesiones cruzadas excitotóxicas (***Cross-Lesion Disconnection Experiment***). Estas lesiones se localizan en la RAIC y en la amígdala en hemisferios contrarios.
- iii. Con el propósito de evaluar si la interacción entre el sistema interoceptivo y la amígdala es fundamental para establecer la consolidación de una memoria emocional, realizamos inactivaciones cruzadas transitorias (***Cross-inactivation Disconnection Experiment***). Evaluamos la expresión del miedo aprendido bajo un protocolo de extinción.
- iv. Con el propósito de evaluar si la interacción de la corteza insular y la amígdala es crucial en el inicio de un aprendizaje emocional y si influye en la expresión del miedo a largo plazo, perturbamos la consolidación del aprendizaje asociativo y

evaluamos a expresión del miedo condicionado bajo un protocolo de larga duración.

i. Diseño experimental para determinar si la corteza insular interoceptiva primaria participa en la expresión del miedo condicionado.

Para determinar si la corteza insular granular participa en la expresión del miedo condicionado, un grupo de ratas canuladas crónicamente en la corteza insular (n=13) o en la corteza somatosensorial (n=6) fueron expuestas a las cámaras condicionantes (Cámara modular operante LE1005 HARVARD Apparatus) en estas cámaras se procedió al condicionamiento a miedo.

El protocolo de condicionamiento a miedo se realizó como se detalla a continuación: los animales son colocados en las cámaras condicionantes (las cuales hemos llamado “contexto A”), después de 2-3 min. un tono (CS) de 20s (80dB, 5KHz) fue presentado e inmediatamente luego del término del tono se realizó el *foot-shock* (1mA) (US) que dura 0,5 ms. Se realizaron 5 asociaciones por día durante 2 días consecutivos. Esto permitió que la totalidad de los animales condicionados tuviesen éxito en el aprendizaje del miedo.

Al día siguiente se realizó el test de extinción, el cual consiste en evaluar la respuesta que presenta el animal frente al CS. Este test fue realizado en una habitación completamente distinta de donde se realizará el condicionamiento, en una caja de plástico (Plexiglass 38x26x15 cm) a esta habitación la hemos denominado “contexto B”. Los animales fueron puestos en esta caja transparente por dos min. Periodo después del cual se expusieron a un único tono luego de dos minutos una vez finalizado el tono los animales

son devueltos a sus *home cages*. De la misma manera y luego de 30 minutos concluido el test en el contexto B se procedió a evaluar la expresión del miedo condicionado en el Contexto A. En el test 1 solo se mide el aprendizaje en el contexto B. Todos los demás tests, del 2-11, consistieron en la evaluación del *freezing* en ambos contextos. Todos los test conductuales fueron grabados con una videocámara (Panasonic SDR-H86) para determinar con mejor precisión el tiempo de *freezing* que presentan los animales.

Los animales canulados crónicamente en la corteza insular fueron divididos en 2 grupos diferentes. El primer grupo fue inyectado con neosaxitoxina (n=7) y el segundo grupo con Salino 0,9% (n=6), un tercer grupo corresponde a los animales canulados en la corteza somatosensorial (n=6) a los cuales se les inyectó neosaxitoxina. Todas las inyecciones fueron de 1µl en un minuto por hemisferio.

Una vez finalizado el test 1 (24 hrs post condicionamiento) se procedió inmediatamente a la inyección ya sea de neosaxitoxina o salino. Finalizada esta inyección los animales eran devueltos a sus cajas hogar y dos horas después se realizó el test 2 (post-inyección intracerebral). El test 2 se realiza como se detalló más arriba, con una única exposición al tono primero en el contexto B y luego en el contexto A. El test 3 fue realizado 24 hrs post test 1 y los tests 4, 5, 6 y 7 están separados por dos días. Los test 8, 9, 10 y 11 fueron hechos con 5 días de separación. Este protocolo permitió evaluar si luego de 29 días persiste o no el aprendizaje asociativo.

ii. **Diseño experimental para determinar si la interacción del sistema interoceptivo y la amígdala es crucial en el aprendizaje y expresión del miedo condicionado.**

Con el propósito de determinar la participación del sistema interoceptivo, en el aprendizaje asociativo, realizamos lesiones cruzadas excitotóxicas (*Cross-Lesion Disconnection Experiment*), como se detalló más arriba. Los animales con lesiones en la RAIC derecha y amígdala baolateral izquierda (n=5), RAIC izquierda y amígdala baolateral derecha (n=8), amígdala basalateral izquierda (n=8) y RAIC bilateral (n=7) y sham (n=7), fueron expuestos a la cámara de condicionamiento (misma cámara que en el diseño a) después de 2-3 min. un tono (CS) de 20s (80dB) fue presentado e inmediatamente luego del término del tono se realizó el *foot-shock* (1mA) (US) que dura 1s. Se realizaron 5 asociaciones por día durante 2 días consecutivos.

Al día siguiente se realizó el primer test de extinción en una habitación completamente distinta de donde se realizó el condicionamiento (la misma que hemos denominado “contexto B” anteriormente). Los animales fueron puestos en esta caja transparente por dos minutos. Luego de dos minutos, una vez finalizado el tono, los animales son devueltos a sus *home cages*. Los test al igual que el diseño anterior, se realizaron en el contexto B y contexto A. El test 2, 3, 4 y 5 se realizaron con 24hrs. de separación. Los test 6 y 7 con 48hrs. de diferencia y el test 8 con 5 días después del test 7. Todos los test conductuales fueron grabados para determinar con mejor precisión el tiempo de *freezing* que presentan los animales. Este protocolo permite evaluar hasta 14 días después de realizado el aprendizaje del miedo.

iii. **Diseño experimental para determinar la contribución de la interacción del sistema interoceptivo y la amígdala para establecer la consolidación de una memoria emocional.**

Para el siguiente diseño experimental se modificó el protocolo de condicionamiento a miedo. Animales con cánulas crónicas para realizar la desconexión cruzada del sistema interoceptivo con la amígdala fueron expuestos a la cámara de condicionamiento en el día 1. En este día los animales son habituados con 5 tonos de 80dB, cada tono separado 1 minuto del siguiente. Posterior a la habituación se realiza el condicionamiento, que consiste en asociar 5 veces el tono de 80dB (5Khz) con un shock eléctrico que se dio en las patas, *footshock*. Inmediatamente después de la habituación y el condicionamiento los animales fueron retirados de las cajas y se les inyectó muscimol (n=20) o salino (n=8), proceso luego del cual fueron puestos en sus cajas hogar hasta el siguiente día.

En el día 2 se realizaron los test de extinción, estos se llevaron a cabo en un contexto completamente diferente y los animales son expuestos al tono de 80dB 15 veces de manera consecutiva cada 1 minuto. En el día 3 en este mismo contexto, los animales son expuestos 2 veces al tono para evaluar la recuperación.

iv. **Con el propósito de evaluar si la interacción de la corteza insular y la amígdala es crucial en el inicio de un aprendizaje emocional y si influye en la expresión del miedo a largo plazo.**

Con el propósito de evaluar si existe un vínculo entre el sistema interoceptivo y la amígdala en el aprendizaje y/o la expresión de miedo condicionado, realizamos inactivaciones cruzadas transitorias (*Cross-inactivation Disconnection Experiment*). Los

animales con cánulas crónicas en la RAIC derecha y amígdala basolateral izquierda (n=5), RAIC izquierda y amígdala basolateral derecha (n=3), fueron expuestos al condicionamiento que se ha visto en los protocolos anteriores en la misma cámara de condicionamiento (misma cámara que en el diseño a). En este protocolo, inmediatamente después de los dos días de condicionamiento, los animales fueron inyectados con muscimol (n= 8) o salino (n=5).

Al día siguiente se iniciaron los test para medir la expresión del miedo condicionado. Los test se efectuaron al igual que en los protocolos anteriores evaluando primero en el contexto B y luego en el contexto A. El test 1 se realizó 24 hrs después del condicionamiento, el test 2 con 48 hrs. post condicionamiento. Del test 3 en adelante el protocolo continúa de la misma manera que el diseño a, de tal manera que fue posible evaluar hasta 29 días después de la inyección de muscimol.

IV.XI Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico Prisma 5.0. Todos los datos conductuales fueron analizados con test t de Student o ANDEVA de medidas repetidas de una o dos vías, seguidas por los test de comparaciones múltiples Bonferroni o Dunnet. En determinados casos se realizó test ANDEVA de una vía de medidas no paramétricas (Kruskal-Wallis test)

V. RESULTADOS

V.I Primera parte: Organización de la región granular o interoceptiva de la corteza insular

Para los propósitos de esta tesis hemos analizado en detalle las conexiones córtico-corticales y córtico-subcorticales de las diferentes áreas que consideramos forman la corteza insular granular. Además y como ha sido descrito por otros autores, la corteza insular tiene considerables conexiones reciprocas con los núcleos talámicos Ventroposteriores, principalmente con los núcleos VPLpc y VPMpc. Por ello hemos decidido realizar inyecciones restringidas en estos dos núcleos para poder mapear en detalle los límites de sus aferencias.

De las inyecciones realizadas en los núcleos talámicos VPpc (n=13), dos fueron mapeadas en detalle y son mostradas a continuación. Estas inyecciones comprenden los núcleos talámicos VPLpc o VPMpc, las cuales se muestran en la figura 2 y figura 4. El volumen de infusión en todas las inyecciones fue de 2nl lo cual permitió restringir su difusión hacia otros núcleos y así estudiar adecuadamente el núcleo de interés. Debido a que este es un núcleo pequeño, el sitio de inyección se definió bajo estrictos criterios citoarquitectónicos. Para ello nosotros usamos la tinción de Nissl para mapear las relaciones espaciales del VPLpc y VPMpc con otras estructuras claramente definidas, como el lemnisco medial (ml) el fascículo retroflexus (fr), el núcleo talámico parafasciular (Pf), el núcleo talámico ventroposteromedial (VPM) y el núcleo talámico ventroposterolateral (VPL). Además inyecciones control, no mostradas aquí, en regiones talámicas cercanas (n=6) como el parafasciular (PF), Subparafasciular (SPF) y la zona incerta (Zi) producen aferencias totalmente diferentes a las realizadas en los núcleos VPpc.

V.I.I El núcleo talámico Ventroposterolateral parvocelular (VPLpc) proyecta hacia una región restringida la corteza insular granular parietal

La inyección realizada en el núcleo talámico VPLpc (Fig. 2), se encuentra 4,2 mm por detrás de bregma y está ubicada en la parte más lateral del núcleo (Fig. 2A). Se puede observar que la inyección es restringida al área de interés (Fig. 2B y 2C). Si bien es cierto la aferencia desde el VPLpc hacia la corteza insular granular ha sido descrita previamente de manera parcial (Cehceto y Saper, Yasui, Shi y Cassell), aquí estudiamos más en detalle su densidad de marca y los límites anteroposteriores de su proyección.

En la figura 3 se representa la marca de BDA a lo largo del eje antero-posterior de la corteza. La región cortical anterior tiene una marca importante en 2,8mm anterior a bregma, la cual se ubica en la capa 4 de la corteza insular (Fig. 3A). En una inyección no mostrada aquí, esta marca anterior se extiende desde 2,8 mm hasta aproximadamente 1,7 mm por delante de bregma.

Luego la marca insular disminuye hasta desaparecer, para posteriormente aumentar su densidad desde 0,45mm por delante de bregma hasta cerca de 1,33mm por detrás de bregma (Fig 3 B-K), aunque la marca más densa llega hasta 1,08mm por detrás de bregma (Fig 3I). La región más caudal de ínsula granular (aquí no mostrada) no recibe aferencias desde el VPLpc, Además hay densa marca en la corteza somatosensorial secundaria, la cual se encuentra inmediatamente dorsal a la ICg, y esta proyección acompaña a la marca de la ínsula granular desde 0,1mm por delante de bregma hasta 1,33 por detrás de bregma.



Figura 2. Inyección de trazador anterógrado BDA en el núcleo talámico Ventral posterolateral, parte parvocelular (VPLpc). En **A** Representación esquemática del sitio de inyección, ubicado 4,2 mm por detrás de bregma. **B** Fotomicrografía de la inyección de BDA la cual está restringida solo al VPLpc, principalmente la región lateral. En **C** se muestra la tinción de Nissl para el sitio de inyección junto con el Revelado para el BDA.

V.I.II El núcleo talámico Ventroposteromedial parvocelular (VPMpc) proyecta hacia la corteza insular granular rostral

La inyección realizada en este núcleo se encuentra entre 3,6mm y 3,9mm por detrás de bregma, en este caso la parte del VPMpc inyectada fue la más rostral, y parte de su marca se encuentra además en el parafascicular (Fig. 4 A, B y C). Las aferencias del Pf son conocidas y no se han descrito proyecciones hacia la región granular de la corteza insular (Sadikot y Col 1992). En la Fig. 5 se representan las proyecciones hacia diferentes áreas corticales las cuales serán divididas para su mejor explicación.

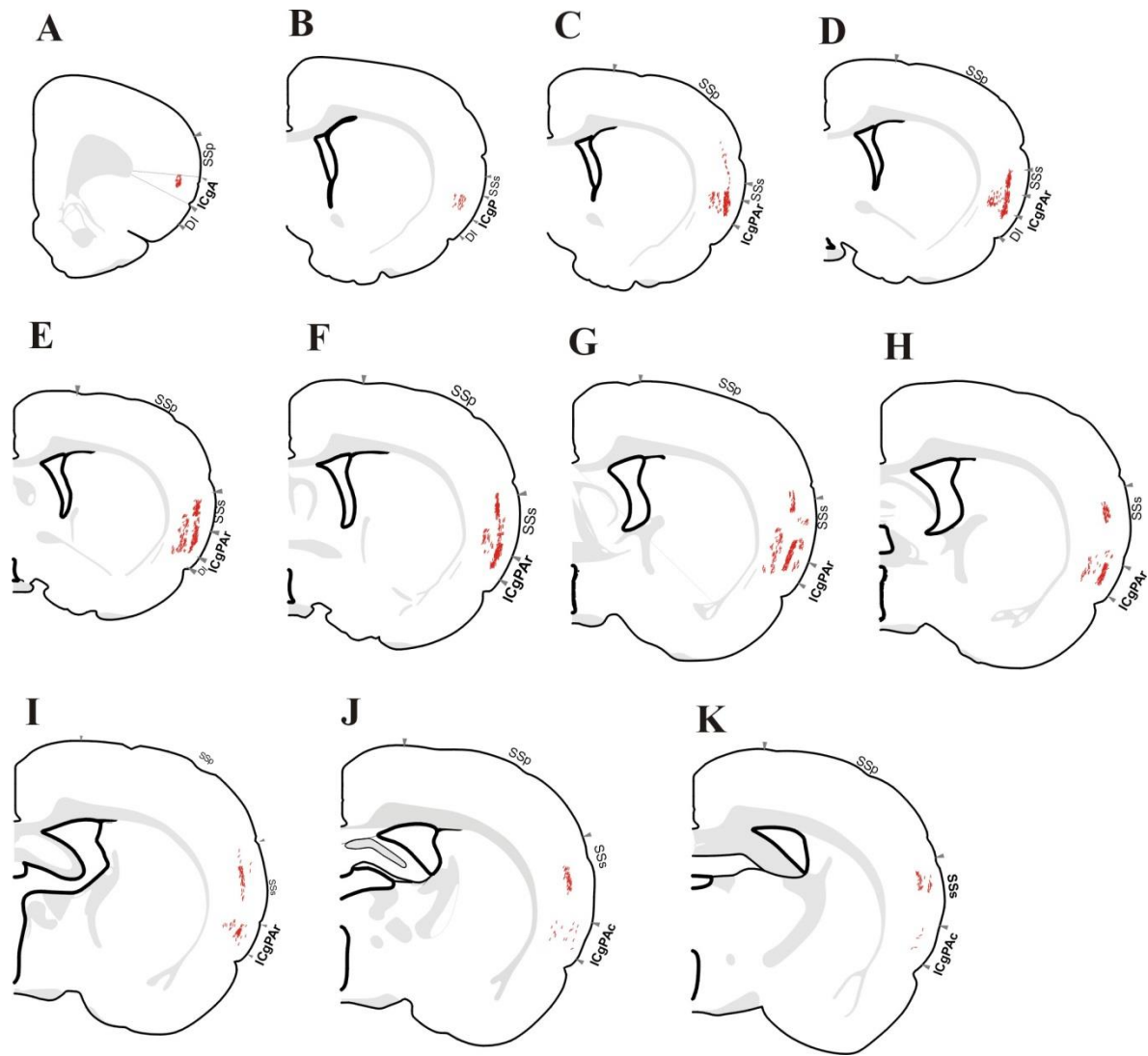


Figura 3. Representación esquemática de las aferencias provenientes del VPLpc hacia regiones de la corteza insular y somatosensorial. En A marca restringida en la zona descrita previamente como ICgA, solo hay terminales en la capa 4. (B-K) Aferencia hacia la región Parietal rostral (ICgPAR) de la corteza insular granular desde 0,45 mm anterior a bregma hasta 1,33 por detrás de bregma. La marca se encuentra principalmente en la capa 4 de la corteza. Note la diferencia en la densidad de marca que existe a lo largo del eje rostro caudal. Además hay marca en la corteza somatosensorial secundaria.

Proyecciones hacia la Corteza insular granular

Nosotros describimos la marca más rostral de la corteza insular granular a partir de 2,8mm anterior a bregma la cual se extiende con gran densidad hasta 1,45mm anterior a bregma (Fig 5 E-H), luego esta proyección disminuye mucho en densidad (Fig 5I). Aquí la marca es potente, principalmente en la capa 4 pero también encontramos aferencias en las capas más profundas de la corteza. Posteriormente esta fuerza de proyecciones desde el VPMpc aumenta, también en la capa 4 de la corteza, y la densidad se mantiene hacia niveles caudales llegando las aferencias hasta el nivel 0,0mm de bregma, como se puede ver en la figura 5 M. No existe marca hacia niveles más caudales de la corteza insular.

Proyección hacia otras cortezas: Cortezas motoras y Cortezas Somatosensoriales

La marca cortical hacia regiones motoras comienza en las zonas más rostrales de la corteza y se extienden desde 5,2mm hasta 3,6mm por delante de bregma. Estas aferencias son hacia regiones motoras secundarias MOs (Fig. 5A y 5B), las cuales se encuentran en las capas superficiales, esto es capa i ,ii y iii y en regiones corticales motoras primarias MOp (Fig. C), la cual es bastante restringida y no se extiende más allá de este nivel. Al igual que la marca en MOs en MOp también la proyección es en las capas superficiales aunque hay una fuerte proyección en la capa v .En cuanto a la corteza Somatosensorial, las aferencias fuertes se ubican en la región cortical rostral, donde hay una potente proyección hacia la SSp en 3,2mm anterior a bregma, ubicada principalmente en la capa iv.

De acuerdo a las inyecciones talámicas vistas previamente es claro notar un cierto patrón de aferencias que son enviadas desde los núcleos del VPpc hacia diferentes áreas o

regiones de la corteza insular granular. Según esto, y de acuerdo a la literatura revisada, sugerimos que es posible distinguir al menos 4 subregiones de la ínsula granular

Nosotros describimos la proyección más rostral de los núcleos VPpc hacia de la corteza insular granular como corteza insular granular anterior (**ICgA**), esto para distinguirla de otras regiones ya descritas previamente en la literatura. Esta área es inervada por ambos núcleos talámicos con mucha fuerza como se puede ver en las figuras 3 y 5. La región descrita por Shi y Cassel como ínsula posterior, la hemos descrito como corteza insular granular posterior o **ICgP**. Esta zona recibe aferencias desde el VPMpc y carece de proyecciones provenientes del VPLpc. Más caudal, está el área insular donde llegan las aferencias del VPLpc. Esta región es descrita en la literatura (con límites similares pero no iguales) como corteza insular granular parietal porción rostral (**ICgPAr**). Finalmente la región más caudal de ínsula granular, que ha sido descrita con una extensión que va desde 1,5mm detrás de bregma hasta aproximadamente 4mm caudal a bregma y que no recibe aferencias desde el VPLpc, la hemos denominado, tal como en otros artículos como corteza insular granular parietal caudal (**ICgPAc**). Todas las figuras están descritas con esta nomenclatura, la cual continuaremos argumentándola en base a las conexiones que presentan cada una de ellas.



Figura 4. Inyección de trazador anterógrado BDA en el núcleo talámico VPMpc. En **A** Representación esquemática del sitio de inyección, ubicado entre 3,6 y 3,9 mm por detrás de bregma. **B** Fotomicrografía de la inyección de BDA en el VPMpc. La región inyectada corresponde a la zona más rostral del núcleo y hay leve difusión hacia el PF. En **C** se muestra la tinción de Nissl para el sitio de inyección junto con el revelado para el BDA.

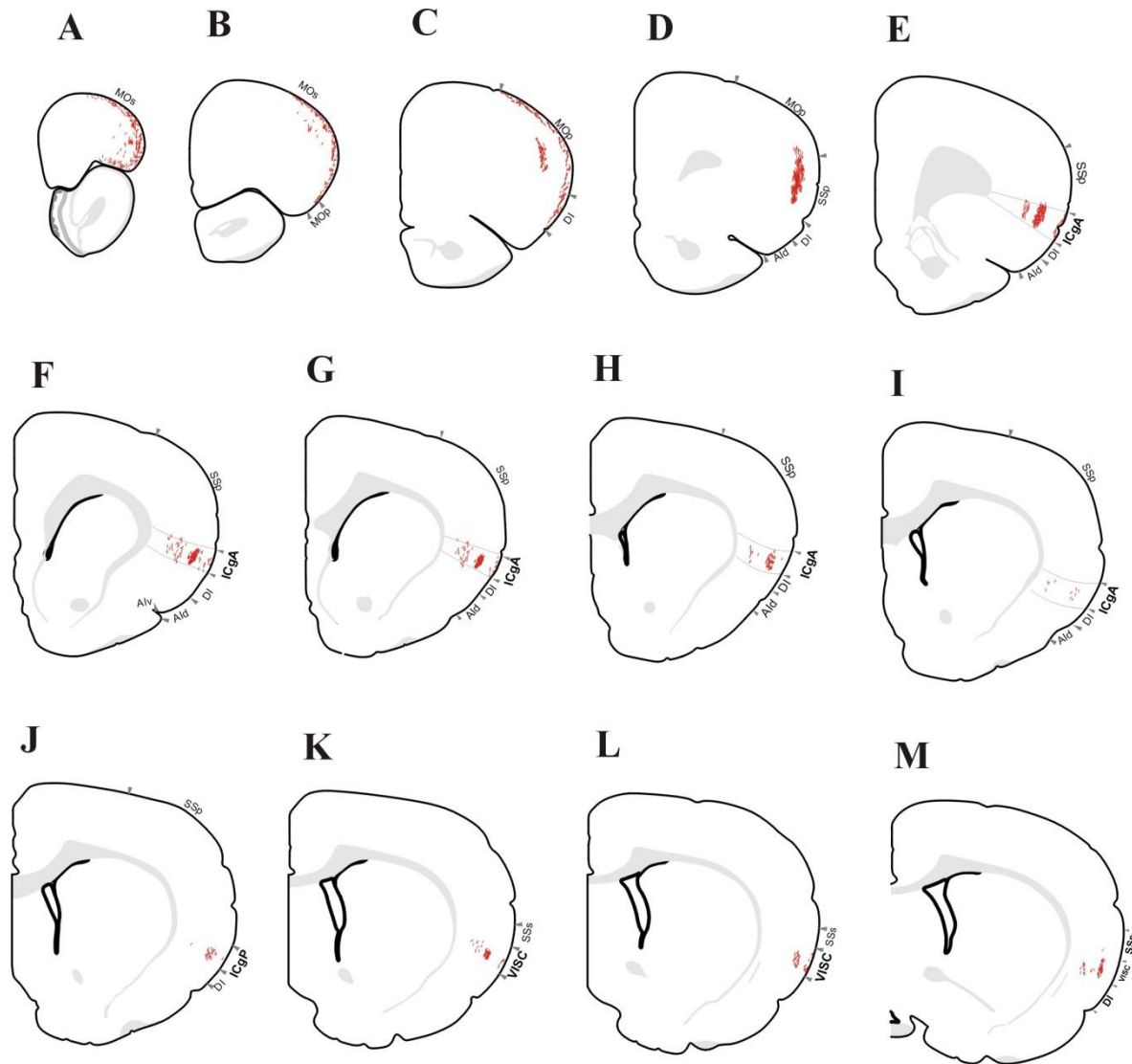


Figura 5 Representación esquemática de las aferencias provenientes del VPMpc hacia regiones de la corteza insular y somatosensorial. En **A y B** marca restringida a las capas superficiales de la corteza motora secundaria (Mos). En **C** continua la aferencia hacia regiones motoras y aparece importante marca en la capa 4. Además hay proyecciones en las capas superficiales de la región disgranular de la ínsula. En **D** densa proyección hacia la corteza SSp, en la capa 4. (E-G) Aferencia hacia la región Anterior (ICgA) de la corteza insular granular desde 2,8mm hasta 1,7mm por delante de bregma. La marca se encuentra principalmente en la capa 4 de la corteza. (H-M) Aferencias hacia la región Posterior de la corteza insular (ICgP), desde 1,2mm por delante de bregma hasta bregma.

V.I.III Las 4 divisiones de la corteza insular interoceptiva presentan un patrón de conexiones diferentes

Considerando los trabajos previos realizados principalmente por Shi-Cassel en 1998 y tomando en cuenta las características citoarquitectónicas de la corteza insular, así como las aferencias talámicas previamente descritas, hemos dividido las inyecciones en 4 sitios diferentes en el eje antero-posterior, los cuales serán detallados a continuación.

V.I.III.I *Proyecciones desde la Corteza insular granular anterior (ICgA) hacia la corteza insular, el tálamo y otras áreas corticales*

Sitio de inyección

Entre las distintas inyecciones realizadas en esta zona (n=3), hemos escogido la siguiente para esquematizar las aferencias particulares de esta región, ya que se ajustan al área que queremos estudiar lo cual permite un análisis más confiable. La zona de inyección del BDA fue en 2,8mm por delante de bregma.

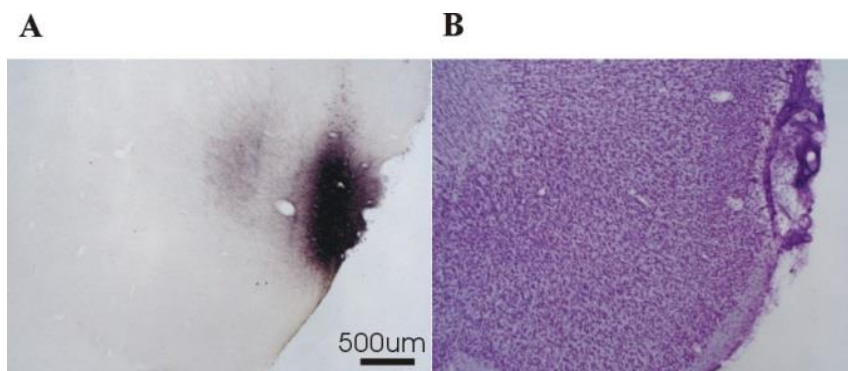


Figura 6. Fotomicrografía del sitio de inyección de BDA en la Corteza insular granular anterior (ICgA) A. Sitio de inyección en ICgA, note que la inyección de BDA está restringida sólo al área cortical mencionada y sólo abarca las capas superficiales de la corteza B. Tinción de Nissl del sitio de inyección de ICgA.

Aferencias corticales de ICgA

Las aferencias desde la región granular más anterior van hacia diferentes zonas de la corteza insular. En las zonas más rostrales se observa una débil marca en la región más caudal del de ICgA, llegando hacia las capas más profundas (Fig. 7 E, F). Además esta débil proyección se extiende ventralmente hacia la corteza insular disgranular. La proyección continúa débil hacia la corteza insular granular posterior (ICgP) y también se extiende hacia la corteza disgranular (DI) (Fig. 7 G-I), sin embargo en la parte más caudal, +0,45mm, esta marca es levemente más densa y aparece en las capas superficiales de la corteza granular (Fig. 7I).

Luego la marca cambia completamente y es más potente, ubicándose en la corteza insular granular en las capas superficiales así como en capas profundas con ausencia de proyecciones hacia la capa 4 (Fig 7 J-O). Hacia caudal, aproximadamente a la altura de bregma, la densidad se hace más fuerte y se extiende hasta 0,51 mm por detrás de bregma (Fig. 7O). La proyección hacia la región granular parietal rostral o ICgPAr, es la más densa y tiene un patrón característico de marca desde una corteza de alto orden como podría ser ICgA hacia una de menor orden o primaria que podría ser ICgPAr (proyecciones que serán comentadas en la discusión), este patrón de terminales es característico en las cortezas visuales, con ausencia de aferencias en la capa iv y muy abundantes terminales en las capas ii-iii y v,vi, (Fig. 8)

La proyección de ICgA hacia la corteza insular disgranular se va perdiendo y se extiende débilmente hasta -0,11mm. Además de las regiones corticales insulares, aparece una importante marca en regiones ventrales del CP que se extiende desde con fuerza desde bregma hasta -0,51mm.

En niveles más caudales las aferencias hacia regiones granulares y disgranulares desaparecen o son muy escasas; sin embargo, hay una importante proyección hacia la zona agranular posterior (Aip) de la corteza insular. Esta marca aparece en -0,82mm y se extiende hasta -1,53mm.

Aferencias hacia otras regiones corticales

Las aferencias hacia regiones motoras se encuentran en la parte más rostral de la corteza (Fig. 7A y 7B) y abarcan la corteza motora secundaria, y con mayor densidad se encuentran en la corteza motora primaria, en las capas 1-3 y en la capa 5. Las aferencias hacia zonas somatosensoriales son escasas, y están en la corteza somatosensorial primaria en las regiones más rostrales.

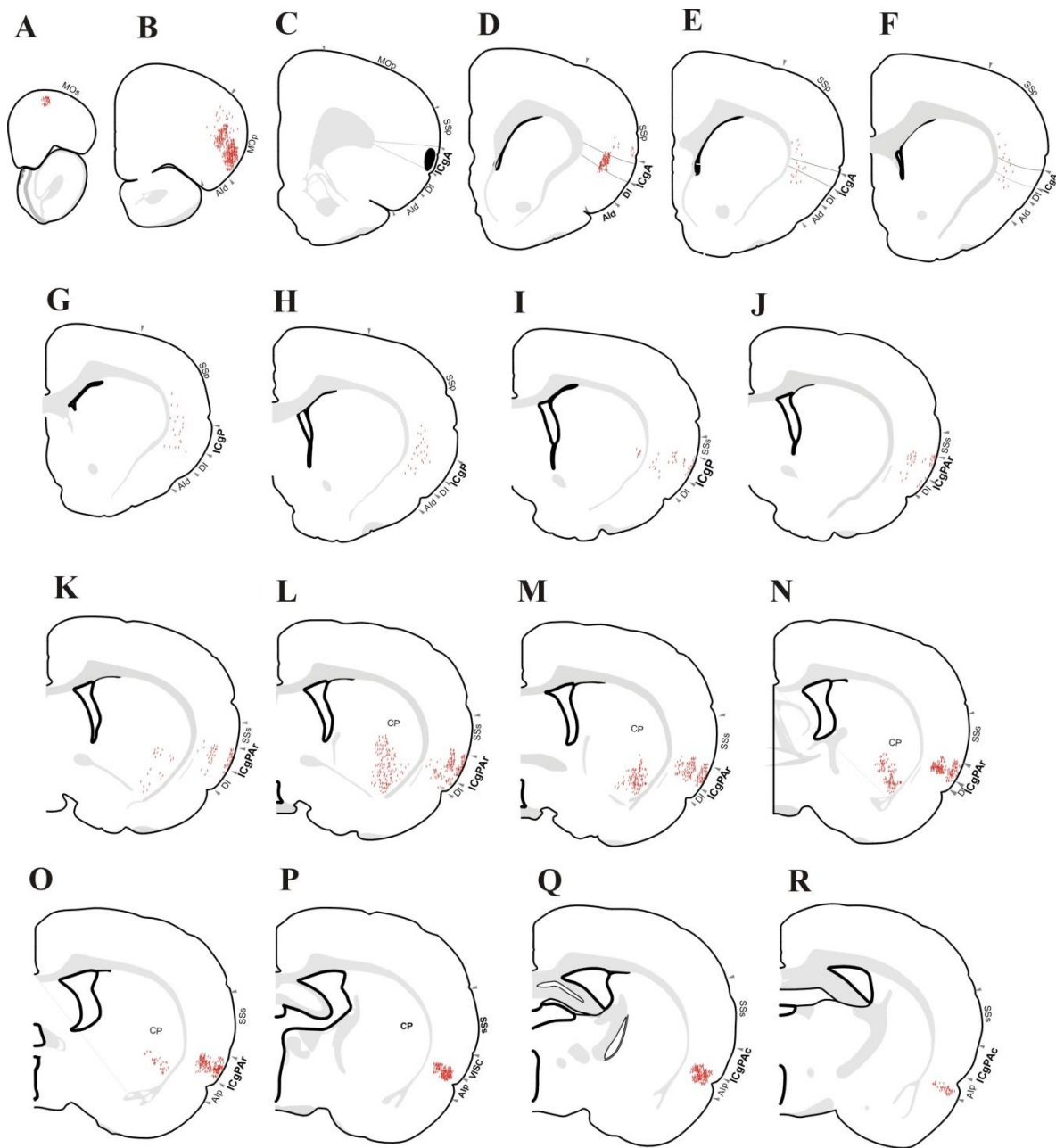


Figura 7 .Proyecciones axonales desde ICgA. Representación esquemática de la marca de BDA presente en las secciones seleccionadas a través de las diferentes áreas corticales. (A-B) Aferencias hacia regiones motoras Mop y Mos. En C Marca representativa del sitio de inyección en 2,8mm por delante de bregma mostrado previamente.(D-F) Aferencias hacia regiones más caudales de ICgA, se destaca la región cortical entre dos líneas paralelas punteadas. Las aferencias son escasas y se ubican en las capas profundas. (G-I) Aferencias hacia regiones de la ICgP. Proyecciones hacia capas profundas (J-O) Aferencias Hacia regiones ICgPAr, note el tipo de marca HO-FO. (P-R) Marca hacia regiones caudales de AIP

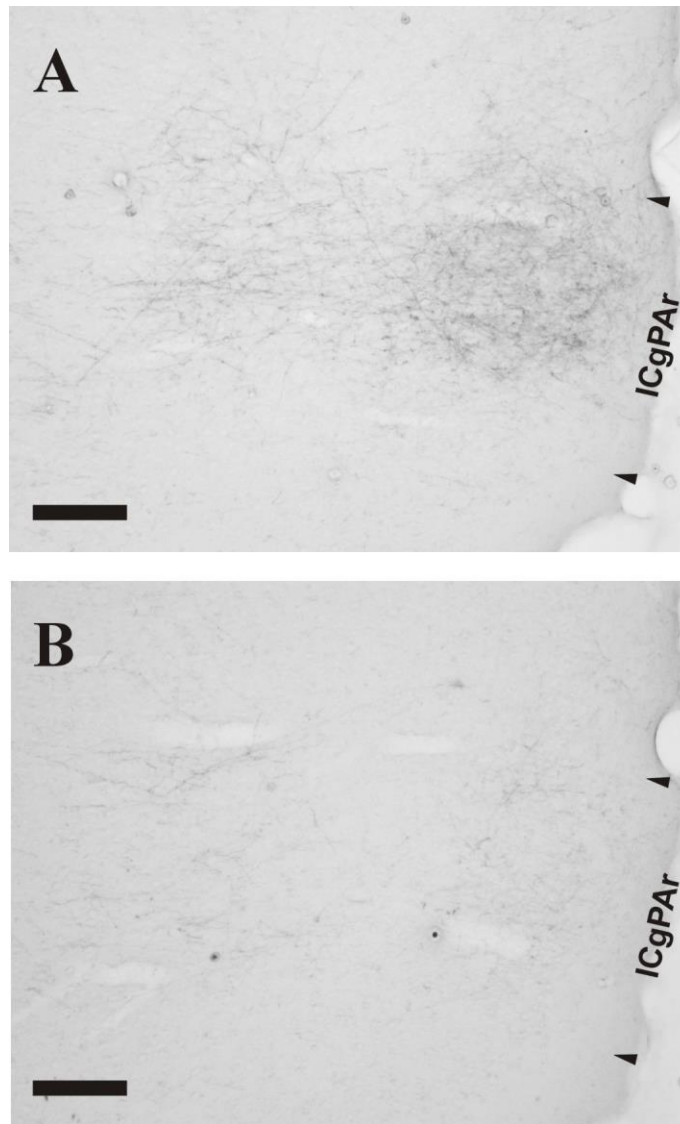


Figura 8 Fotomicrografía de las proyecciones córtico-corticales desde ICgA hacia ICgPAR ipsilateral. En **A** la marca más rostral de las aferencias hacia ICgPAR en -0,51mm, la marca es potente y se encuentra en las capas ii,ii,v y vi, menos terminales en la capa iv. Esto se aprecia mejor en **B**, donde las proyecciones son menos densas y se observa con claridad la ausencia de terminales en la capa iv. La proyección en B esta en -1,08mm. La barra en ambas fotomicrografías indica 500µm.

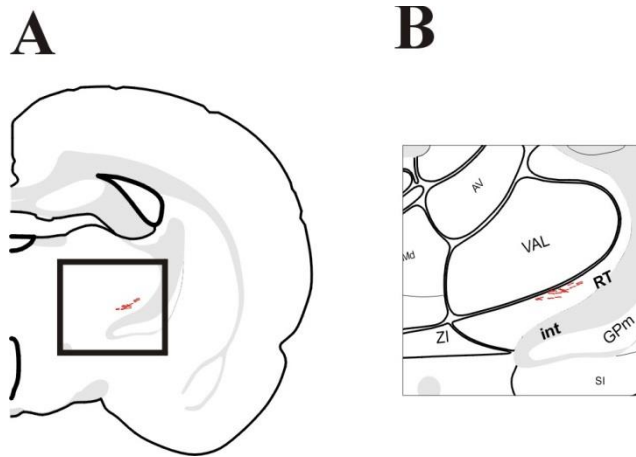
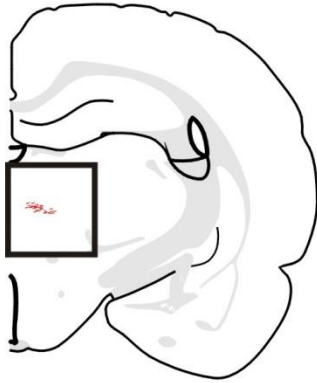


Figura 9. Esquema representativo de la aferencias presente en el núcleo reticular del tálamo (Thalamus Reticular Nucleus, RT). A Marca ubicada en 1,78 por detrás de bregma, el cuadrado encierra lo que se observa en detalle en b. **B** La marca en el RT solo se ubica en la cara interna del núcleo.

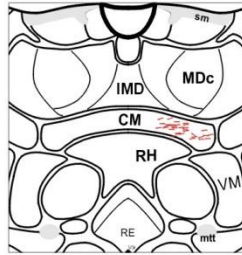
Aferencias al núcleo reticular del tálamo

La proyección hacia el núcleo reticular del tálamo (RT) se observa en la Fig. 9. Esta aferencia se encuentra en 1,78mm por detrás de bregma, y se ubica en la cara interna (Fig 9B).

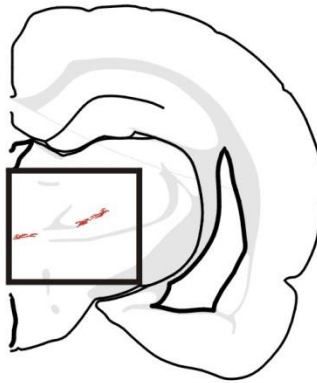
A.1



A.2



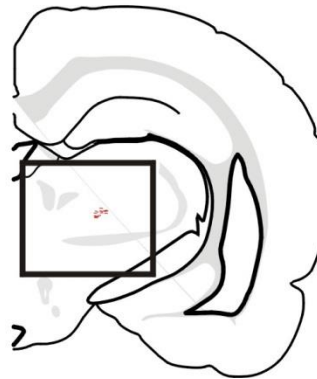
B.1



B.2



C.1



C.2

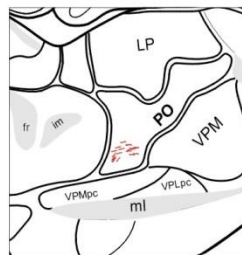


Figura 10. Representación esquemáticas de las principales aferencias talámicas desde ICgA. En **A.1, B.1, D.1** se muestra las aferencias en 3,25; 3,6 y 4,2 por detrás de bregma respectivamente. Cada figura hay un cuadrado que es representado en detalle en la columna de la derecha. En **A.1** Marca en el núcleo Central medial del Tálamo (CM). En **B.2** marca en el núcleo posterior del tálamo (PO). En **C.3** Marca en la región más caudal del PO.

Aferencias a otros núcleos talámicos

La inyección realizada en ICgA es pequeña y se encuentra situada principalmente en las capas profundas, es por esto que las aferencias hacia el tálamo son escasas y poco densas. Desde Fig. 9A.1 hasta Fig. 10C.1 se representan las proyecciones en el eje antero posterior a nivel del tálamo. En Fig. 10A.1 la marca está en 2,85mm por detrás de bregma el núcleo de la línea media CM (Fig.10 A.2). A continuación la marca se extiende hacia niveles caudales del CM (Fig.10 B.1 y 10 B.2) y aparece una marca en la región ventral del núcleo posterior del tálamo en -3,90mm, la cual se extiende hacia caudal en -4,2mm.

V.I.III.I I Proyecciones desde la Corteza insular granular posterior (ICgP) hacia la corteza insular, el tálamo y otras áreas corticales

Sitio de inyección

La región granular de la corteza insular ubicada entre 1mm rostral a bregma y 0,0 bregma ha sido descrita como la región posterior de la corteza ínsula y la zona granular más rostral (Shi y Cassel 1998; Nakashima y Col 2000). El sitio de inyección se encuentra 0,95mm por delante de bregma (Fig. 11A) y se puede apreciar que está prácticamente restringido a la zona granular de la corteza (Fig.11B y 11C), hay una leve difusión hacia dorsal, tomando levemente la corteza SSp.

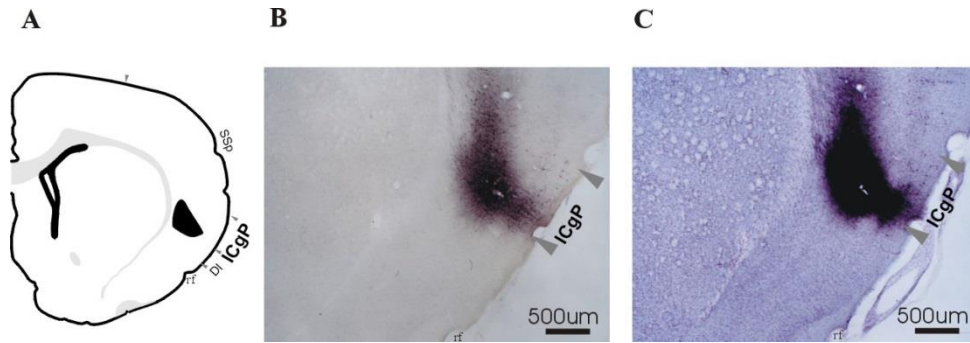


Figura 11. Inyección de trazador anterógrado BDA en la región posterior de la corteza insular granular (ICgP). En **A** Representación esquemática del sitio de inyección, ubicado 0,95mm por delante de bregma. En **B** Fotomicrografía de la inyección de BDA la cual se ubica principalmente restringida al área cortical mencionada, con leve difusión hacia la SSp. El trazador abarca principalmente las capas profundas de la corteza. En **C** se muestra la tinción de Nissl para el sitio de inyección junto con el Revelado para el BDA.

Eferencias corticales de ICgP

Las eferencia de ICgP son poco abundantes, y se dirigen principalmente hacia otras regiones de la corteza insular. Las proyecciones más rostrales, que se pueden mapear, están cerca del límite rostral de ICgA y en la corteza somatosensorial (Fig. 12A). En ICgA esta marca es leve, y se restringe prácticamente a la capa i con unas pocas proyecciones a capas más profundas. Las aferencias se extienden hasta el límite caudal con mayor densidad, 1,2mm por delante de bregma (Fig. 12C). Aunque la capa cortical más densamente marcada sigue siendo la capa i, hay una importante marca entre las capas ii-iii y iv; esta aferencia es confusa ya que además hay marca retrógrada (no mostrada) la cual presenta axones que se proyectan hacia otras áreas. Otro factor que puede agregar dificultad para determinar si son

proyecciones desde ICgP, es la cercanía con el sitio de inyección, ya que se encuentra tan solo 0,3mm por delante de este. Siguiendo axones desde las capas profundas no encontramos que alguno de estos terminaran en capas ii-iii o iv, por lo que nuestra inclinación es que estos terminales no provienen desde el sitio de inyección. También hay terminales en las capas profundas, las cuales determinamos que sí provienen del sitio de inyección.

En regiones caudales al sitio de inyección la proyección más relevante es hacia la corteza insular agranular posterior (AIp), que se encuentra restringida en 1,08mm por detrás de bregma (Fig. 12J y Fig. 13). No encontramos aferencias hacia la región ICgPAr (Fig. 12H, 11I), sólo una leve marca retrógrada. Así mismo no hay proyecciones desde ICgP hacia la región granular más caudal. Otra aferencia importante es hacia regiones ventrales del CP, las cuales se encuentran restringidas desde 1,33mm hasta 1,53mm por detrás de bregma (Fig. 12K Y 12L)

Aferencias hacia otras áreas corticales

Las proyecciones hacia otras áreas corticales son pocas, y están restringidas solamente a la corteza somatosensorial. La marca hacia SSp se extiende desde +2,8mm siendo densa en las capas superficiales esta capa i, ii y iii, hasta +1,2mm donde los terminales también se extienden hacia capas más profundas como la capa v.

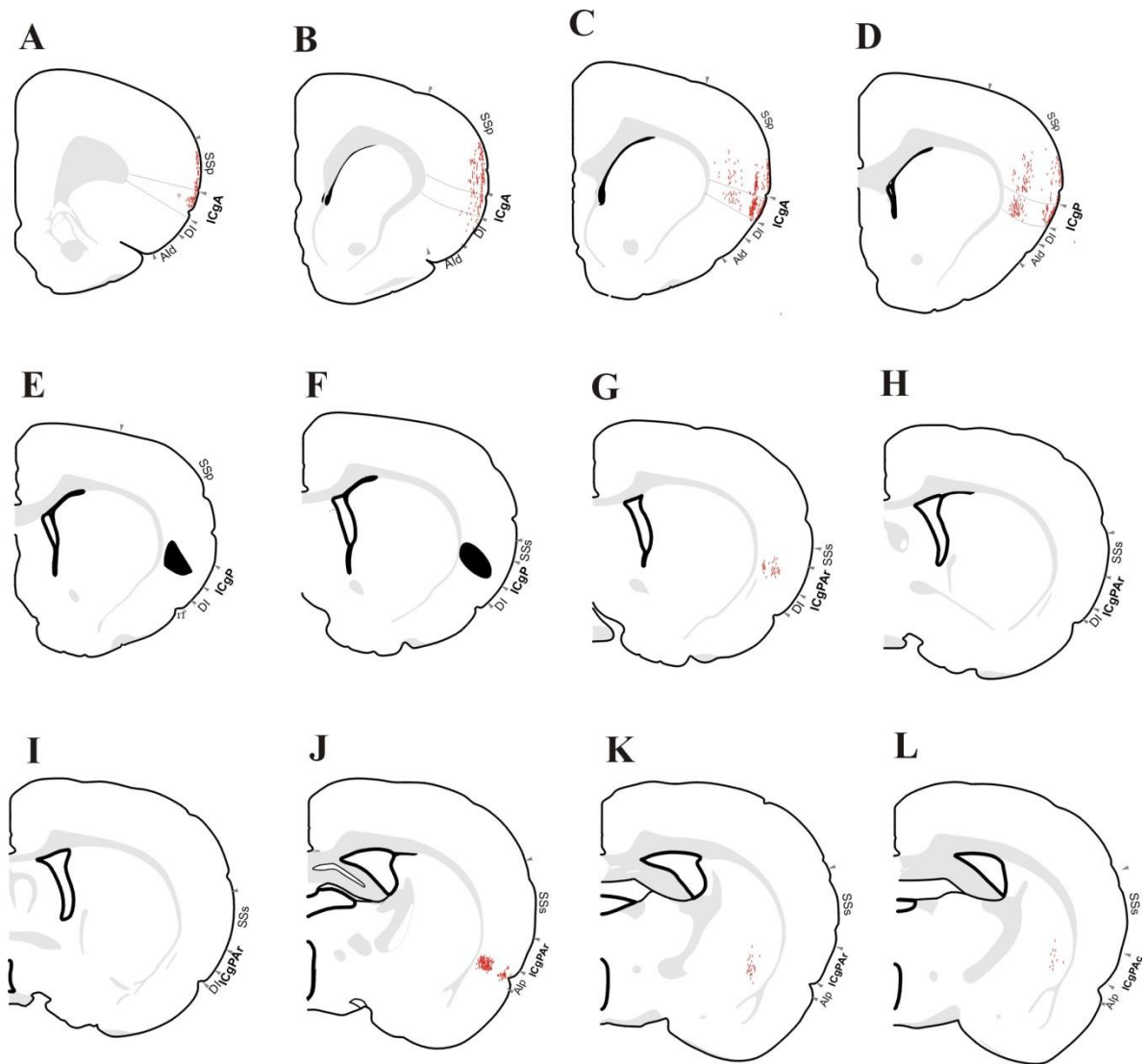


Figura 12. Representación esquemática de la marca de BDA presente en las secciones seleccionadas a través de las diferentes áreas corticales. **(A-D)** Aferencias hacia la corteza insular granular anterior (ICgA) y corteza somatosensorial primaria (SSp), en A y B principalmente las proyecciones son hacia las capas superficiales, 1.2 y 3 de la ínsula granular. En C y D la marca hacia la ICgA también es superficial. En E y F, marca representativa del sitio de inyección mostrado previamente.(G-K). En L se representa proyecciones hacia el núcleo Caudado Putamen (CP).

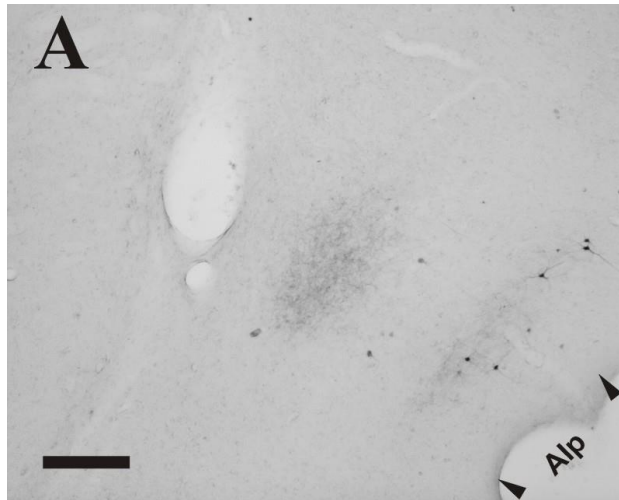


Figura 13. Fotomicrografía de la proyección córtico-cortical desde ICgP hacia AIp. En **A** marca de las aferencias hacia AIp en -1,08mm, la marca se encuentra únicamente en esta región. La barra en la esquina inferior izquierda de la fotomicrografía indica 500µm.

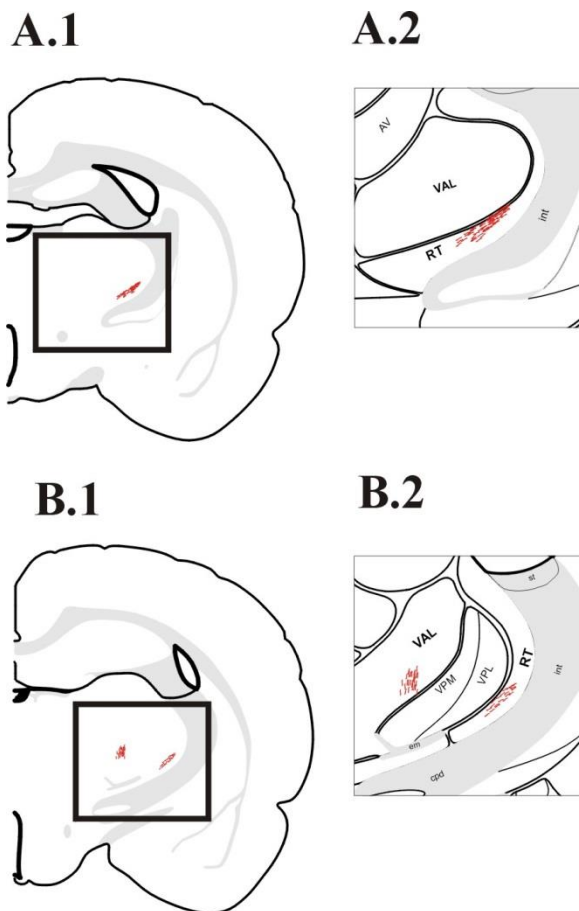


Figura 14. Esquema representativo de la aferencia presente en el núcleo reticular del tálamo (Thalamus Reticular Nucleus, RT) provenientes de ICgP. A.1 Marca ubicada en 1,78 por detrás de bregma, el cuadrado encierra lo que se observa en detalle **en A.2** . En **B.1** la marca se encuentra a 2,85mm por detrás de bregma, al igual que en **A.1** el cuadrado encierra lo que se observa en detalle en **B.2** en el RT solo se ubica en la cara interna del núcleo. Note que la marca se extiende solo en la cara interna del RT.

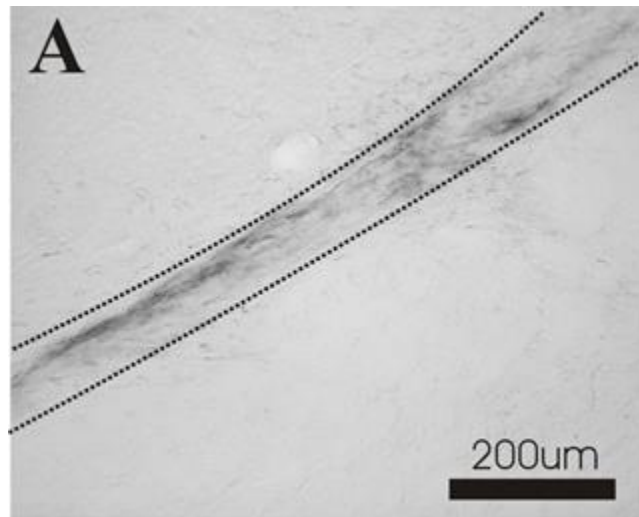
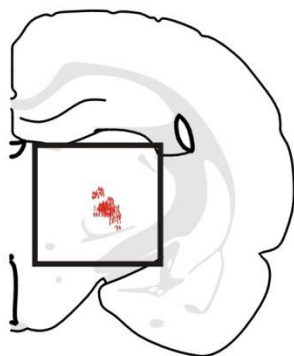
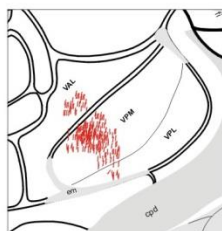


Figura 15. Fotomicrografía de la proyección desde ICgP hacia el núcleo RT visto en la Fig. 14. En A marca de las aferencias hacia la cara interna del RT en 2,85mm por detrás de bregma

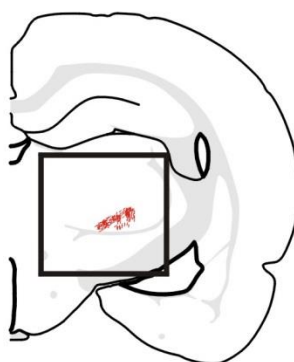
A.1



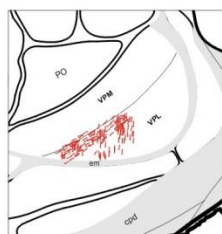
A.2



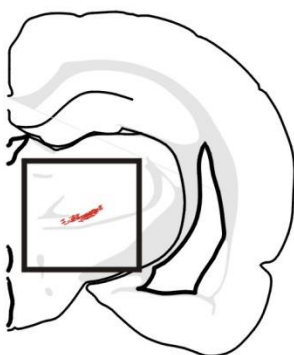
B.1



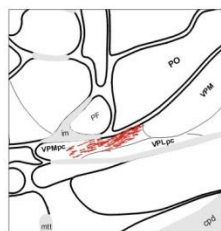
B.2



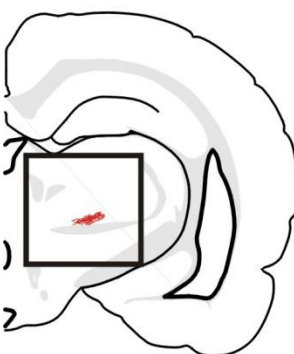
C.1



C.2



D.1



D.2

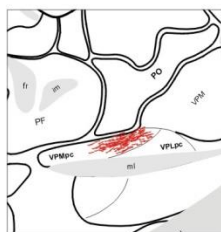


Figura 16. Representación esquemática de las principales aferencias talámicas desde ICgP. En **A.1,B.1,C.1,D.1** se muestra las aferencias en 3,25;3,6; 3,9 y 4,2 por detrás de bregma respectivamente. En cada figura hay un cuadrado que es representado en detalle en la columna de la derecha. En **A.1** Marca en ellos núcleos Ventroposteromedial y Ventroposterolateral del tálamo (VPM yVPL), además una leve marca en complejo talámico ventral anterior lateral. (VAL). .En **B.2** Densa marca solo en el VPL. Tanto en **C.2** y **D2** se observa marca exclusiva en el núcleo ventral posteromedial, parte parvocelular (VPMpc).

Aferencias al núcleo reticular del tálamo

La proyección desde la ICgP hacia el núcleo reticular del tálamo se observa en la Fig. 14. Esta aferencia tiene una extensión que comienza en -1,78mm (Fig. 14 A.1) hasta -2,45mm e bregma (Fig. 14 B.1). Esta proyección se restringe hacia la cara interna del R como se observa en la fotomicrografía en la Fig 15.

Aferencias hacia núcleos talámicos

Las proyecciones hacia el tálamo desde ICgP son diversas y llegan a diversos núcleos. Las proyecciones talámicas más rostrales llegan a los núcleos VAL, VPM y VPL (Fig. 16 A.1) y están en 2,85mm por detrás de bregma. De estos núcleos el que presenta mayor densidad es el VPM, marca que se extiende caudalmente hasta -3,6mm (Fig. 16 B.1 y 16 B.2) Regiones más caudales del tálamo muestran aferencias al núcleo VPMpc (Fig. 16 C.1 y 16 D.2), esta marca es bastante potente y se extiende hacia la parte más caudal en 4,2mm por detrás de bregma (Fig. 16 D.1 y 16 D.2)

V.I.III.IV Proyecciones desde la Corteza insular granular Parietal rostral (ICgPAr) hacia la corteza insular, el tálamo y otras áreas corticales

Sitio de inyección

La región granular de la corteza insular ubicada entre bregma 0,0mm y 3mm por detrás de bregma ha sido descrita como la región parietal de la corteza insular rostral (Shi y Cassel 1998). La región más rostral, la corteza insular parietal rostral (ICgPAr), ha sido descrita citoarquitectónicamente y en relación a otras áreas de cerebro, como una región que va desde bregma hasta 1,53mm por detrás de bregma. Es por ello que la inyección realizada en la Fig. 17, se encuentra en -0,51mm. Se puede apreciar que esta inyección de BDA está en la zona granular de la corteza (Fig.17B y 17C).

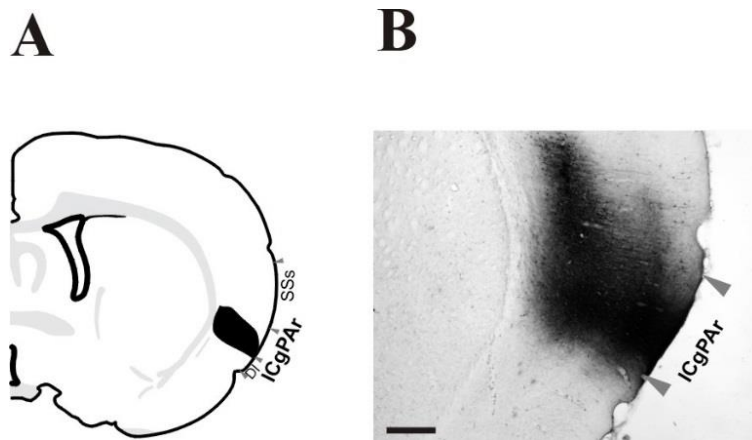


Figura 17. Inyección de trazador anterógrado BDA en la región parietal rostral de la corteza insular granular (ICgPAr). En **A** Representación esquemática del sitio de inyección, ubicado 0,26mm por detrás de bregma. En **B** Fotomicrografía de la inyección de BDA,

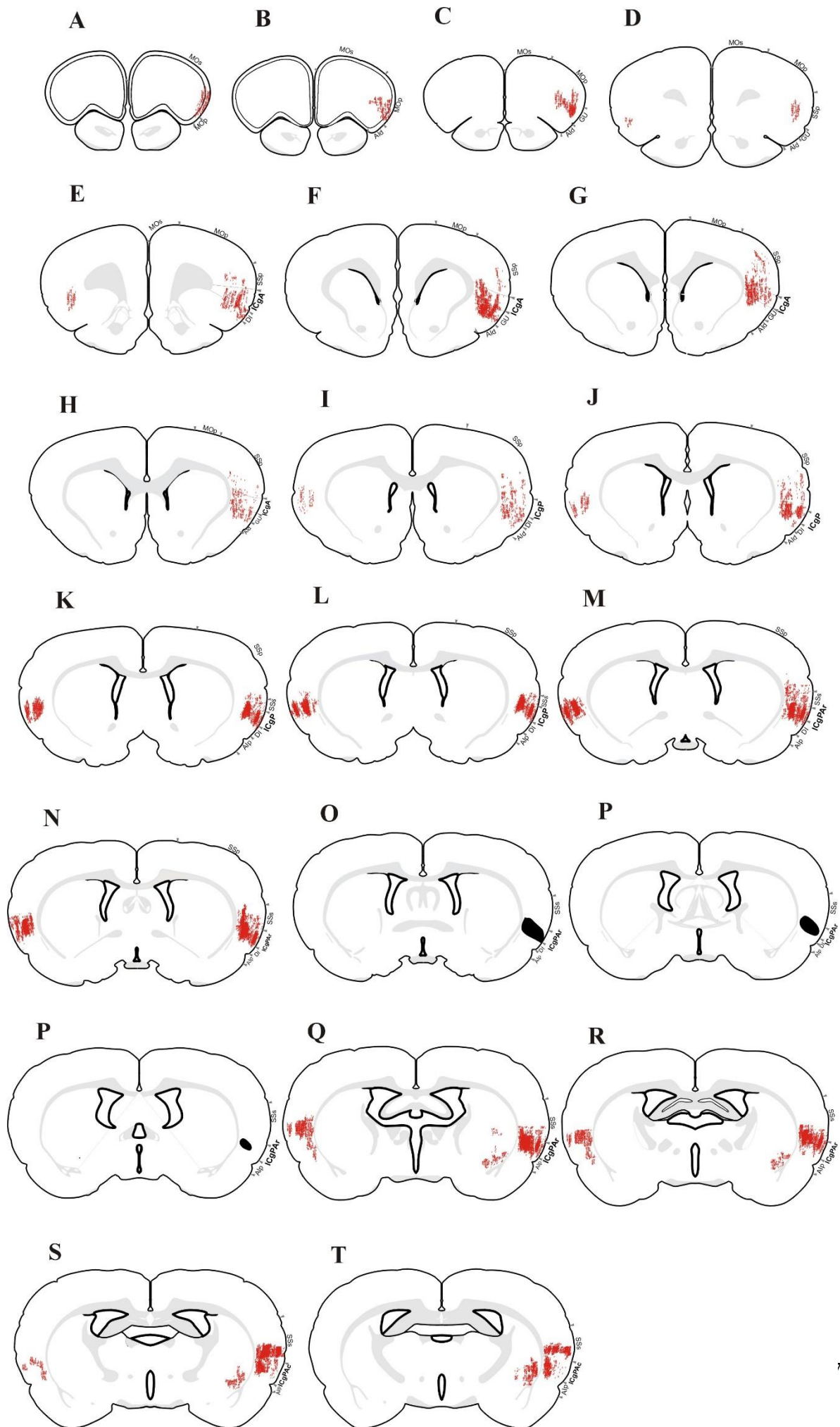


Figura 18. Proyecciones corticales de ICgPAr, esquemas representativos de la marca de BDA presente en las secciones seleccionadas a través de las diferentes áreas corticales. A y B Aferencias hacia la corteza insular disgranular anterior y corteza somatosensorial primaria (SSp) respectivamente. En **C y D** Proyección hacia ICgA, principalmente en la capa 4. También hay aferencias hacia Ssp. En **E** marca hacia zonas más rostrales de ICgPAr, principalmente capas profundas. En **F** sitio de inyección mostrado previamente. **G y H** Aferencias entre la misma ICgPAr, principalmente capas profundas.

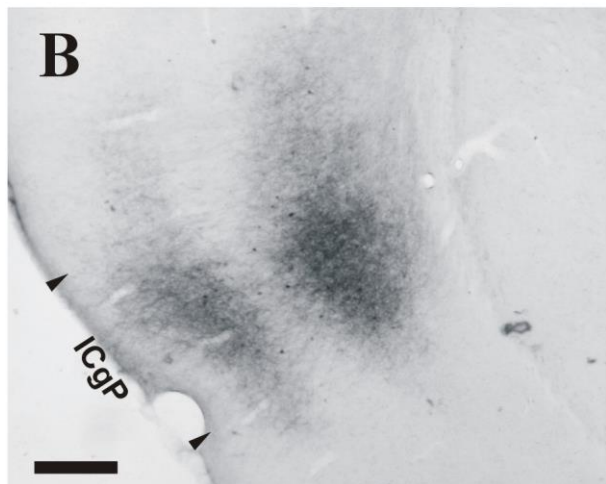
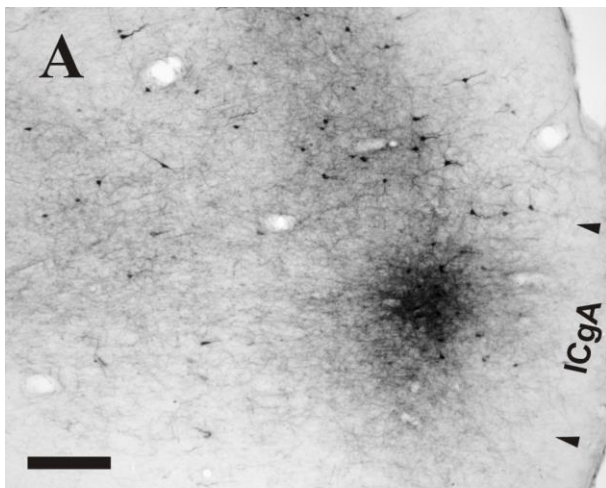


Figura 19. Fotomicrografías de las proyecciones de la región ICgPAr hacia otras subdivisiones de la ínsula granular. En **A** se observa las aferencias hacia una restringida área de la región anterior de la ínsula granular (ICgA) en +2,8mm. Esta marca es densa y limitada prácticamente a la capa iv y menos densa en las capas profundas. En **B** aferencias hacia la región posterior de la ínsula granular (ICgP) en 0,0mm. Se observa que los terminales llegan a las capas superficiales i, ii-iii y la las capas profundas v y vi, con ausencia de proyecciones en la capa iv. La barra de la esquina inferior izquierda indica 500µm.

Eferencias corticales de ICgPAr

Las eferencias desde ICgPAr son poco abundantes, y se dirigen principalmente hacia regiones frontales de la corteza insular granular. Las proyecciones más rostrales, que se pueden mapear, están cerca del límite rostral de ICgA y en la corteza somatosensorial (Fig. 18A). En ICgA esta marca es leve, y se restringe prácticamente a la capa iv con escasas proyecciones hacia las capas profundas (Fig.19 A), siendo un ejemplo de proyecciones desde una corteza de primer orden (FO) hacia una corteza de alto orden (HO). La marca en ICgA va desde 2,8mm por delante de bregma hasta +1,7mm (Fig. 18 B-D). En regiones más caudales de la ínsula la marca se extiende hacia la región posterior de la ínsula granular (ICgP), estas aferencias son ipsi- y contralaterales, y en el lado contralateral se observa un patrón de aferencias en las capas superficiales y profundas, con ausencia de marca en la capa iv (Fig. 19 B), completamente diferente de la marca hacia ICgA. Estos patrones de marca sugieren un orden jerárquico diferente de las proyecciones de ICgPAr, aunque no hay proyecciones de vuelta desde ICgP, lo cual deja en duda si existe una organización jerárquica de estas dos cortezas o son ambas viscerales primarias que representan una viscerotopia diferente. Hacia caudal las proyecciones son leves y se

aprecia en las capas profundas a niveles un poco más caudales del sitio de inyección, lo cual también puede ser por la difusión del BDA. Esta marca caudal se extiende hasta 1,33 mm por detrás de bregma (Fig. 18H).

Aferencias hacia otras áreas corticales

Las proyecciones hacia regiones corticales no insulares son escasas. La marca hacia SSp se extiende en niveles rostrales desde +3,2mm siendo esta proyección principalmente en la capa iv, la cual se extiende hasta 1,7mm por delante de bregma (Fig. 18 B-D). La ICgPAr proyecta hacia la corteza SSs, aunque su marca es muy leve (Fig. 18E), también hay aferencias escasas hacia la región insular disgranular más rostral.

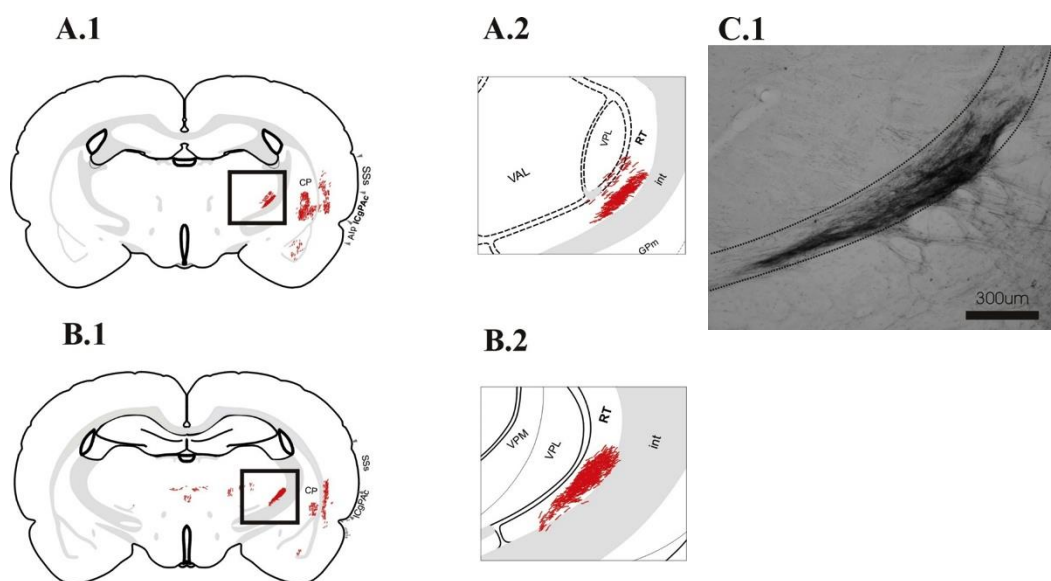


Figura 20. Esquema representativo de la aferencias presente en el núcleo reticular del tálamo (Thalamus Reticular Nucleus, RT) provenientes de ICgPAr .A.1 Marca ubicada 2,00mm por detrás de bregma, el cuadrado encierra lo que se observa en detalle en **A.2** .**B.1** La marca se encuentra 2,45mm. por detrás de bregma, al igual que en **A.1** el cuadrado encierra lo que se observa en detalle en **B.2**. Note que la marca en **A.2**, **B.2**, y se extiende solo en la cara externa del RT. **C.1** fotomicrografía en -2,25mm del RT.

Eferencias al núcleo reticular del tálamo

La proyección desde la ICgPAr hacia el núcleo reticular del tálamo se observa en la Fig. 20. Esta eferencia tiene una extensión que comienza en -1,78mm (Fig. 20 A.1 y A.2) - 2,00mm (Fig. 20 B.1 y B.2) hasta -2,45mm de bregma. Esta proyección se restringe en la cara externa del RT (Fig. 20 C.1)

Eferencias hacia núcleos talámicos

Las proyecciones hacia el tálamo desde ICgPAr son diversas. Las proyecciones talámicas más rostrales llegan a los núcleos CM, VAL, VPM y VPL (Fig. 21 A.1 y A.2) y están en 2,85mm por detrás de bregma. De estos núcleos el que presenta mayor densidad es el VPL, marca que se extiende caudalmente hasta -3,25mm (Fig. 21 B.1 y 13 B.2) Regiones más caudales del tálamo muestran aferencias al núcleo VPLpc (Fig. 21C.1 y 13 D.2 y Fig. 22A), esta fuerte y densa marca se extiende hacia la parte más caudal en 4,2mm por detrás de bregma (Fig. 21 D.1 y 13 D.2). Además hay aferencias hacia el núcleo Posterior del tálamo, la marca más rostral representada aquí comienza en -3,25, sin embargo la marca de VAL podría ser una extensión rostral del PO.

Es importante destacar que las aferencias hacia los núcleos talámicos pueden ser diversas y dar cuenta de una organización jerárquica del flujo de información.

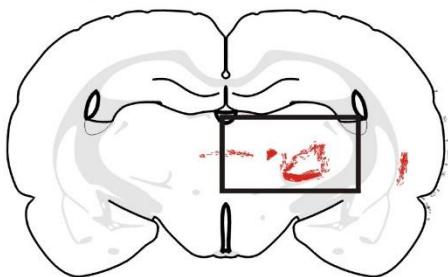
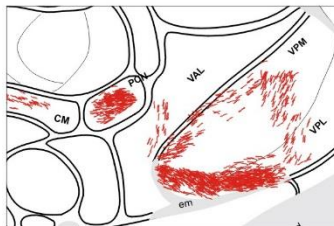
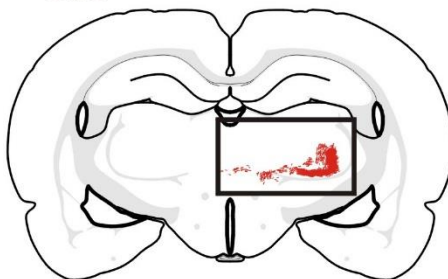
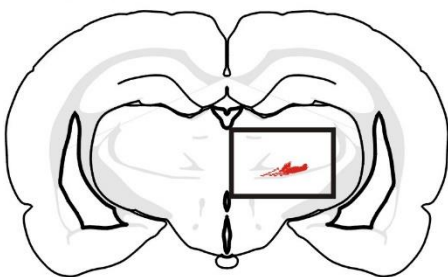
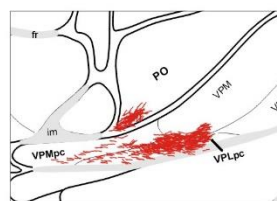
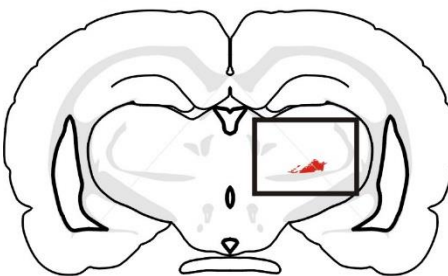
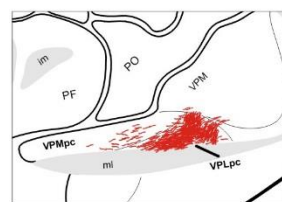
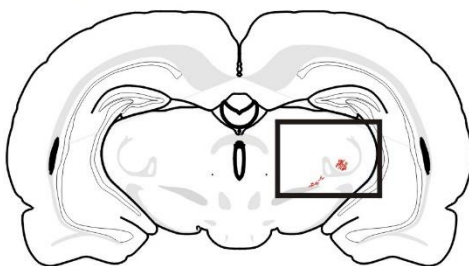
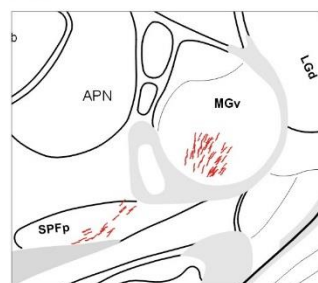
A.1**A.2****B.1****B.2****C.1****C.2****D.1****D.2****E.1****E.2**

Figura 21. Representación esquemática de las principales aferencias talámicas desde ICgPAr. En **A.1, B.1, C.1, D.1** se muestra las aferencias en 2,85; 3,6; 3,9 y 4,2 por detrás de bregma respectivamente. En cada figura hay un cuadrado que es representado en detalle en la columna de la derecha. En **A.1** Marca en los núcleos VPL y VAL, además una leve marca en VPM. En **B.1** Densa marca solo en el VPL y leve marca en PO. **C1** Fuerte Maca en VPLpc y leve mara en PO. Y **D1** marca exclusiva en **VPLpc** Tanto en **C.2 y D2** se observa marca exclusiva en el núcleo ventral posterolateral, parte parvocelular (VPLpc).

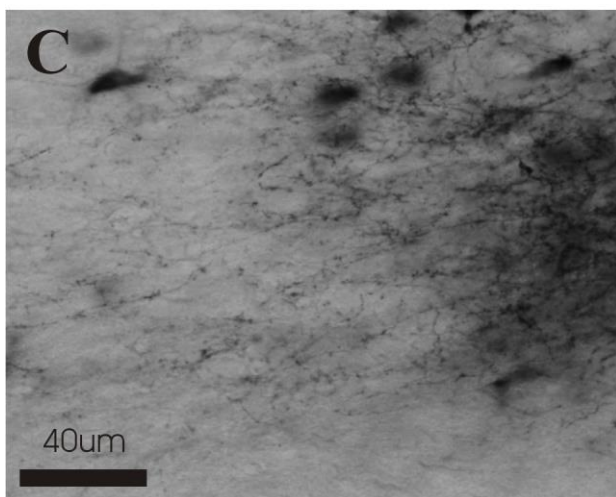
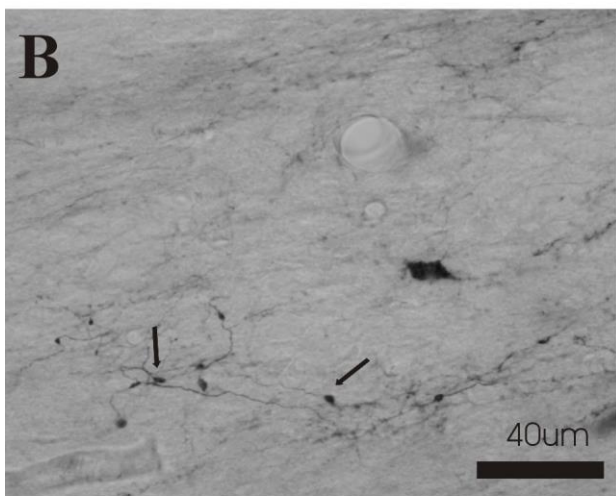
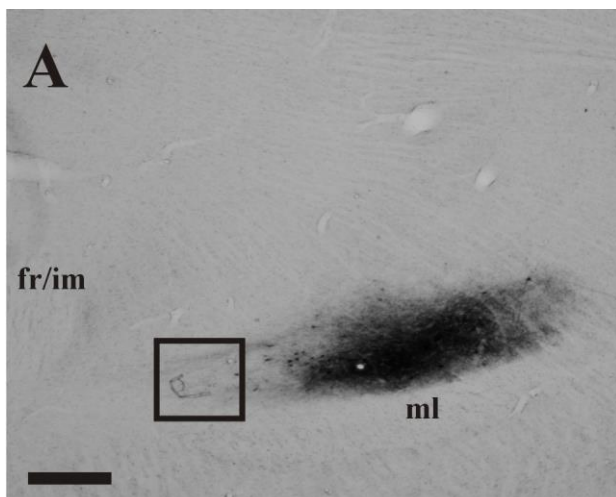


Figura 22. Fotomicrografías de las proyecciones hacia el núcleo talámico VPLpc desde ICgPAr. En **A** la aferencia es densa en el núcleo VPLpc, de acuerdo a su ubicación en referencia a estructuras como el lemnisco medial (ml) y el fascículo retroflexus (fr), se puede observar que las aferencias se extienden medialmente hacia el núcleo VPMpc, el cual se ha encerrado en un cuadrado. La barra en la esquina inferior izquierda indica 500µm. En **B** los terminales que se observan en VPMpc son de gran tamaño (indicados con la flecha), y son denominados de primer orden. En **C** Terminales en el límite entre el VPMpc y VPLpc, estos son más abundantes y de pequeño tamaño, además se advierte un cambio en la organización de las aferencias.

Figura 23. Fotomicrografías de las proyecciones hacia el núcleo talámico Central medial (CM) desde ICgPAr. En **A** la aferencia hacia el núcleo CM es fuerte y tiene una organización horizontal característica, en el cuadrado se encierra un área que contiene terminales de primer orden los cuales se observan en **B**, estos terminales (uno indicado con la flecha) no son abundantes y están restringidos a determinadas aferencias de la corteza ICgPAr.

V.I.III.V La Corteza insular granular posterior recibe aferencias desde la corteza insular granular anterior y desde el VPMpc

Para evaluar las proyecciones que recibe esta corteza, hemos inyectado el trazador retrógrado CTB en +0,95mm, en la corteza insular granular posterior (Fig. 24 A, B y C)

Las aferencias que recibe esta zona de la ICgP, provienen de regiones motoras, como MOs (Fig. 25 A y B) y MOp (Fig. 25 C, D y E). También recibe aferencias desde la corteza somatosensorial primaria, marca retrógrada que se extiende desde +3,2mm la cual es bastante densa en esta zona, hasta +1,45mm con una muy baja densidad.

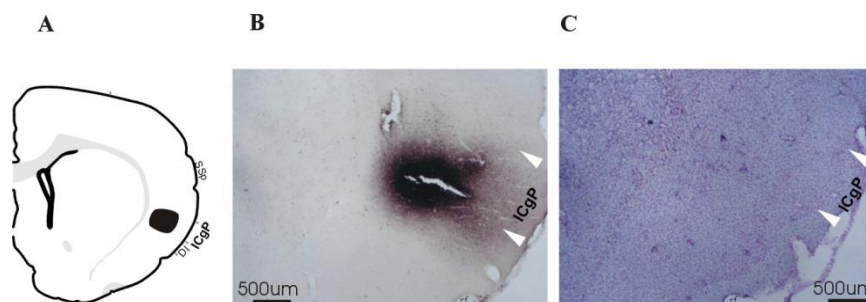
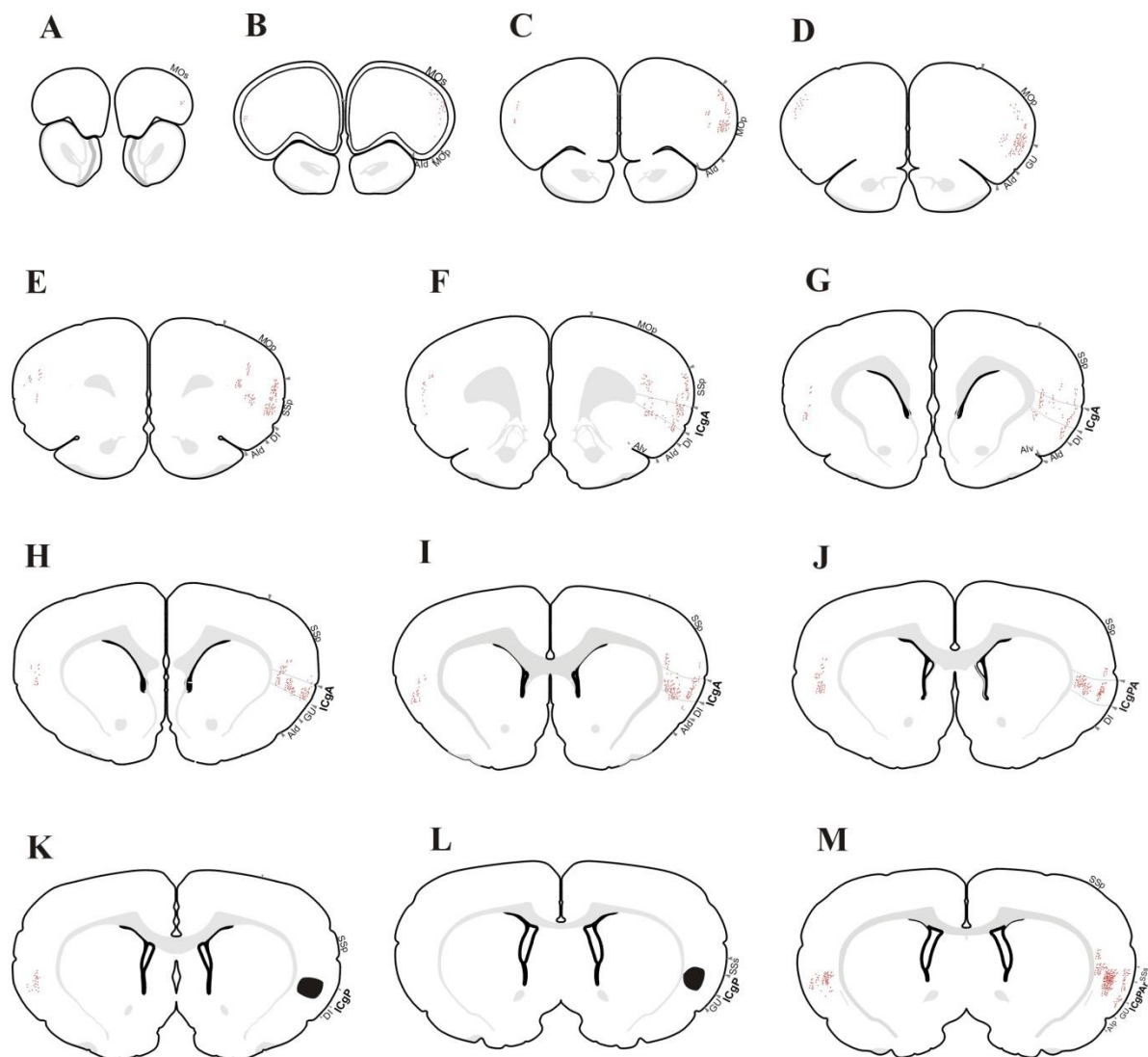


Figura 24. Inyección de trazador retrógrado CTB en la región posterior de la corteza insular granular (ICgP). A. Representación esquemática del sitio de inyección, ubicado 0,95mm por delante de bregma. B. Fotomicrografía de la inyección de CTB la cual se encuentra restringida a ICgP. El trazador cubre las capas corticales más profundas. En C se muestra la tinción de Nissl para el sitio de inyección junto con el revelado para el CTB.

Las regiones de la corteza insular granular que proyectan hacia ICgP son la región ICgA, la cual presenta una marca retrógrada que va desde +2,8mm hasta +1,45mm (Fig. 25 F-I). Las neuronas marcadas con CTB se encuentran principalmente en las capas ii, iii y v.

Una región que proyecta con más fuerza hacia ICgP es la región rostral de la corteza insular granular parietal (ICgPAr). Esta zona de la ínsula granular, presenta una importante marca retrógrada desde la región de bregma 0,0mm hasta la 0,82mm por detrás de bregma. (Fig. 25. N-S). Las capas corticales que se ven más densamente marcadas son las ii,iii, v y vi.



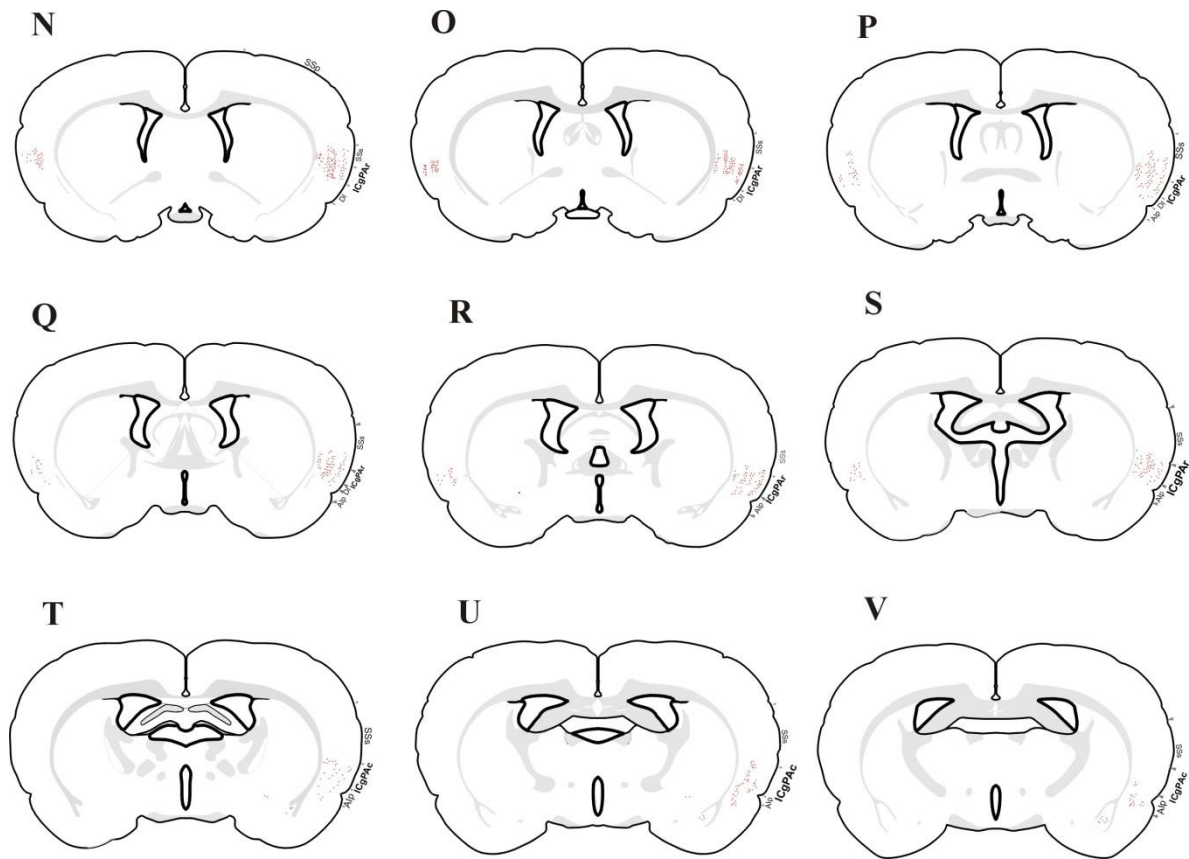


Figura 25. Representación esquemática de la marca de CTB presente luego de la inyección en ICgP, en las secciones seleccionadas a través de las diferentes áreas corticales. A-C Aferencias desde las regiones corticales anteriores principalmente desde las capas superficiales de regiones motoras. En **D** marca en corteza insular disgranular, capa 4. En **E** aferencia proveniente desde la región más rostral desde la SSp. **F-H** Secciones representativas de la ICgA. La marca principalmente de capas profundas y superficiales, escasa marca en capa 4. En **I-J** marca hacia adelante en la región del sitio de inyección, mayor marca en la capa 4. **K y L** Esquemas representativos del sitio de inyección. **M-S** Aferencias provenientes desde la región Parietal rostral de la corteza insular granular (ICgPAr) La marca es fuerte y se encuentra en las capas 5-6 y 2-3. **T-V** Aferencias proveniente de las áreas caudales de la ínsula parietal (ICgPAc), escasa marca y principalmente se encuentra en la región agranular posterior de la ínsula

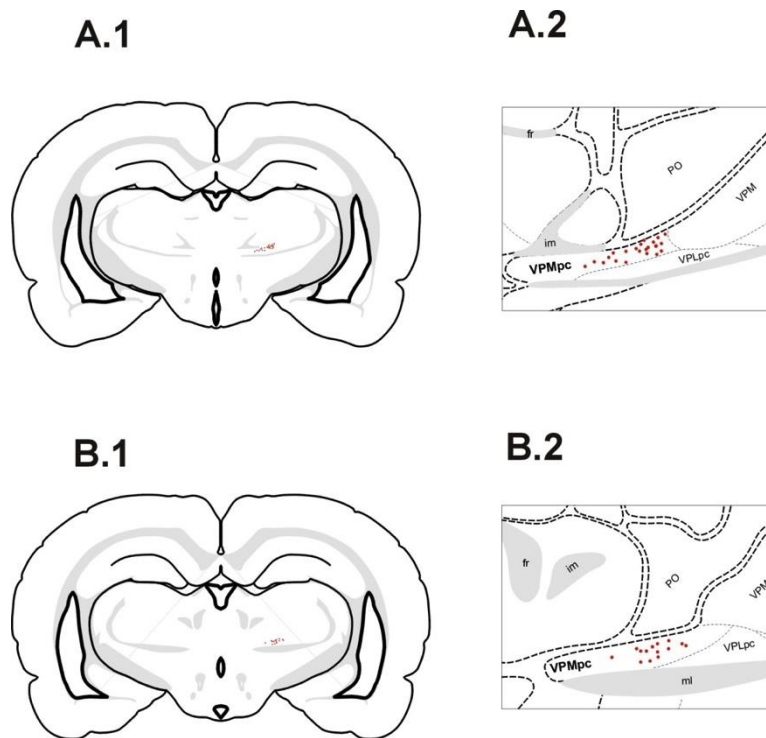


Figura 26. Representación esquemática de las proyecciones desde el tálamo hacia ICgP. En **A.1, B.1** se muestra la marca retrógrada en 3,9 y 4,2 mm por detrás de bregma. En **A.2 y B.2** se observa marca exclusiva en el núcleo ventral posteromedial, parte parvocelular (VPMpc).

V.I.III.VI La región caudal de la corteza insular granular recibe aferencias de las zonas más rostrales de la corteza insular

Sitio de inyección

La región insular granular más caudal se ha descrito que se extiende desde -1,5mm hasta -3,0mm o incluso hasta 3,8mm por detrás de bregma (Saper C. B. 1982; Cechetto 1987; Cecheto 1990; Allen 1991; Shi y Cassel 1998). La corteza insular parietal caudal

(ICgPac), ha sido descrita en base a su citoarquitectura y relación con cortezas, como somatosensorial, corteza insular disgranular y núcleos talámicos. De acuerdo a los antecedentes vistos (Shi y Cassel 1998; Swanson 1998) la inyección realizada en la Fig. 24, se encuentra en -1,78mm. Región que podría ser el límite rostral de esta región granular de la ínsula. La inyección de CTB está en la zona granular de la corteza (Fig. 27 B y 27C).

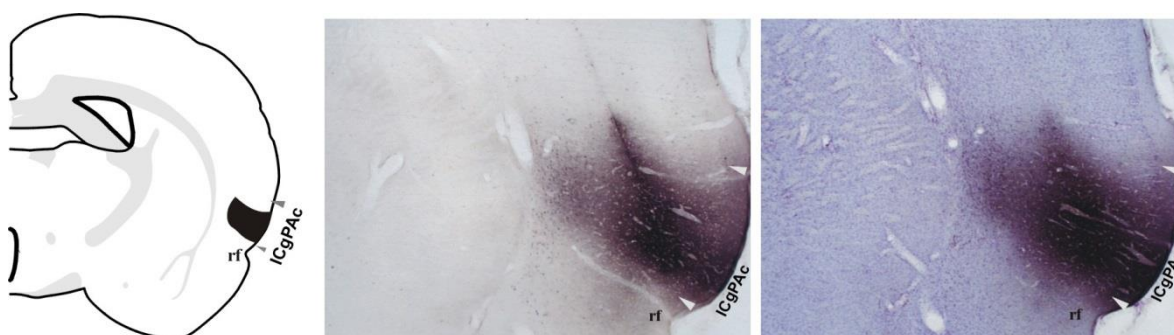


Figura 27. Inyección de trazador Retrógrado CTB en la región parietal caudal de la corteza insular granular (ICgPac). En **A** Representación esquemática del sitio de inyección, ubicado 1,78mm por detrás de bregma. En **B** Fotomicrografía de la inyección de CTB la cual se encuentra restringida al área cortical mencionada. El trazador cubre todas las capas corticales. En **C** se muestra la tinción de Nissl para el sitio de inyección junto con el Revelado para el CTB.

Aferencias corticales de ICgPac

Las proyecciones hacia ICgPac son abundantes y van desde regiones motoras frontales hasta regiones corticales caudales que incluyen cortezas temporales, entorhinales (Fig. 28 A-P).

Aferencias desde la corteza insular

Aferencias desde ICgA. Las proyecciones desde esta región de la ínsula provienen de la parte más caudal de ICgA en 1,7mm por delante de bregma hasta +1,2mm (Fig. 28 C-E). La marca es muy escasa y se limita principalmente a las capas superficiales ii,iii y las capas profundas, con ausencia de marca retrógrada en la capa iv. Aferencias desde ICgP. Entre +0,95mm y +0,1mm las marcas retrógradas de CTB son pocas o nulas (Fig. 28 F-H). Aferencias desde ICgPAr. La aferencia desde regiones más caudales de la corteza insular granular, inmediatamente rostral al sitio de inyecciones corresponden al a ICgPAr. En esta zona hay marca desde -0,11mm hasta el la sección inmediatamente rostral al sitio de inyección en -0,83mm. Aquí la marca ocurre principalmente en capas profundas v y vi (Fig. 28 I-K).

Otra región de la corteza insular con importante marca retrógrada es la zona disgranular de la corteza insular desde +1,2mm hasta +0,95mm. Asimismo, la corteza insular agranular rostral (*RAIC rostral agranular insular cortex*) en su división ventral presenta marca retrógrada y menor densidad la zona dorsal (Fig. 28 C, D y F). Además en la región agranular posterior, la marca se extiende desde +0,45mm (Fig. 28 F) hasta 2,45 mm por detrás de bregma y se puede observar que está en los dos hemisferios.

Eferencias desde otras regiones corticales y subcorticales

Las marcas de CTB se observan desde regiones motoras que se encuentran en +5,2mm y se extienden hasta +3,2mm. Además estas eferencias vienen desde la zona ipsilateral y contralateral y desde regiones superficiales capas ii,iii (Fig. 22A y 22B). Regiones motoras primarias (MOp), proyectan desde +2,8mm hasta +0,45mm (Fig. 22C-

G), al igual que las proyecciones de MOs estas eferencias también son ipsilaterales y contralaterales de las capas ii, iii. Eferencias desde las cortezas somatosensoriales, provienen desde cortezas primarias y secundarias. La marca retrógrada en la corteza somatosensorial primaria comienza en +1,7mm y termina en -0,82mm, la cual tiene somas neuronales marcados en las capa ii y en la capa iv. La corteza somatosensorial secundaria presenta marca retrógrada desde +0,95mm la cual se extiende hasta -2,85mm. De las regiones más caudales donde encontramos marca retrógrada del CTB, cabe destacar áreas auditivas ventrales, área temporal de asociación, área perirhinal, área entorhinal parte lateral. Otros núcleos subcorticales con marca retrógrada leve son la amígdala basolateral y basomedial.

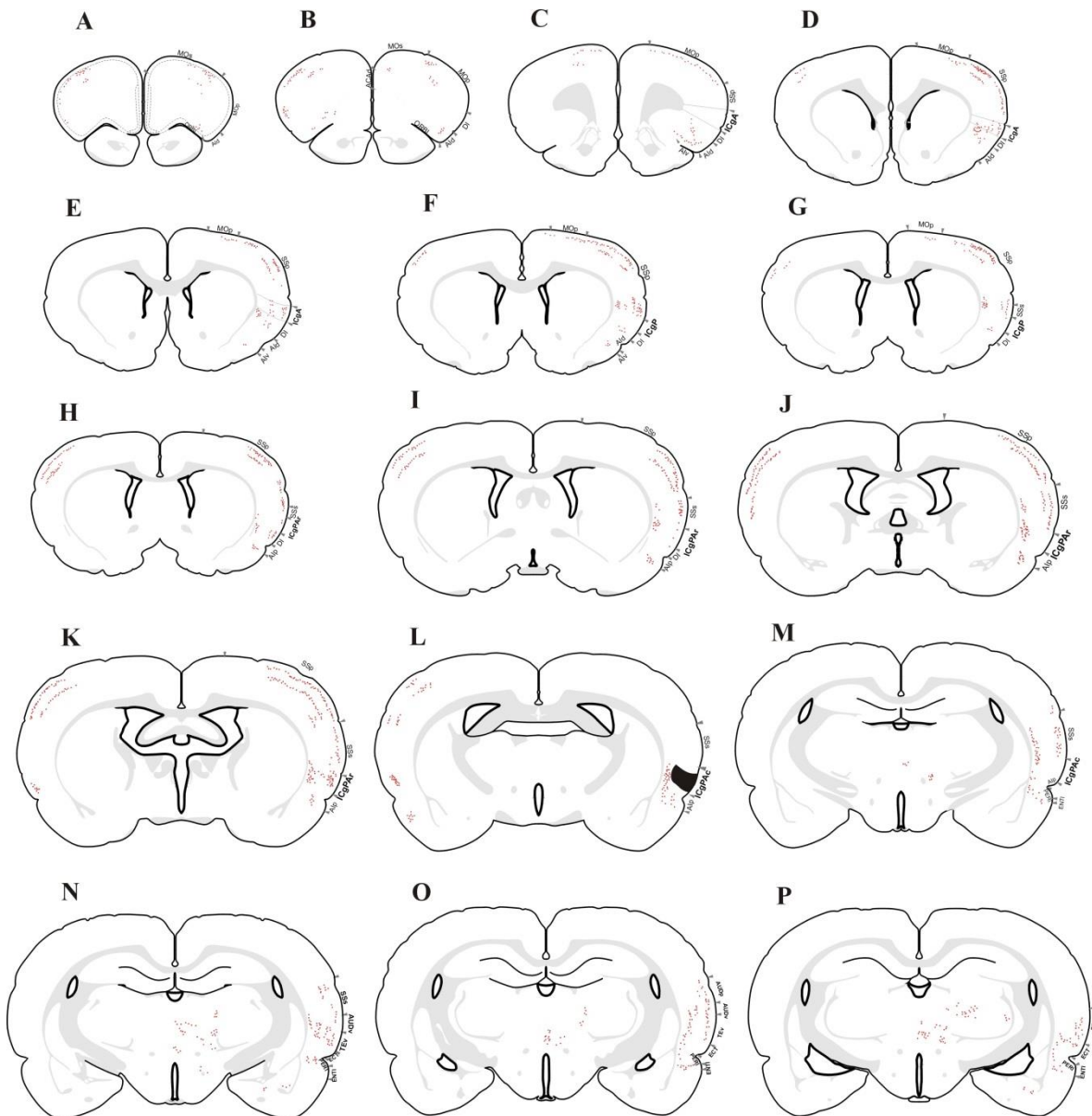


Figura 28. Representación esquemática de la marca de CTB luego de la inyección en ICgPAc, presente en las secciones seleccionadas a través de las diferentes áreas corticales. A y B Eferencias desde las regiones corticales más anteriores Cortezas motoras, órbitofrontales y la región agranular de la corteza insular. En C, D y E Eferencia desde la parte más caudal de ICgA la cual proviene desde capas 5-6 y 2-3 También hay una densa marca en Ssp. En F y G ausencia de marca en ICgP, hay eferencias desde SSs. **(H-K)** Secciones representativas de la ICgPAc, se observa escasa marca principalmente de capas profundas., En L sitio de inyección mostrado previamente. **(M-P)** Regiones corticales más caudales, se observa marca en distintas cortezas, anotar la marca en la zona más dorsal de la ENTl, también se observan eferencias desde la amígdala y el tálamo que se detallan más adelante

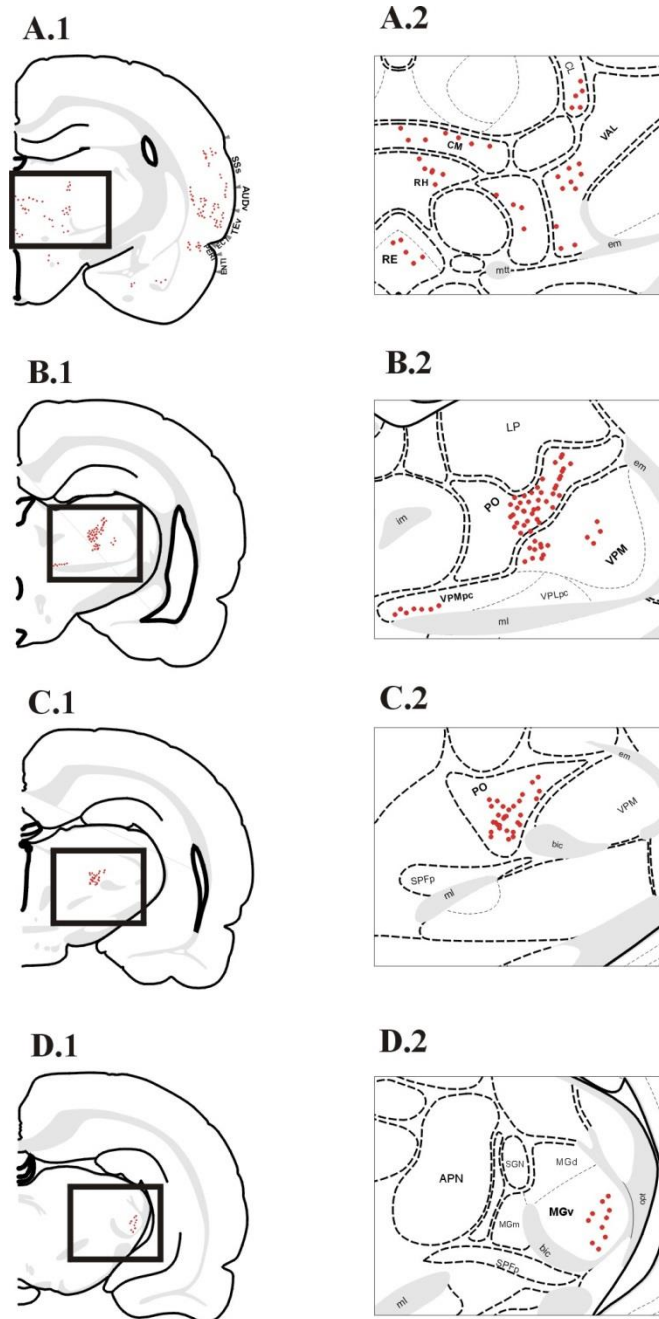


Figura 29. Representación esquemática de las principales eferencias talámicas hacia ICgPAc. En **A.1**, **B.1**, **C.1** y **D.1** se muestra marcas en distintos núcleos talámicos en 2,85;3 ,9; 4,45 y 4,6 por detrás de bregma respectivamente. En cada figura hay un cuadrado que es representado en detalle en la columna de la derecha. En **A.2** se observa marca principalmente en los núcleos de la línea media, CM, RH y RE, además del VM y VAL. En **B.2** Densa marcas principalmente en PO, la cual se extiende hacia regiones caudales como se observa en **C.2**. En **D.2** hay una fuerte marca en Mgv, núcleo de relevo

auditivo, lo cual ha sido descrito como característico esta región de la corteza insular granular.

Aferencias hacia núcleos talámicos

Las proyecciones desde el tálamo hacia ICgPAc provienen desde diversos grupos neuronales. Desde regiones más rostrales, 2,45mm por detrás de bregma, las aferencias provienen de algunos núcleos de la línea media como el CM, RH y RE (Fig. 29 A.1 y A.2). Después la marca retrógrada se extiende principalmente por el núcleo posterior del tálamo (Fig. 29 B.1) y por núcleo VPMpc y el VPM (Fig. 29 B.1 y B.2). La eferencia desde el PO se extiende más caudalmente hasta 4,6mm por detrás de bregma. Además encontramos marca retrógrada en el núcleo MGv. (Fig. 29 D.1 y D.2).

V.II Segunda Parte: Relación de la región interoceptiva de más alto orden con la Amígdala.

V.III.I La región agranular ventral de la corteza insular (ICAv) presenta diferentes aferencias corticales y subcorticales que la región agranular dorsal de la corteza insular (ICAd)

El procesamiento de la información que manejan los componentes del sistema interoceptivo, principalmente la corteza insular, y la asociación con los mecanismos efectores que subyacen a la respuesta de la amígdala que han sido descrito aún son insuficientes, principalmente porque el foco del planteamiento han sido las estructuras subcorticales.

Los principios básicos que han emergido desde estudios de proyecciones hacia los núcleos de la amígdala son que estas innervaciones provienen desde áreas corticales sensoriales multimodales o de asociación y la existencia de una sobreposición entre inputs

córtico-amigdaloides y los que provienen de regiones subcorticales (LeDoux, J.E y Col 1991 Shi CJ y Cassel MD. 1998; Stefanacci L. y Col 2002)

Se ha establecido además que las aferencias desde áreas de procesamiento sensorial del tálamo y la corteza median el aprendizaje emocional, en situaciones que involucran claves sensoriales específicas (LeDoux JE. 1993). Estudios de trazadores en corteza insular, amígdala y tálamo, han descrito de manera general las inervaciones existentes entre estas áreas. Proyecciones desde la ínsula al núcleo central de la amígdala han sido descritas por una serie de trabajos en ratas (Saper CB. 1982; McDonald y Col 1996; Shi y Cassel 1998; Reynolds S. y Col 2005) y en primates (Stefanacci L. y Col. 2000; Miyashita T y Col 2007), Consideramos que estos trabajos aún carecen de la integración con el sistema interoceptivo. Por ello nosotros hemos realizado una serie de inyecciones anterógradas y retrógradas en la región agranular de la corteza insular.

V.II.I.I Eferencias de la corteza insular agranular ventral (AIV)

Sitio de inyección

La región agranular de la corteza insular, ubicada entre 4mm rostral a bregma y 0,95mm bregma, ha sido descrita como la región anterior de la corteza donde estaría ubicada la zona jerárquicamente más elevada del sistema interoceptivo. El sitio de inyección se encuentra 2,8mm por delante de bregma y se extiende hasta 2,1mm por delante de bregma. (Fig. 30 A-C). Esta inyección se encuentra en la parte ventral de la corteza, y abarca las capas corticales i-v. Además se puede observar que es restringida a esta área ya que el hemisferio contralateral al sitio de inyección presenta aferencias sólo en AIV (Fig. 30 D).

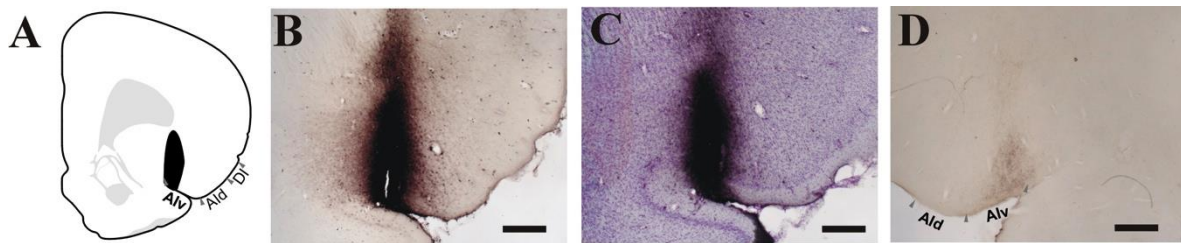


Figura 30. Inyección de trazador anterógrado BDA en la corteza insular agranular ventral (AIV). En **A** Representación esquemática del sitio de inyección, ubicado 2,8mm por delante de bregma. En **B** Fotomicrografía de la inyección de BDA la cual se encuentra restringida al área cortical mencionada. El trazador cubre todas las capas corticales. En **C** se muestra la tinción de Nissl para el sitio de inyección junto con el revelado para el BDA. En **D** la fotomicrografía de lado contralateral al sitio de inyección, se observa la marca restringida sólo en AIV. La barra en la esquina inferior derecha indica 500µm.

Eferencias corticales de AIV

Las eferencias desde la región agranular son bastante más variadas y abundantes que las de regiones granulares que se vieron anteriormente. Sus eferencias se dirigen tanto hacia regiones frontales corticales como hacia regiones más caudales de la corteza insular y áreas subcorticales, siendo las proyecciones hacia los núcleos de la amígdala las más abundantes. Las proyecciones más rostrales están en áreas motoras y distintas regiones de las cortezas prefrontales mediales.

Eferencias hacia regiones prefrontales mediales

Las proyecciones hacia cortezas prefrontales mediales son principalmente hacia la corteza prelimbica (PL) y hacia la corteza orbitofrontal medial (OBRm) (Fig.31 A-D). Los terminales que se observan en PL a partir de 5,2mm por delante de bregma, esta marca rostral, se encuentra en la capa v, en la región ipsilateral al sitio de inyección. También es

posible observar marca contralateral, la cual abarca las capas i-v. La marca bilateral se extiende hacia caudal en +4,85mm donde es bastante fuerte. Estas aferencias bilaterales cubren las capas i-v. La marca más caudal en PL es en +4,2mm, esta proyección se encuentra en la parte más ventral y cubre las capas i, ii y iii y es sólo ipsilateral.

La marca en ORBm se extiende de manera similar a la de PL. En 5,2mm la eferencia es potente y es tanto ipsi como contralateral. Las capas que abarcan las eferencias ipsilaterales son ii-iii, iv y v, mientras que la marca contralateral está en las capas superficiales i, ii-iii. Hacia caudal, y al igual que la marca en PL en 4,85mm, las aferencias son bastante fuertes y en ambos hemisferios cerebrales. La marca ipsilateral abarca las capas i - v, en el lado contralateral la marca va desde la capa ii a la capa v. La marca más caudal en ORBm está en +3,6mm, es ipsilateral y comprende las capas superficiales (Fig. 31 A-D).

Eferencias hacia la corteza insular agranular dorsal (AId)

Las proyecciones hacia esta área de la corteza insular se extienden desde +4,85mm hasta la parte más caudal en +0,95mm (Fig. 30 B-E). Estas proyecciones presentan diferencias en su patrón de marca de acuerdo al nivel que alcanzan lo cual se detalla a continuación. En 4,2mm y en 3,6mm la marca es en ambos hemisferios y en el lado ipsilateral al sitio de inyección la marca es fuerte y abarca todas las capas corticales, mientras que en contralateral las capas con terminales provenientes de AIV van desde las capas i-v. En 3,2mm las eferencias hacia AId son principalmente ipsilaterales y una muy leve marca contralateral en las capas superficiales. En 2,8mm y 2,1 mm se encuentra el sitio de inyección, en estos niveles la marca contralateral es sólo en AIV (Fig. 30 D) y no hay proyecciones a ninguna capa de AId. La marca en AId vuelve a aparecer en +1,45mm y se

extiende hasta 0,95mm (Fig. 31 I-K); esta aferencia es sólo ipsilateral y se encuentra en las capas v y vi.

Eferencias hacia regiones corticales motoras

Las cortezas motoras primaria y secundaria reciben importantes proyecciones axonales de AIV, su marca es principalmente ipsilateral aunque también hay marca contralateral.

Las proyecciones hacia la corteza motora primaria (MOp) se extienden desde 4,85mm anterior a bregma hasta +3,2mm (Fig.31 A-E). En las regiones más rostrales (+4,85mm y +4,2mm) esta marca abarca las capas i-v. Mientras que en la zona más caudal (+3,6mm y +3,2mm) la marca va desde la capa ii a la capa v. Las proyecciones hacia la corteza motora secundaria (MOs), se extiende desde las zonas más rostrales que logramos mapear, esto es 5,2mm por delante de bregma, hasta +4,85. Esta marca es ipsilateral al sitio de inyección y los terminales que llegan a MOs son abundantes y abarcan las capas i-v.

Eferencias de AIV hacia regiones subcorticales

Entre las aferencias más fuertes que encontramos se encuentra la marca hacia el tubérculo olfatorio (OT). Esta marca se extiende desde +2,15 hasta -0,11 (Fig.31 G-O).

Otra región densamente marcada por los terminales desde AIV es el núcleo Acumbens (ACC); esta marca adyacente a OT y a la comisura anterior (aco), se extiende desde +1,7mm hasta +0,95mm (Fig. 31 H-K). El fundus del striatum (FS) también es innervado por AIV, y su marca se extiende desde +1,2mm hasta -0,11mm (Fig. 31 J-O).

Otra eferencia que quisiéramos destacar como relevante por su importancia en circuitos conductuales y motores es la marca en el Caudado Putamen. Las proyecciones

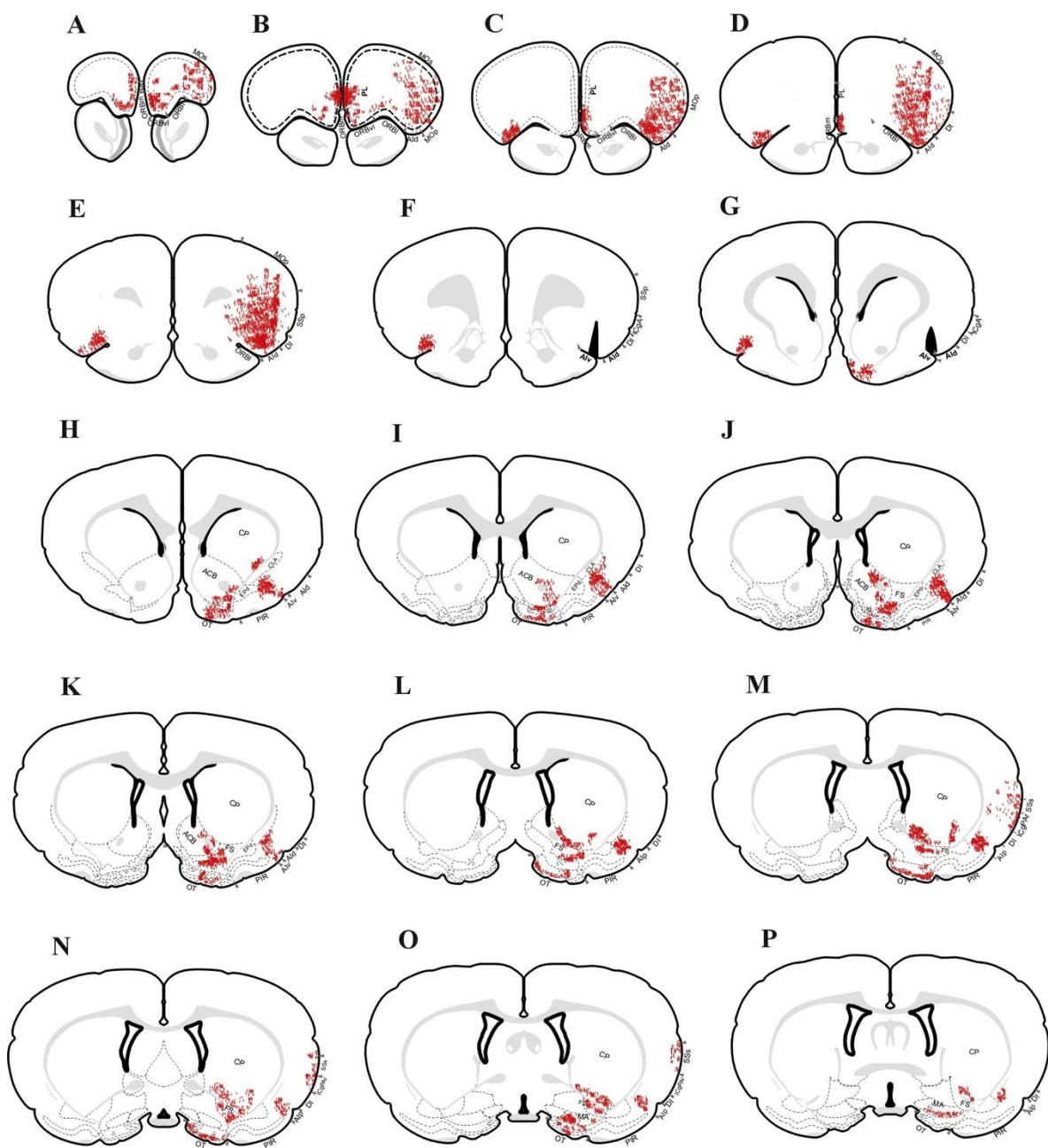
desde AIV hacia CP se encuentran en la zona ventral de este núcleo y están adyacentes al claustrum (CLA). La marca se extiende desde +0,45mm hasta 0,26mm por detrás de bregma (Fig. 31 L-P).

Eferencias hacia la corteza agranular posterior (AIP)

Una importante proyección es hacia la región más caudal de la ínsula agranular. La marca se extiende desde +0,45mm hacia 1,33mm por detrás de bregma (Fig.31 L-T). En las zonas más rostrales, desde +0,45mm hasta 0,0 mm de bregma, esta marca abarca las capas i a la capa vi. Luego en -0,11mm la marca se encuentra en las capas corticales ii a la capa vi. Por último en las zonas más caudales, desde -0,26mm hasta -1,33 mm, la marca se observa solo en las capas profundas v y vi.

Eferencias hacia núcleos de la amígdala

La corteza insular agranular ventral, proyecta principalmente hacia núcleos mediales de la amígdala (Fig. 32 A.1 –F.1). La marca en el núcleo medial de la amígdala (MEA) se extiende desde -1,33mm hasta 2,00 mm por detrás de bregma (Fig. 32 A.1 –C1). Otro núcleo de la amígdala que se marca con fuerza es el área amigdalóide anterior (AAA) (Fig.32 A.1). Las proyecciones se encuentran principalmente en -1,33mm. Los núcleos basomedial (BMA) anterior (BMAa) y posterior (BMAp) de la amígdala están densamente inervados por aferencias de AIV; los terminales se extienden desde -1,53mm hasta 2,45mm (Fig. 32 A.1-F.1).



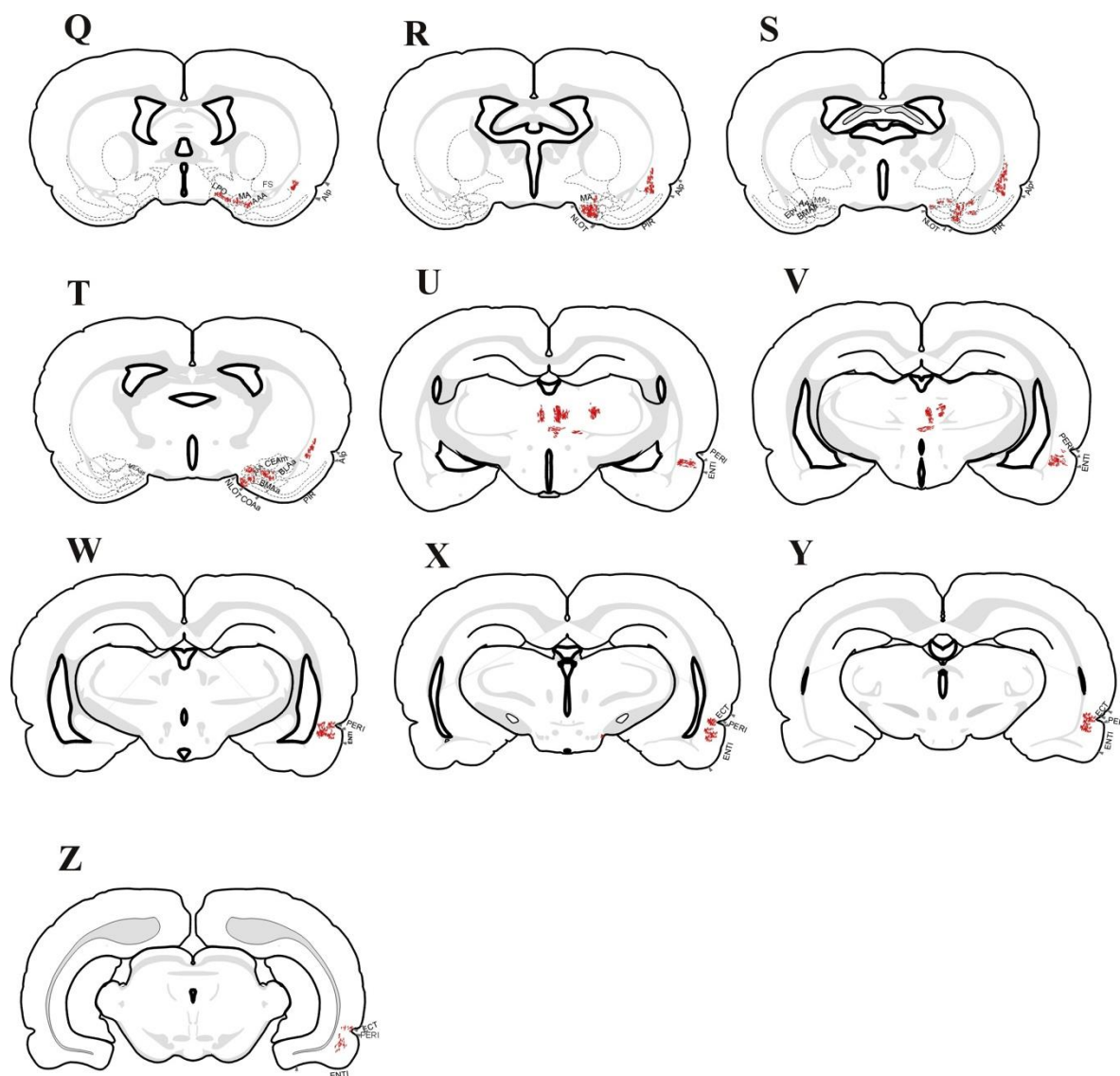


Figura 31. Representación esquemática de las eferencias corticales y subcorticales desde AIv. (A-E) Eferencias hacia regiones prefrontales mediales, motoras y somatosensoriales, ipsilaterales y contralaterales. En **F y G**, marca representativa del sitio de inyección mostrado previamente; se observa marca contralateral en la zona con mayor densidad de marca AIv. En **(H-K)** Eferencias hacia regiones del núcleo acumbens, y zonas caudales de AIv. **(L-P)** importantes eferencias hacia la porción ventral del núcleo caudado y la región posterior de la ínsula agranular. **(Q-T)** eferencias hacia áreas de la amígdala. En **U y V** se observan eferencias hacia núcleos talámicos de la línea media y otros como el Dorsal medial (MD); también se observan aferencias hacia la corteza entorhinal lateral (ENTI). **(W-Z)** Proyecciones hacia la corteza ENTl y PERl.

Otras áreas de la amígdala que son innervadas por AIV son las región lateral (LA), que presenta una densa marca desde -2,45 hasta -3,25 (Fig. 32 D.1 –F.1). La zona anterior y posterior del núcleo Basolateral de la amígdala, son también innervados por AIV. Asimismo hay una densa marca en el núcleo endopiriforme ventral (EPv) (Fig. 32 C.1-F.1).

En la región cortical de la amígdala es posible encontrar eferencias en BA (*bed nucleus accesory olfactory tract*), Núcleo cortical de la amígdala parte anterior (COAa), parte posterior (COAp) y en el área amigdaloides periforme (PAA). Todas estas proyecciones son densas y abarcan las 3 capas corticales (fig. 32 A.1-F.1).

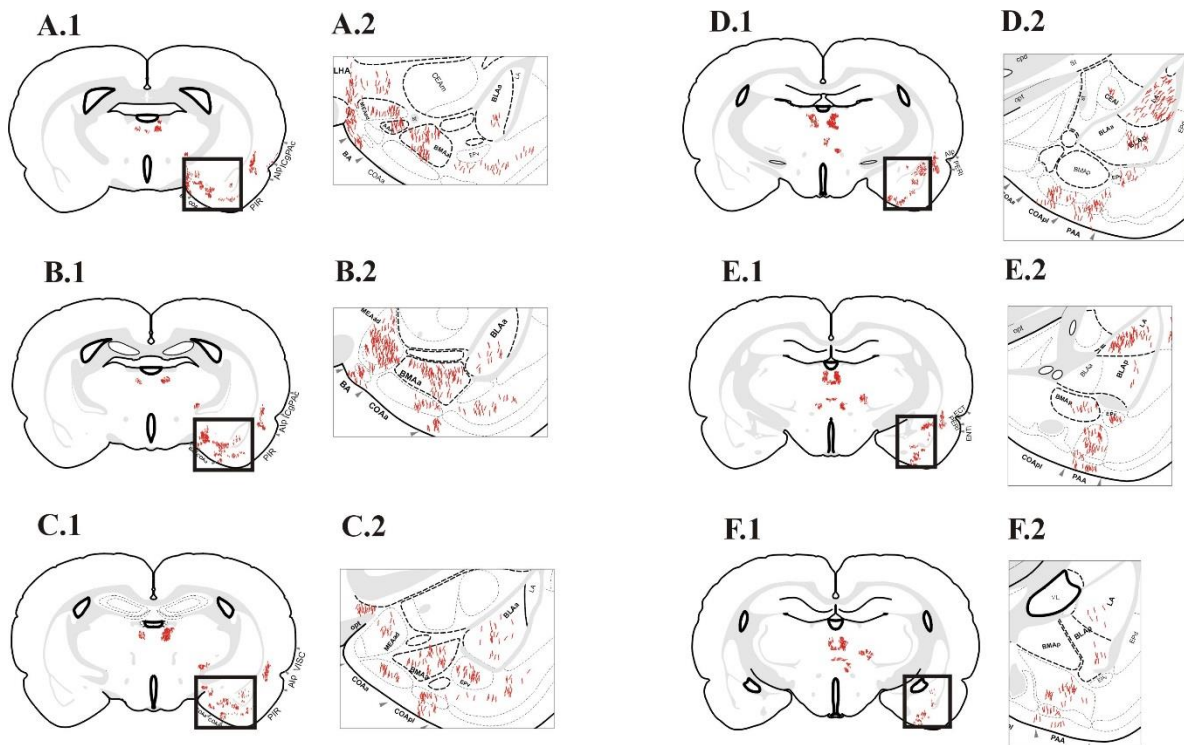


Figura 32. Representación esquemática de las eferencias desde AIV hacia diferentes núcleos y áreas de la amígdala. En A.1, B.1, C.1, D.1, E.1 y F.1, eje anteroposterior de las eferencias entre las coordenadas -1,33mm a -3,25mm -1,53. En A.2 y B.2 la marca se observa con mayor densidad en los núcleos Medial y Basomedial, también hay eferencias en la región basolateral. En C.2 la marca en BMA es menos densa y comienza a hacer más densa las proyecciones hacia BLA. En D.2 la marca en BMA es escasa o no hay mientras que existe una fuerte proyección hacia LA que se extiende hasta E.2 donde también aparece levemente la marca en BMA. En la región más caudal, aquí representada (F.2), la marca se puede observar en la región LA y BLA y en PAA.

V.II.I.II Eferencias de la corteza insular agranular dorsal (AId)

Sitio de inyección

La región dorsal de la corteza insular agranular comprende desde +4,85 hasta 0,95mm por delante de bregma. El sitio de inyección se encuentra 2,1mm por delante de bregma y se extiende hasta 1,7mm por delante de bregma. (Fig.33 A-C). Esta inyección abarcó las capas corticales i-v. La marca contralateral al sitio de inyección muestra eferencias restringidas a AId (Fig. 33 D)

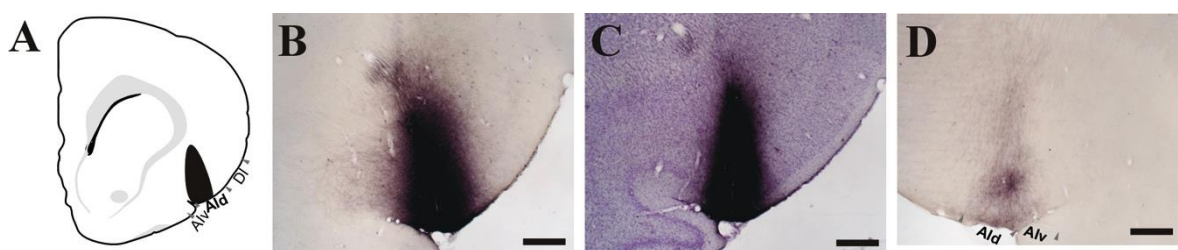


Figura 33. Inyección de trazador anterógrado BDA en la corteza insular agranular dorsal (AId). En A Representación esquemática del sitio de inyección, ubicado 2,1mm por delante de bregma. En B Fotomicrografía de la inyección de BDA la cual se encuentra restringida a AId. El trazador cubre las capas corticales i-v. En C se muestra la tinción de Nissl para el sitio de inyección junto con el revelado para el BDA. En D la fotomicrografía de lado contralateral al sitio de inyección, se observa la marca restringida sólo a AId. La barra en la esquina inferior derecha indica 500μm.

Eferencias corticales de AId

Las eferencias desde la región agranular dorsal son diferentes a las de AIV, tanto hacia regiones corticales como a regiones subcorticales. Las proyecciones más rostrales, se extienden en la corteza prefrontal medial y áreas motoras.

Eferencias hacia región prefrontal medial

La región prefrontal medial presenta terminales en la corteza prelímbica y en la corteza orbitofrontal medial. Las proyecciones hacia la corteza prelímbica se inician en 5,2mm por delante de bregma y se extienden hasta +3,6mm (Fig. 34 A-D). La marca más rostral en +5,2mm y +4,85mm, es bilateral y presenta terminales en las capas i,ii-iii y v. La extensión de esta marca desde 4,2mm hasta 3,6mm por delante de bregma estuvo restringida a las capas superficiales.

La región orbitofrontal medial recibe aferencias desde AId menos densas que las aferencias que recibe desde AIV. Esta marca se extiende desde +5,2mm hasta +3,6mm (Fig. 34 A-D). La proyección en la región más rostral de ORBm, +5,2mm, es bilateral y se ubica en las capas i, ii-iii. Avanzando hacia caudal esta marca se ubica sólo en la región ipsilateral al sitio de inyección y es menos densa. Desde 4,85mm hasta 3,6 mm por delante de bregma, la marca abarca las capas superficiales i, ii-iii.

La corteza infralímbica (IL) recibe aferencias exclusivas desde la zona dorsal de la corteza insular granular. Esta marca, que es poco densa, se concentra en la parte más rostral desde +3,6mm hasta +2,8mm y se encuentra en las capas i, iii-iii (Fig. 34 E-F).

Eferencia hacia regiones corticales motoras y corticales sensoriales

Las cortezas motoras primaria y secundaria reciben importantes aferencias de AIV, principalmente del lado ipsilateral aunque también hay marca contralateral. Las proyecciones que llegan a la corteza motora primaria (MOp) se encuentran restringidas entre 4,85mm y 4,2mm por delante de bregma; esta marca es débil respecto a las proyecciones de AIV y es ipsilateral al sitio de inyección (Fig. 34 B-D). La proyección hacia la MOs también es débil y se encuentra entre 5,2mm y 4,85mm por delante de bregma. En la zona más rostral, la marca es débilmente bilateral (Fig. 34 A-B).

La marca hacia regiones somatosensoriales se puede ver sólo en la región primaria (SSp) y es muy leve. Esta marca está entre 3,2mm y 2,8mm por delante de bregma y se observa en las capas profundas.

La región insular Gustatoria o Disgranular, recibe aferencias desde AId. Esta área de la corteza insular es bastante extensa y recibe aferencias sólo en la parte más rostral, desde +3,6mm hasta +2,8mm (Fig.34 D-F). Las capas corticales que reciben aferencias son diferentes, ya que en la zona más rostral +3,6mm las capas corticales que se marcan son la ii-iii, y v, en +3,2mm las capas i a las capa v y en +2,8mm las capas ii, v y vi.

Eferencias hacia áreas y núcleos subcorticales

Las proyecciones hacia el núcleo Accumbens (ACC) son muy abundantes al igual que en el caso de AIV, sin embargo se diferencian en cuanto a la densidad y a la ubicación que éstas tienen. La marca en ACC comienza en +1,2mm y se observa en la parte dorsal lateral, una ubicación diferente a la marca observada en AIV. Esta aferencia se extiende hasta 0,45mm por delante de bregma (Fig.34 J-L). Una región igualmente inervada por AId

es el FS. Las aferencias hacia esta región se extienden desde +0,95mm hasta -0,82mm (Fig. 34 K-O). Un área inervada sólo por AId es la *Substantia Innominata* (SI); las aferencias hacia esta región son densas y abarcan desde +0,95mm hasta al menos 0,0mm de bregma (Fig. 33 J-M)

El Caudado/Putamen también es inervado por AId; esta proyección se encuentra contralateral al sitio de inyección en los niveles más rostrales, desde +0,95mm hasta -0,1mm (Fig 34 O-P). Esta marca está ubicada principalmente en la región lateral y ventral. En zonas más caudales del CP las aferencias pueden ser encontradas ipsilateral al sitio de inyección entre -0,82mm hasta -1,08mm, en la zona más ventral junto al FS.

Otra área inervada por tanto por AId como por AIv es el OT, cuya marca se ubica en +0,95mm, marca que logramos seguir hasta -0,10mm, ya que los cortes más caudales estaban dañados.

Regiones corticales más caudales inervadas por AId comprenden la zona granular parietal rostral, sólo en las capas profundas. Asimismo la corteza Piriforme (PIR) recibe aferencias de la corteza agranular dorsal; esta marca se extiende desde -0,51mm hasta -2,00mm y se ubica principalmente en la capa iii (Fig 34 N-O y Fig. 35 A.1-C.1).

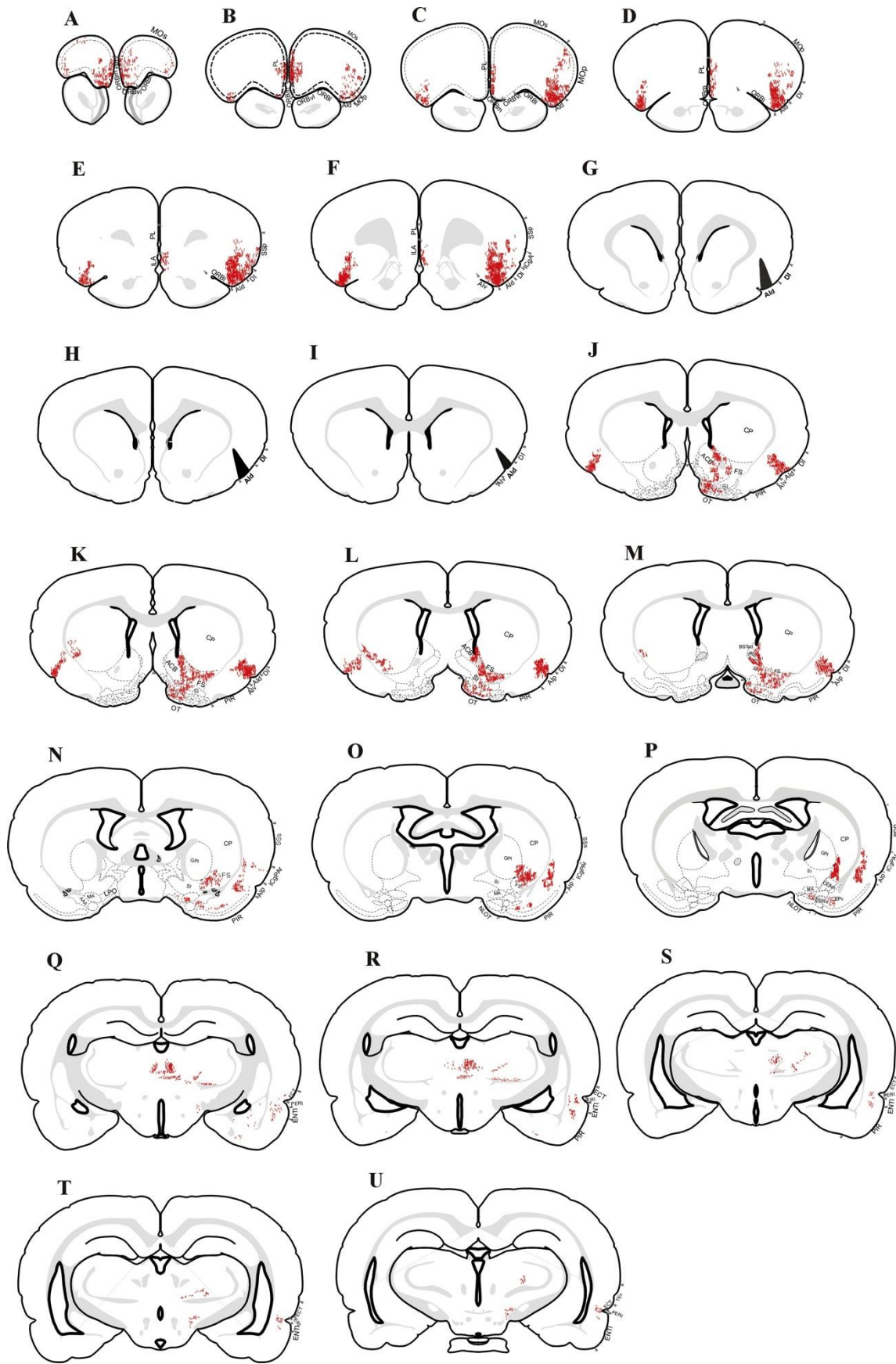


Figura 34. Representación esquemática de aferencias desde AId presentes en las secciones seleccionadas a través de las diferentes áreas corticales y subcorticales. (A-F) Aferencias hacia regiones prefrontales mediales, motoras y somatosensoriales, ipsilaterales y contralaterales, se destacan las aferencias hacia la corteza prelímbica (PL), infralímbica (IL y órbitofrontal medial (ORBm). La marca en el lado contralateral, es densa en la región del sitio de inyección. **(G-I)** marca representativa del sitio de inyección mostrado previamente. En **(H-K)** Aferencias hacia regiones del núcleo acumbens (diferente de AIV, ver texto) y zonas caudales de AId tanto ipsi como contralateral. En **L** y **M** se observa el inicio de las aferencias hacia AIP. **(N-P)** importantes aferencias hacia la porción ventral del núcleo caudado, en el fundus del striatum (FS) y la región posterior de la ínsula agranular así como marca hacia ICgPAr. Desde **Q-U** aferencias hacia núcleos talámicos de la línea media, el Dorsal medial (MD), CM, VPMpc y PO. También se observan las proyecciones hacia ENTl y PERl

Eferencias hacia núcleos de la amígdala

Las proyecciones hacia los núcleos de la amígdala de AId son diversas y marcan una diferencia importante respecto a las proyecciones de la región ventral de la corteza insular agranular. Los núcleos inervados con mayor densidad se encuentran en la zona lateral, central y basal de la amígdala (Fig. 35 A.1-F.1).

Eferencias hacia el núcleo central de la amígdala. La proyección hacia esta área es fuerte y se extiende desde -1,33mm hasta -2,45mm. Estas aferencias se encuentran en tanto en la parte capsular, CEAc (Fig.35 A.1 A.2) como en la parte medial CEAm (Fig. B.1-D.1) así como en la zona lateral, CEAl (Fig.35 C.1)

Eferencias hacia núcleos basales y laterales de la amígdala. La marca en el núcleo basolateral de la amígdala (BLA) comienza en -1,78mm; esta marca es un tanto débil y se ubica principalmente en la zona ventral (Fig. 35 C.1, C.2). Hacia caudal, -2,00mm, la marca en BLA (particularmente la zona anterior, BLAa) es mucho más potente y se presenta en la

Figura 35. Representación esquemática de las conexiones desde AId hacia diferentes núcleos y áreas de la amígdala. En A.1, B.1, C.1, D.1, E.1 y F.1, eje anteroposterior de las aferencias entre las coordenadas -1,33mm hasta -2,85mm del atlas de Swanson. En **A.2** y **B.2** la marca se observa con mayor densidad en el diferentes subregiones del núcleo central (CEA) y en MEA. En **C.2** la marca en CEA es más densa y hay mayor proyección hacia MEA. En **D.2** la marca en CEA se mantiene y aparece con fuerza la proyección hacia BLA, también hay más densidad de marca en BMA y MEA. En **E.2** es escasa o no hay mientras que existe una fuerte proyección hacia LA que se extiende hasta **E.2** densidad de marca en CEA BLA y LA, así como en BMA. En (**F.2**), la marca se mantiene en LA y BLA con gran densidad de proyección.

V.II.II La región agranular ventral de la corteza insular (ICAv) recibe proyecciones corticales y subcorticales diferentes que la región agranular dorsal de la corteza insular (ICAd).

Como se describió antes, las aferencias que envían estas dos áreas corticales adyacentes son diferentes y puede dar cuenta de un procesamiento de la información de manera diferenciada y de una función distinta. Para completar este análisis, realizamos inyecciones restringidas del trazador retrógrado fluorogold (FG) para evaluar principalmente la información que reciben desde la corteza prefrontal medial y desde la amígdala.

V.II.II.I La región ventral de la corteza agranular recibe fuertes aferencias de la amígdala lateral y la corteza prefrontal medial

Sitio de inyección

El sitio de inyección de FG en la corteza agranular ventral se encuentra 2,1mm por delante de bregma (Fig.36 A-B). Esta inyección abarcó las capas corticales i-v y se encuentra restringida al área de interés.

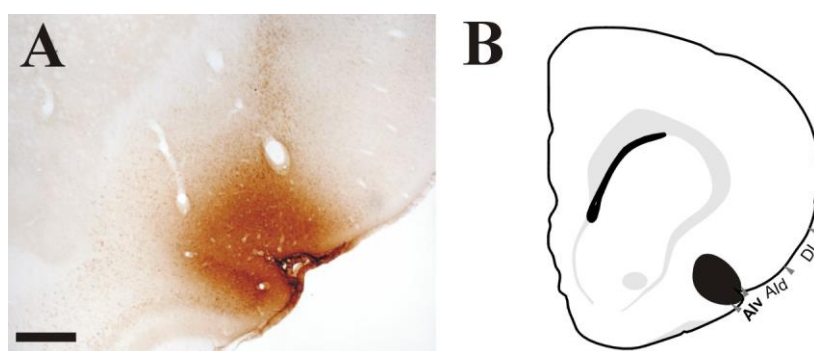


Figura 36. Inyección de trazador retrógrado en la corteza insular agranular ventral (AIV). En **A** fotomicrografía del sitio de inyección del trazador retrógrado FG en +2,1mm, la zona más densa con FG abarca las capas superficiales y parte de la capa v. En **B** representación esquemática del sitio de inyección. . La barra en la esquina inferior derecha indica 500µm

Aferencias de AIV

Entre las regiones con más interés para el desarrollo de esta tesis es la amígdala. Aquí encontramos una importante marca retrógrada proveniente de AIV. Una imagen representativa de las neuronas marcadas con FG se observa en la fig. 37 A. La región lateral de la amígdala (LA), está densamente poblada con neuronas que proyectan hacia la ínsula agranular ventral, así como la región Basomedial posterior (BMAp) y la zona

cortical de la amígdala (COApl). Destaca la ausencia de marca en el núcleo basolateral (BLA).

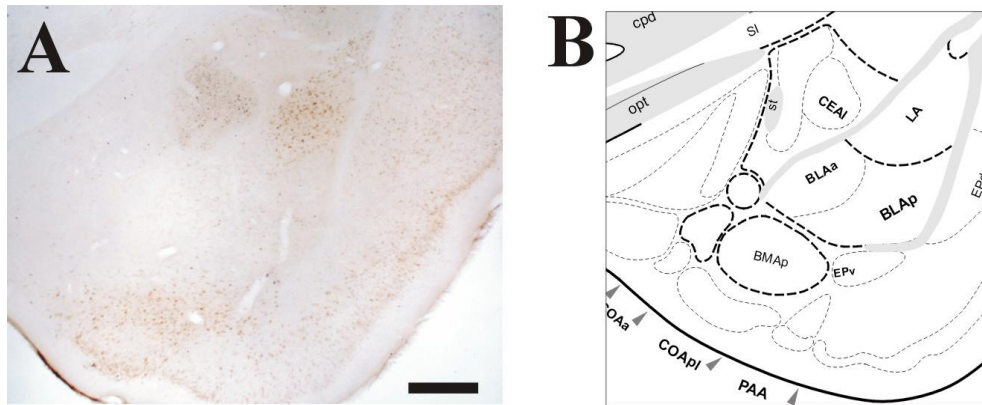


Figura 37. Principal marca retrógrada en la amígdala, que envía aferencias hacia AIV. En **A** eferencias provenientes desde la amígdala, principalmente los núcleos lateral (LA), y la región basomedial (BMA) que se esquematizan en **B**. La barra en la esquina inferior derecha indica 500µm. Debido a que la imagen contiene dos revelados, se observa una marca oscura (fos) y otra marca en café (fluorogold)

Otra importante área con neuronas que proyectan hacia AIV, es la corteza prefrontal medial, aquí encontramos marca en la corteza infralímbica (ILA) y la región orbitofrontal medial (ORBm) (no mostrada aquí). La corteza infralímbica (Fig.38 A) tiene densa marca retrógrada que se ve principalmente en las capas superficiales ii-iii, también se observa marca en la capa v (Fig. 38 B)

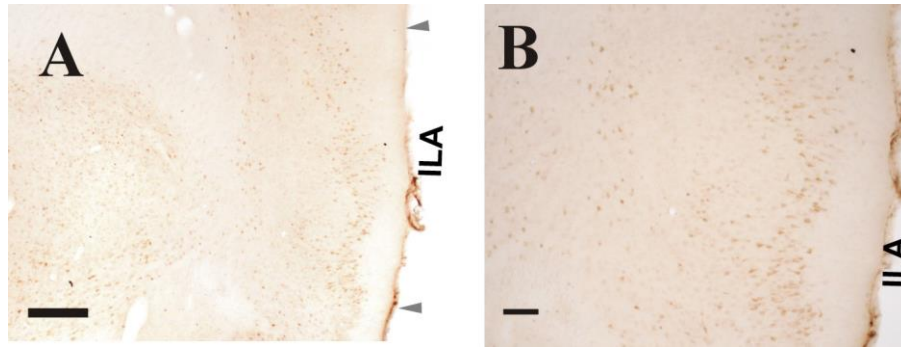


Figura 38. Proyecciones desde las cortezas prefrontales mediales hacia AIV. En A fotomicrografía de la región prefrontal medial en +2,8mm. Debido a que la imagen contiene dos revelados, se observa una marca oscura (fos) y otra marca en café (fluorogold). Se observa densa marca retrógrada en la corteza infralimbica (ILA). La barra en la esquina inferior izquierda indica 500µm. En C fotomicrografía con aumento de las neuronas de corteza infralimbica que proyectan hacia AId. La barra en la esquina inferior izquierda indica 200µm.

V.II.III La región dorsal de la corteza agranular recibe fuertes aferencias de la amígdala basolateral y escasa marca desde la región prefrontal medial

Sitio de inyección

La inyección de trazador retrógrado fluorogold, tiene su más densa marca en 2,8mm por delante de bregma como se observa en la fig. 39 A. Esta inyección no difundió demasiado y se restringió al área de interés principalmente en las capas superficiales.

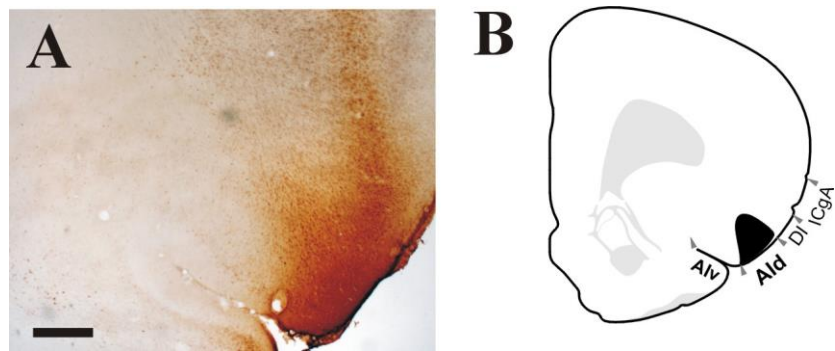


Figura 39. Inyección de trazador retrógrado en la corteza insular agranular dorsal (AId). En **A** fotomicrografía del sitio de inyección del trazador retrógrado fluorogold en +2,8mm, la zona más densa con FG abarca las capas superficiales. En **B** representación esquemática del sitio de inyección.

Aferencias de AId

Entre las principales regiones de interés encontramos una importante marca retrógrada en la amígdala. A diferencia de lo visto previamente en AIV, la marca retrógrada es potente en la amígdala basolateral, BLA, y más denso en la región posterior (BLAp) (Fig. 40 A), también hay densa marca en el núcleo lateral de la amígdala (LA), y en el núcleo basomedial en la subdivisión posterior (BMAp)

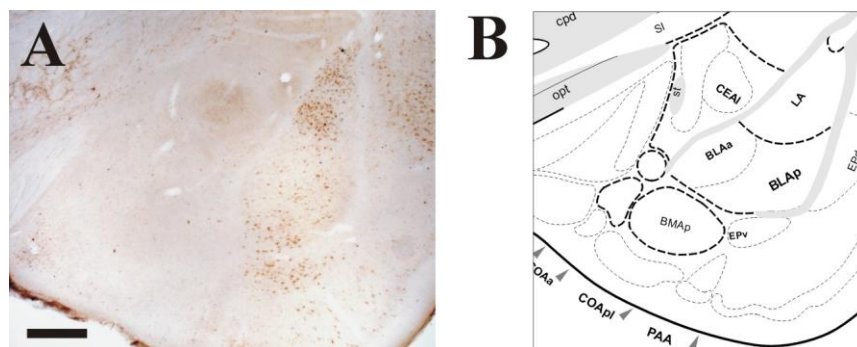


Figura 40. Principal marca retrógrada en la amígdala, que envían sus proyecciones hacia AId. En **A** aferencias provenientes desde la amígdala, principalmente los núcleos lateral (LA), y basolateral (BLA) que se esquematizan en **B**. La barra en la esquina inferior izquierda indica 500µm.

Otra diferencia importante con AIV, es la proyección desde la región prefrontal medial (Fig.41 B, C y D). La marca en ILA es escasa (indicada con una flecha) y principalmente en capas profundas (Fig. 40 D), mientras que hay mayor marca retrógrada en la corteza prelimbica principalmente en las capas profundas (Fig.40 C).

Juntos estos resultados dan cuenta de una diferencia importante en ambas regiones de la corteza agranular más rostral

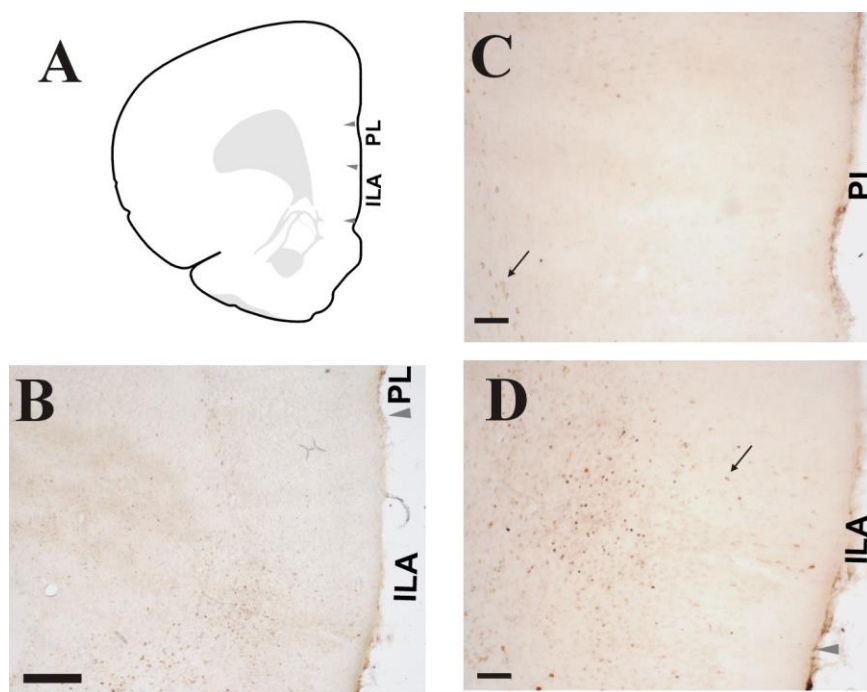


Figura 41. Proyecciones desde las cortezas prefrontales mediales hacia AId. En **A** representación esquemática de una zona de la región prefrontal medial densamente marcada con FG. En **B** fotomicrografía de la región prefrontal medial en +2,8mm. Debido a que la imagen contiene dos revelados, se observa una marca oscura (fos) y otra marca en café (fluorogold). Se observa una marca de FG en la corteza prelimbica, pero solo en las capas profundas (PL) y muy poca marca en infralimbica (ILA). La barra en la esquina inferior izquierda indica 500µm. En **C** fotomicrografía con aumento de las neuronas de corteza prelimbica que proyectan hacia AId y en **D** fotomicrografía con aumento de la marca retrógrada que va desde ILA hacia AId. La barra en la esquina inferior izquierda indica 200µm.

V.III Tercera Parte: El rol de la corteza insular en el miedo condicionado

V.III.I *El vínculo entre RAIC y amígdala es fundamental en el aprendizaje y la extinción del miedo condicionado.*

Efecto de la desconexión del sistema interoceptivo y la amígdala en el aprendizaje y expresión del miedo condicionado.

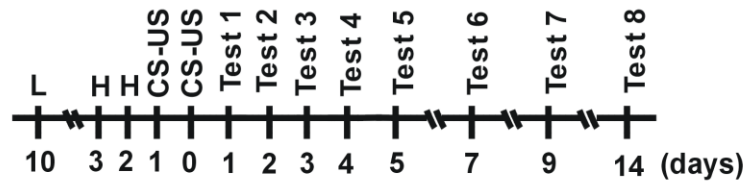
Para determinar si las conexiones existentes en el sistema interoceptivo, particularmente la RAIC, y la amígdala participan del proceso de aprendizaje emocional, nosotros evaluamos la adquisición y la expresión del miedo bajo el paradigma de condicionamiento a miedo y usando el método de desconexión cruzada.

Todas las lesiones fueron realizadas previas al condicionamiento, periodo después del cual los animales son expuestos al condicionamiento y expresión del miedo como se indica en el protocolo (Fig. 42A). Para evaluar si la comunicación entre la RAIC y la BLA es relevante en las memorias emocionales, nosotros realizamos lesiones cruzadas con ácido iboténico, en la RAIC y en la región Basolateral de la amígdala (BLA), bilaterales en la RAIC, unilateral en RAIC, unilaterales en BLA, además de un grupo sham. Veinticuatro horas después del condicionamiento, sólo aquellos animales que tienen la desconexión no logran expresar el miedo condicionado, i.e. su *freezing* es cercano a cero, mientras que el resto de los grupos mostraron niveles elevados de *freezing* durante la primera presentación del tono en el contexto B (Fig. 42 B, test 1, grupo RAIC /Amy 4,00%; AMY L 90,83; RAIC Bilat 68,57%; sham 98,57% *freezing*). En los test posteriores, las ratas que tienen la desconexión continúan exhibiendo un *freezing* menor en el contexto B en relación a aquellos animales con lesiones unilaterales, *freezing* que se mantiene bajo hasta el último test. Aquellos animales que tienen la lesión bilateral en RAIC disminuyen el *freezing* de manera significativa (en los test 3, 4 y 5) en relación al grupo sham; esta caída en el

freezing se mantiene en niveles bajos hasta el último test (día 14). El test ANDEVA de dos vías de medidas repetidas mostró un efecto significativo de la interacción ($F_{(21, 196)} = 3.48$, $p < 0.0001$), el tratamiento ($F_{(21, 196)} = 33.79$, $p < 0.0001$) y el tiempo o ($F_{(21, 196)} = 13.79$, $p < 0.0001$). El post-test Bonferroni confirma el efecto de la desconexión, con bajos niveles de *freezing* en las ratas con desconexión cruzada en relación a las ratas sham, lesión en amígdala izquierda y lesión bilateral en insula agranular. (Fig. 42b, todos los valores de $p < 0.05$). El análisis anatómico de las lesiones se presenta en la figura 43.

Estos resultados sugieren que la comunicación funcional de estos sistemas neuronales participa en el aprendizaje y posiblemente en la expresión del miedo condicionado. Además sugiere fuertemente que la RAIC tiene relevancia en la mantención de la memoria emocional del miedo y posiblemente en la extinción del miedo condicionado.

A



L, Ibotenic Acid Lesion
H, habituación
CS-US, fear conditioning

B

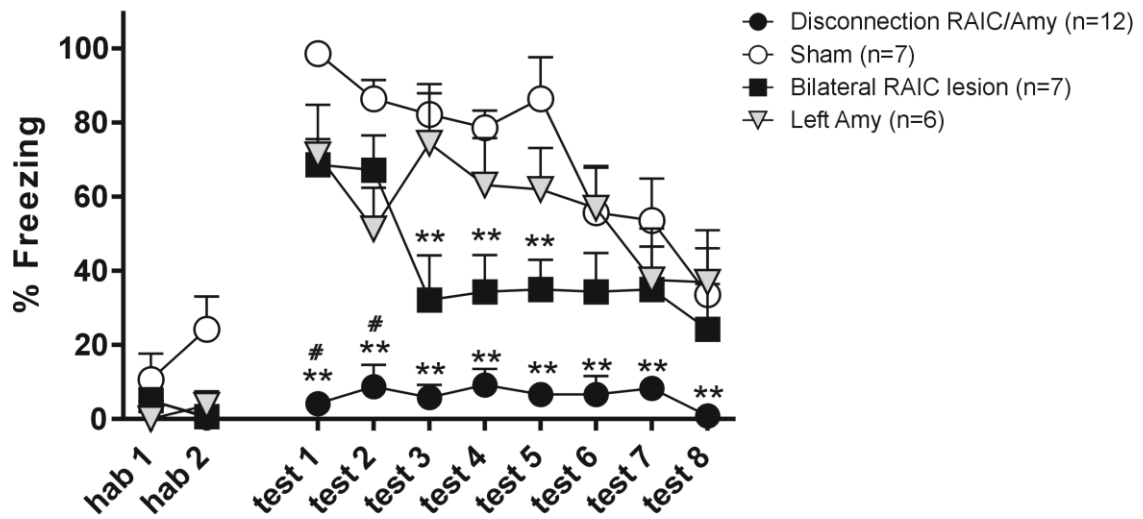


Figura 42. La desconexión de la corteza insular con la amígdala, mediante la lesión cruzada de la corteza insular agranular rostral y la amígdala basolateral con ácido iboténico altera el aprendizaje del miedo condicionado. (A) Protocolo experimental del condicionamiento y la expresión del miedo condicionado. **(B)** Porcentaje de *freezing* en el contexto B, después del condicionamiento los animales son expuestos solamente al tono asociado con el *footshock*; aquellos animales con la desconexión cruzada (RAIC /Amy n=12 , RAIC R/Amy L n=5; RAIC L /AMY R n=7) no adquieren el condicionamiento a miedo, y su *freezing* es bajo hasta 14 días después del condicionamiento, mientras que aquellos con lesión unilateral de la amígdala (n=6), bilateral RAIC (n=7) y los sham (n=7), tienen un elevado *freezing* en el test 1, el cual va disminuyendo paulatinamente con las sucesivas exposiciones al tono. Es importante destacar el efecto de aquellos animales con la lesión bilateral en RAIC cuyo *freezing* cae de manera abrupta en el test 3. El símbolo (**) indica diferencia significativa de RAIC/Amy respecto al sham, (#) indica diferencia significativa de RAIC/ Amy vs el grupo con lesión bilateral RAIC. Todos los valores de p significativo son $p < 0,05$

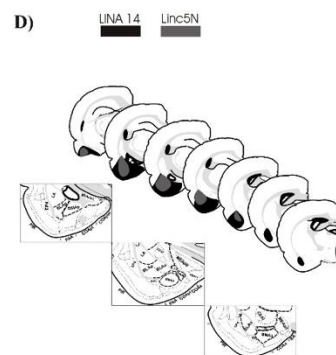
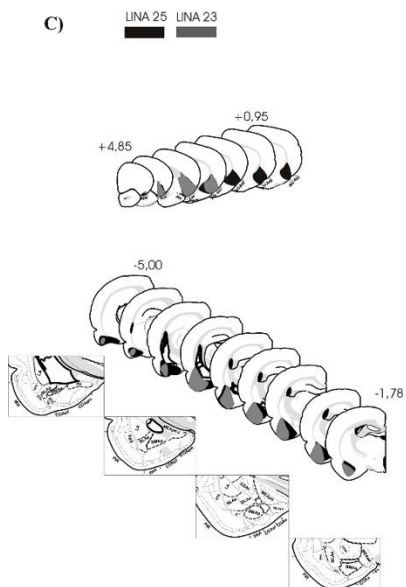
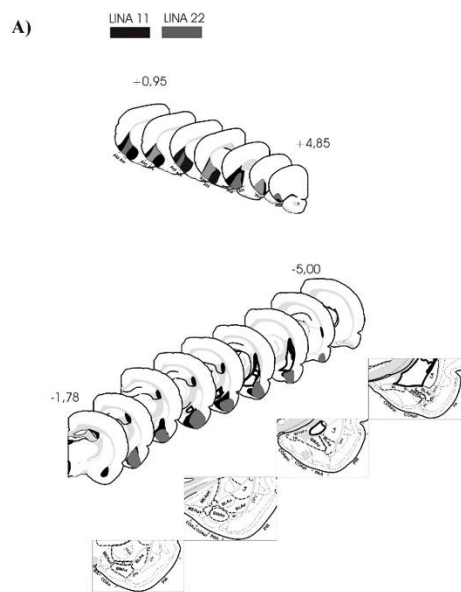


Figura 43. Esquemas representativos de las lesiones realizadas con ácido iboténico correspondiente al gráfico anterior. Para ejemplificar el tipo de lesión realizada se mapearon aquellos animales que tenían la lesión mayor (en negro) y la lesión menor (en gris) para cada grupo. En **A** Esquema representativo de la desconexión realizada lesionando la RAIC izquierda y la BLA derecha. En **B** Esquema representativo de la lesión bilateral de la RAIC. En **C** Esquema representativo de la desconexión realizada con la lesión RAIC derecha y la BLA izquierda. En **D** esquema representativo de la lesión realizada en la BLA izquierda. En la parte superior de cada esquema se indica la distancia respecto a bregma en el eje antero-posterior. Los cuadrados en la parte inferior de cada esquema en A, C y D, representan un aumento del área con lesión para ver en detalle las estructuras lesionadas.

V.III.II Efecto de la desconexión mediante inactivación cruzada en la consolidación del miedo condicionado

Para determinar si la desconexión del sistema interoceptivo con la amígdala afecta el proceso de consolidación de la memoria aversiva inducida por clave, realizamos el tratamiento de desconexión cruzada con muscimol bajo un protocolo de extinción (Fig. 44A). La desconexión, realizada con muscimol, se efectuó inmediatamente después del condicionamiento (Día 1) y los sucesivos tests de extinción se realizaron 24hrs. más tarde. (Día 2) Aquellos animales que recibieron la microinyección de muscimol mostraron un menor *freezing* en los primeros tests, confirmando que la desconexión afecta a adquisición del aprendizaje de miedo. En el primer bloque del día 2 los animales microinyectados con muscimol muestran un *freezing* inicial del 20%, vs salino con un *freezing* inicial del 77% (Fig. 44 B). Los sucesivos tonos muestran un bajo *freezing* en el bloque 5 (promedio de las últimas 3 exposiciones al tono) lo cual da cuenta de que el proceso de extinción se lleva a cabo de manera adecuada. En el día 3, a diferencia del grupo salino el cual presenta aún un elevado *freezing* (60%), los animales tratados con muscimol presentan un *freezing* muy

bajo (18%). El test ANDEVA de dos vías de medidas repetidas, realizado en el día 2, dio cuenta de un efecto significativo del tratamiento ($F_{(4, 60)}=30.85$, $p<0.0001$), del tiempo ($F_{(4, 60)}=4.04$ $p=0.0058$) y pero no de la interacción ($F_{(4, 60)}=0.75$, $p=0.5627$). El post-test Bonferroni confirma la diferencia del primer, tercer y cuarto bloque post infusión de muscimol o salino. En el día 3, se efectuó un test de t de medidas no paramétricas (Mann Whitney test) $p=0.045$. Todos los valores con diferencia significativa $p < 0.05$.

Para determinar si la comunicación entre ínsula y amígdala es más relevante en un hemisferio, separamos aquellos animales que infundimos con muscimol en la ínsula izquierda y amígdala derecha de aquellos con cánulas en la ínsula derecha y amígdala izquierda. La desconexión de la ínsula izquierda con la amígdala derecha resultó ser más efectiva en alterar la adquisición del aprendizaje asociativo (Fig.44 C). En el día 2, aquellos animales con la desconexión cruzada realizada en la ínsula agranular izquierda y amígdala derecha (RAIC L /AMY R $n=5$) presentan un *freezing* bajo (11,8%) vs aquellos animales con de salino ($n=5$), (estadísticamente significativo) pero no significativo, respecto a los animales con muscimol en la ínsula agranular derecha y amígdala izquierda (RAIC D/AMY L $n=3$) quienes tienen un *freezing* de 38% el cual es distinto del salino bloque. El test ANDEVA de dos vías de medidas repetidas, realizado en el día 2, dio cuenta de un efecto significativo del tratamiento ($F_{(2, 40)}=32.22$, $p<0.0001$), del tiempo ($F_{(7, 40)}=18.91$ $p<0.0001$) y de la interacción ($F_{(14, 40)}=0.78$, $p=0.0006$). En el día 3, se efectuó un test ANDEVA de una vía de medidas, Post test- Bonferroni el cual indica diferencias existentes solo entre RAIC L /AMY R y salino. Todos los valores con diferencia significativa $p < 0.05$. Este resultado sugiere que el efecto del muscimol está fuertemente lateralizado. El análisis anatómico de las cánulas se puede observar en la figura S1 (apéndice).

Figura 44. La desconexión de la corteza insular y la amígdala, mediante la inactivación cruzada de la corteza insular agranular rostral (RAIC) y la amígdala basolateral (BLA) con muscimol altera la consolidación del miedo condicionado. (A)

Protocolo de extinción del miedo condicionado, el cual consta de 3 días, día 1 habituación y condicionamiento inmediatamente después del cual los animales son microinyectados con muscimol (n=8) o salino (n=5), día 2 protocolo de extinción en el cual se expone al animal a 15 tonos consecutivos separados por un minuto cada uno en el contexto B y día 3 recuperación, 2 exposiciones al tono. **(B)** Porcentaje de *freezing* en el contexto B durante los 3 días. En el día 1, el primer bloque representa el promedio de exposiciones al tono durante la habituación, el segundo bloque representa el promedio de *freezing* durante el condicionamiento. En el día 2 cada punto representa el promedio de 3 exposiciones al tono (15 exposiciones ,5 bloques) .En el día 3 se agruparon los dos tonos en un bloque. Solo aquellos animales microinyectados con muscimol muestran bajo *freezing* inicial (19%), es decir, no sostienen el condicionamiento a largo plazo lo cual se observa en todo el protocolo de extinción y en el día 3. Mientras que los animales microinyectados con salino tienen un elevado *freezing* inicial (70%). En **(C)** el efecto del muscimol está lateralizado. En el día 2, los animales con la desconexión cruzada presentan un *freezing* muy bajo vs aquellos animales con de salino (n=5). Mientras que en el día 3, solo la desconexión de RAIC L y AMY D muestra diferencias significativas respecto al salino. En **(B)**, (*) Indica diferencia significativa de muscimol respecto al salino. En **(C)** (*) Indica diferencia significativa de muscimol microinyectado en RAIC L /AMY R respecto al salino. (**) Indica diferencia significativa de muscimol microinyectado en RAIC R /AMY L respecto al salino Todos los valores de p significativo son $p < 0,05$.

V.III.II.II Efecto de la inactivación bilateral de la RAIC en el aprendizaje y extinción del miedo condicionado

Con el propósito de determinar si efectivamente la desconexión es relevante y que no basta con inactivar la corteza, evaluamos bajo el mismo protocolo (Fig. 45 A) la adquisición y extinción del aprendizaje asociativo del miedo .El *freezing* expresado por los

animales 24 hrs. después la infusión de muscimol es igualmente elevado 77% y similar al grupo control, 81%, (Fig. 45 B). Este resultado, junto con el trabajo de lesión sugiere que por sí sola la RAIC no influye en la adquisición y expresión del miedo, pero sugiere fuertemente que la RAIC podría participar en la mantención del miedo condicionado o su inactivación potencia y/o acelera la extinción. El ANDEVA de dos vías no reveló diferencias significativas durante la extinción. Sí existen diferencias en el día 3, test de (Mann-Whitney) $p < 0,005$. El análisis anatómico de las cánulas se puede observar en la figura S2 (apéndice).

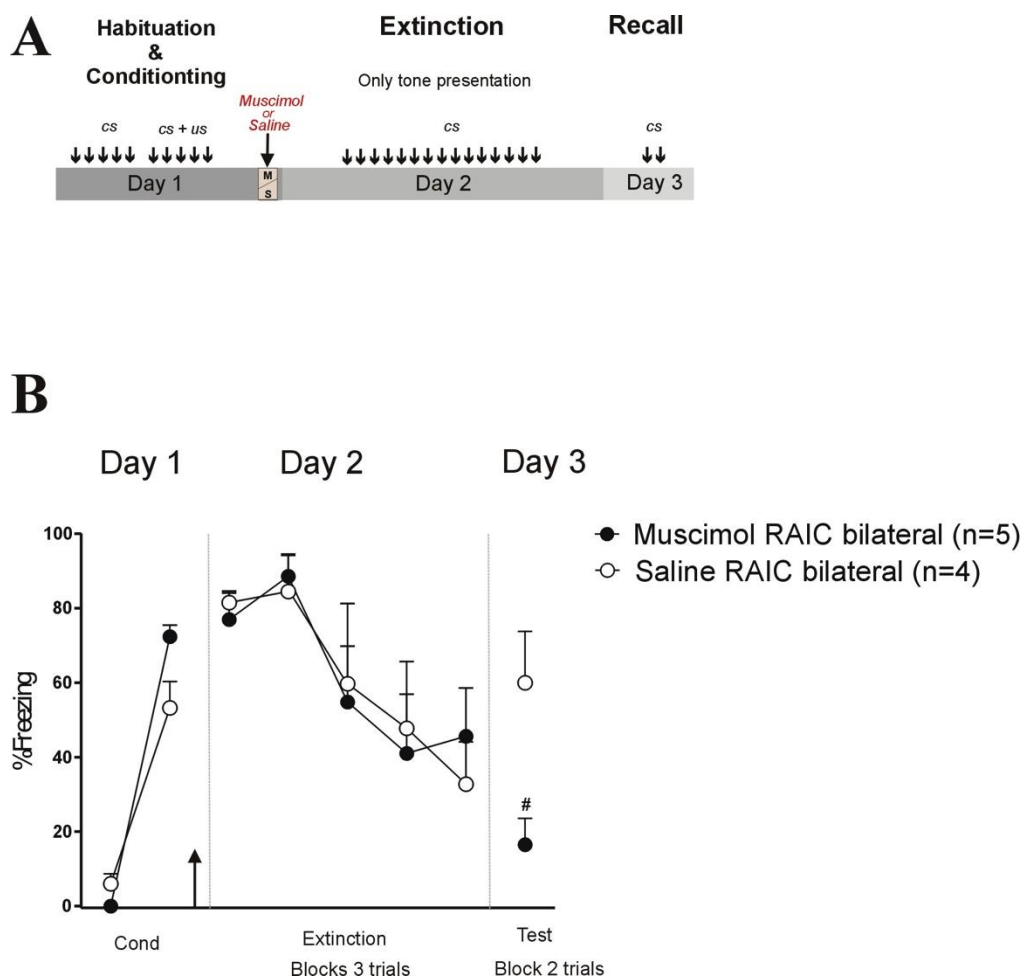


Figura 45. La inactivación bilateral de la corteza insular agranular rostral (RAIC) con muscimol no altera la adquisición ni la extinción del miedo condicionado pero bloquea la recuperación. (A) Protocolo experimental del condicionamiento y la extinción del miedo condicionado. (B) El gráfico de expresión de *freezing* muestra los 3 días del protocolo. En el día 1, inmediatamente después del condicionamiento los animales fueron microinyectados con muscimol (n=5) o salino (n=4). En el día 2 los animales son expuestos al tono en el contexto B. Cada punto representa un bloque de 3 tonos (5 bloques, 15 exposiciones totales). Las ratas tratadas tanto muscimol como salino presentan un *freezing* elevado en el primer bloque, 77% y 81% respectivamente, el cual extingue con las sucesivas exposiciones al CS. En el día 3, los animales son expuestos a dos tonos para evaluar la recuperación; solamente aquellos animales microinyectados con muscimol mantienen la extinción, es decir, no hay recuperación del *freezing*. (*) Indica diferencia significativa de muscimol respecto al salino (t-test).

V.III.II.III *La consolidación del miedo condicionado es dependiente de la comunicación RAIC y BLA*

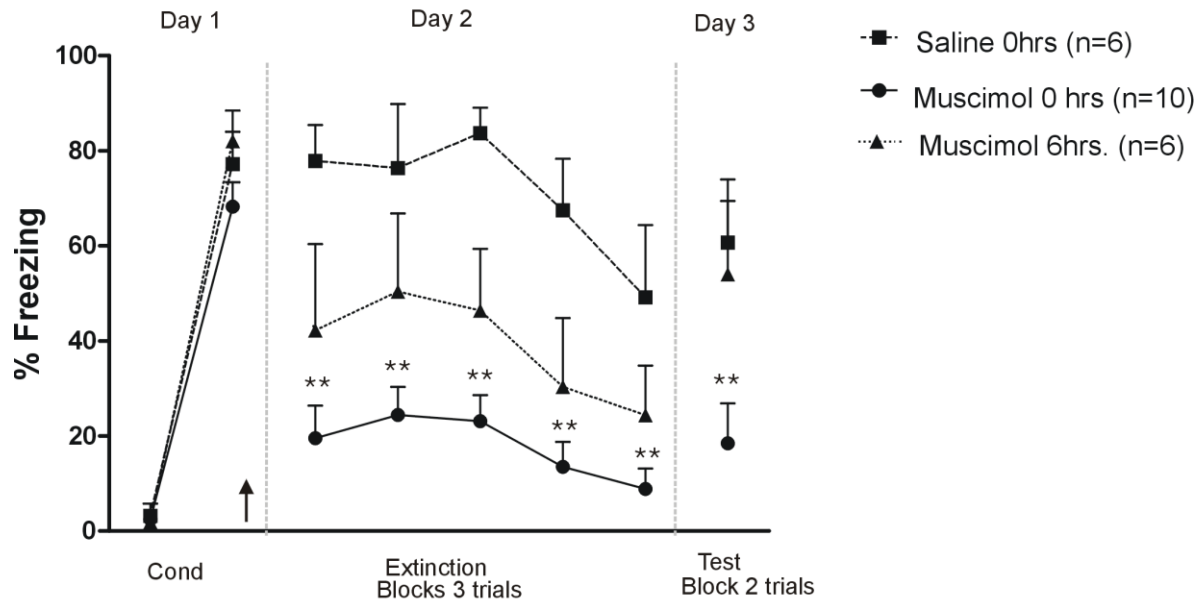
Con el propósito de determinar si existe una ventana de tiempo donde la comunicación entre el sistema interoceptivo y la amígdala participen en la formación y consolidación de la memoria del miedo, efectuamos la inactivación con muscimol 6 horas después del condicionamiento (muscimol 6hrs n=6). Junto con los datos anteriormente mostrados en la Fig. 44 B, la desconexión cruzada mediante la inactivación 6hrs después no impide la adquisición del miedo como sí lo hace la desconexión cruzada inmediatamente después del condicionamiento Fig. 46 A. Se observa entonces que sólo aquellos animales microinyectados con muscimol inmediatamente después del condicionamiento no sostienen el miedo por un período largo de tiempo, es decir se afecta la consolidación del miedo aprendido, lo cual se confirma en la recuperación (día3); en contraste, los animales tratados con muscimol 6hrs post-condicionamiento, quienes presentan un *freezing* elevado en los primeros bloques y que decae con la extinción pero se recupera en el tercer día (ver en fig.

46 C), es decir, los animales microinyectados con muscimol en la RAIC izquierda y BLA derecha inmediatamente después del condicionamiento— tienen una caída del *freezing* respecto al condicionamiento (efecto intragrupo de muscimol 0hrs. RAIC L/AMY D análisis realizado con test de t pareado reveló diferencias entre el condicionamiento y el primer bloque de extinción, $p=0,0011$) no así el resto de los grupos. El test ANDEVA de dos vías de medidas repetidas, realizado en el día 2, dió cuenta de un efecto significativo del tratamiento ($F_{(2, 64)}=4.94$, $p=0.0214$), del tiempo ($F_{(4, 64)}=3.48$ $p=0.0122$) y pero no de la interacción ($F_{(8, 40)}=0,81$, $p=0.5928$). El post-test Bonferroni de comparaciones múltiples, muestra diferencias entre el muscimol microinyectado inmediatamente después con el salino en el primer y tercer bloque, pero no diferencias con el muscimol infundido 6hrs post-condicionamiento. En el día 3, se efectuó un test ANDEVA de una vía y el post-test Bonferroni, el cual indica diferencias existentes en la recuperación, entre el muscimol microinyectado 0hrs y 6hrs después, $p<0,0001$ (ver figura 46 C) pero no entre muscimol 0hrs y salino 0hrs. Todos los valores con diferencia significativa en el día 2 $p < 0.05$.

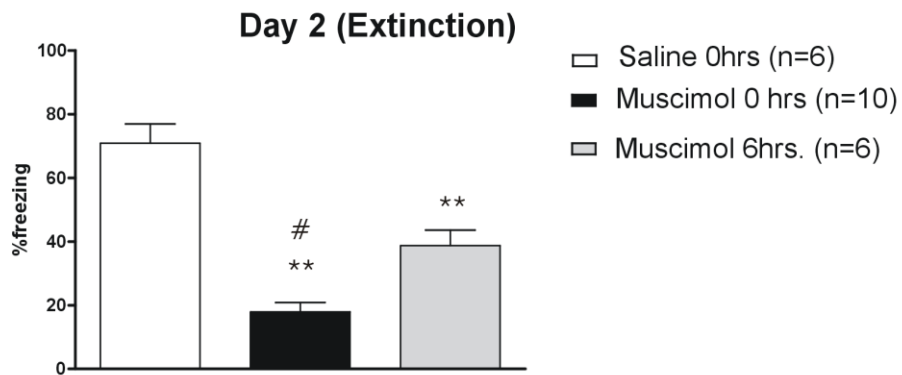
Si bien es cierto, estos análisis dan cuenta de una diferencia dada por el tiempo en el cual se inyecta el muscimol, aún son insuficientes y dejan ciertas dudas respecto a su efecto. Con el fin de demostrar de mejor manera la ventana de tiempo en la cual interacciona la RAIC y la BLA para la adquisición y consolidación de la memoria evaluadas en el *freezing* al día siguiente, nosotros reunimos el conjunto de datos de cada grupo y promediamos el *freezing* total por grupo, como se puede ver en la figura 46B. De esta manera se aprecia mejor el efecto de la desconexión inmediatamente después del condicionamiento, el cual muestra un promedio de *freezing* menor (17,5%) que el salino (60,92%) y, más importante aún, que aquellos animales cuya desconexión se efectuó 6hrs

más tarde (38,7%). El análisis estadístico realizado (ANDEVA de una vía, previo se efectuó el test de normalidad Kolmogórov-Smirnov) reveló diferencias entre todos los grupos, todos los valores de p significativo son $p < 0,05$.

A



B



C

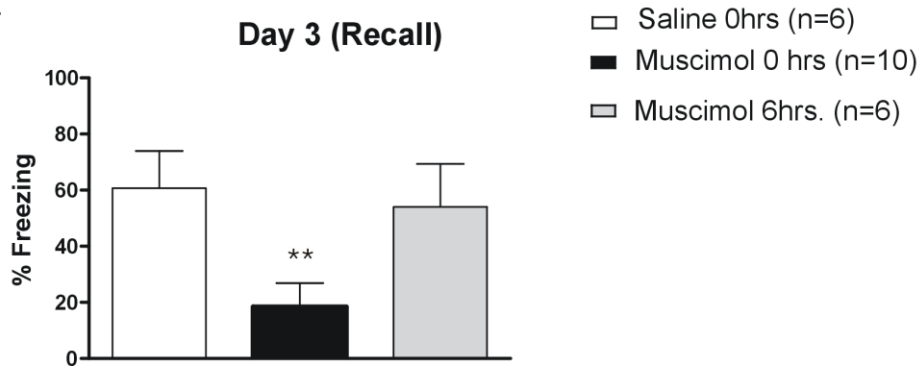


Figura 46. La consolidación del miedo condicionado es dependiente de la comunicación entre RAIC y BLA. (A) Se realizó el mismo protocolo de extinción visto en la fig. 49 A. Junto con los datos vistos anteriormente, microinyección de muscimol inmediatamente después del condicionamiento (muscimol 0hrs. n=8) y de salino inmediatamente después del condicionamiento (saline 0hrs. n=5) se microinyectó un grupo de animales 6 horas después del condicionamiento (muscimol 6hrs n=6). Se observa que aquellos animales microinyectados con muscimol inmediatamente después del condicionamiento pierden el miedo aprendido, lo cual se confirma en la recuperación (día3); no así con los animales muscimol 6hrs post-condicionamiento, quienes presentan un *freezing* elevado en los primeros bloques y que decae con la extinción pero se recupera en el tercer día (ver en C). **(B)** Promedio de *freezing* en el protocolo de extinción (día 2). El promedio de *freezing* de los animales microinyectados con muscimol inmediatamente después del condicionamiento es mucho más bajo que el de los animales muscimol 6hrs ($p<0,05$) y que los microinyectados con salino. El promedio de *freezing* de los animales muscimol 6hrs muestra una diferencia significativa con el grupo microinyectado con salino. En **(C)** Promedio de *freezing* en la recuperación (día 3). Sólo aquellos animales microinyectados con muscimol 0hrs. mantienen un *freezing* bajo, mientras que aquellos microinyectados con muscimol 6 hrs. recuperan el *freezing* extinguido. En (B), ** indica diferencia significativa de muscimol 0hrs respecto al salino y (#) indica diferencia significativa de muscimol 0hrs con muscimol 6hrs y salino. En **(C)** ** indica diferencia significativa de muscimol 0hrs con ambos grupos. Todos los valores de p significativo son $p<0,05$.

Para determinar si el efecto de la lateralización se extiende en el tiempo y altera la consolidación de las memorias aversivas, al igual que en la figura 44 C, realizamos una separación de los datos en relación a la desconexión efectuada ya sea en ínsula izquierda y amígdala derecha o ínsula derecha y amígdala izquierda, para los animales microinyectados con muscimol 0hrs y 6hrs después del condicionamiento (Fig. 46 A, B y C).

Cuando se observa las curvas de extinción de los cuatro grupos, muscimol 0 hrs. RAIC L/AMY D n=5, RAIC D/AMY L n=3; muscimol 6hrs. RAIC L /AMY D n=3; RAIC D/ AMY L n=3) Se nota que los animales microinyectados con muscimol en la RAIC izquierda y BLA derecha inmediatamente después del condicionamiento, tienen una caída

del *freezing* respecto a los animales con microinyección en la RAIC derecha y BLA izquierda 6hrs. después (Fig. 47 A). El test ANDEVA de dos vías de medidas repetidas, realizado en el día 2, mostró un efecto significativo del tratamiento ($F_{(3, 64)}=5.64$, $p=0.0159$), del tiempo ($F_{(4, 40)}=5.75$ $p= 0,0009$), pero no de la interacción ($F_{(12, 40)}=0.98$, $p=0.4838$). El post-test Bonferroni de comparaciones múltiples, muestra diferencias entre el muscimol microinyectado inmediatamente después con el salino en RAIC L/BLA D en el primer, segundo y tercer bloque. Todos los valores de p significativo son $p<0,05$. Cuando evaluamos el *freezing* total durante la extinción en cada grupo (Fig. 47 B), se observa que los animales microinyectados con muscimol inmediatamente después del condicionamiento en RAIC L / AMY D tienen un *freezing* significativamente menor respecto a los dos grupos (0hrs y 6 hrs) con infusión RAIC D / AMY L (test de t, Mann Whitney $p <0,005$) y los animales muscimol 6hrs RAIC L /AMY D presentan un *freezing* significativamente más bajo que los dos grupos (0hrs y 6 hrs) con infusión RAIC D / AMY L (test de t, Mann Whitney $p <0,005$). Cuando evaluamos el tercer día, sólo los animales con infusión 0hrs. en RAIC L /AMY D, tienen un bajo y significativo *freezing* respecto a los dos grupos microinyectados 6 horas después del condicionamiento (Test de t, Mann Whitney $p <0,005$). Es decir aquellos animales con la desconexión cruzada después del condicionamiento e independiente del lado, muestran en el día 3 un bajo *freezing* (aunque el grupo RAIC D /AMY L, no es significativo), los animales con la desconexión 6 hrs después recuperan el *freezing*, y su efecto es similar al visto con la infusión de salino inmediatamente después del condicionamiento (Fig. 47 C) Juntos estos resultados confirman que la desconexión RAIC y BLA alteran la adquisición del aprendizaje asociativo del miedo, y además sugieren fuertemente la existencia de una ventana temporal

de comunicación entre estos dos sistemas y respalda la idea de una lateralización del aprendizaje asociativo emocional.

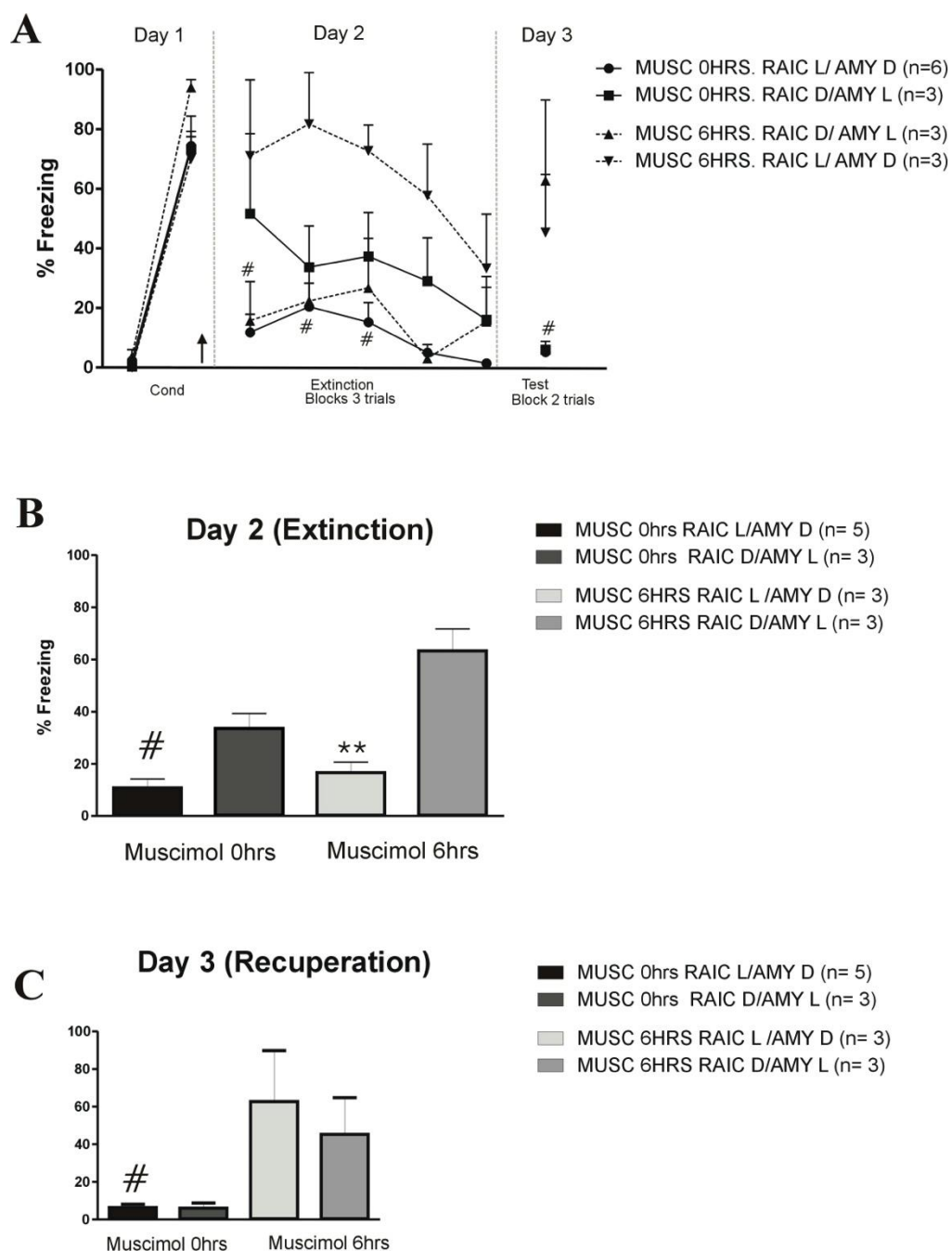


Figura 47. La lateralización en la consolidación del miedo condicionado. (A) Se realizó el mismo protocolo de extinción visto en la fig. 49 A. Se analizaron los animales microinyectados con muscimol inmediatamente después del condicionamiento y 6hrs después del condicionamiento. En **(A)** se observan las curvas de extinción de los cuatro grupos (muscimol 0hrs. RAIC L/AMY D n=5, RAIC D/AMY L n=3; muscimol 6hr. RAIC L /AMY D n=3; RAIC D/ AMY L n=3). Aquellos animales microinyectados con muscimol en la RAIC izquierda y BLA derecha muestra una caída del *freezing* respecto al condicionamiento (efecto intragrupo del muscimol), pero solo aquel grupo inyectado inmediatamente después del condicionamiento es diferente del resto de los grupos inyectados en la RAIC izquierda y BLA derecha. **(B)** Promedio de *freezing* en el protocolo de extinción (día 2). El promedio de *freezing* de los animales microinyectados con muscimol inmediatamente después del condicionamiento y 6 horas después del condicionamiento. Como se vió en A, sólo el grupo MUSC 0hrs. RAIC L/AMY D fue significativamente menor que el resto de los grupos, mientras que el grupo MUSC 6hrs RAIC D/AMY L presentó un menor *freezing* respecto al MUSC 6hrs RAIC D/ AMY L. En **(C)** Promedio de *freezing* en la recuperación (día 3). Sólo aquellos animales microinyectados con muscimol 0hrs. en RAIC L/ AMY D mantienen un *freezing* significativamente bajo, mientras que aquellos microinyectados con muscimol 6 hrs. recuperan el *freezing* extinguido. En (A), (#) Indica diferencia significativa de muscimol 0hrs RAIC L /AMY D respecto a MUSC 6hrs RAIC D/ AMY L. En (B) y (#) indica diferencia significativa de muscimol 0hrs RAIC L /AMY D respecto al resto de los grupos y (**) diferencia MUSC 6hrs. RAIC L/AMY D respecto a MUSC 6hrs RAIC D/ AMY L. En **(C)** (#) indica diferencia significativa de muscimol 0hrs RAIC L /AMY D respecto al resto de los grupos. Todos los valores de p significativo son $p < 0,05$.

V.III.II.IV *Efecto de la desconexión cruzada en el aprendizaje y extinción del miedo condicionado bajo un paradigma de estrés post-traumático*

Para determinar si la conectividad funcional entre RAIC y la amígdala es fundamental en la adquisición de memorias emocionales, o sólo en su expresión, nosotros realizamos la desconexión pero de manera reversible, esto es inactivamos por un periodo de tiempo específico utilizando muscimol la RAIC y la BLA. Esta desconexión cruzada se realizó inmediatamente después de cada condicionamiento y sigue el protocolo que se observa en la figura 48 A. Veinticuatro horas después del segundo día de condicionamiento se evaluó el aprendizaje del miedo condicionado, con la exposición al tono en el contexto B, tal como se hizo en el experimento anterior. Aquellos animales con la desconexión con muscimol mostraron un menor *freezing* que aquellos animales microinyectados con salino en el test 1 En la Fig. 48 B, la desconexión cruzada animales con infusión de muscimol en RAIC derecha y amígdala izquierda junto con animales en infundidos con muscimol en RAIC izquierda y amígdala derecha muestran un *freezing* bajo (48%) vs aquellos animales con infusión de salino post- condicionamiento (98,57%). Si bien es cierta esta diferencia es estadísticamente significativa 24hrs. y 144hrs. después del condicionamiento, se puede observar que los dos grupos varían ampliamente en la expresión de *freezing* del test 1 al test5. En el test 6 la expresión del *freezing* es similar, y desde este punto en adelante el grupo salino continua disminuyendo el *freezing*, mientras que aquellos animales con la desconexión cruzada tienen a recuperar levemente el *freezing*. El test ANDEVA de dos vías de medidas repetidas mostro un efecto significativo de la interacción ($F_{(7, 91)}=4.28$, $p=0.0004$), el tiempo ($F_{(7, 91)}=4.69$, $p=0.0004$) y del tratamiento solo ($F_{(7, 91)}=10.15$, $p=0.0071$). El post-test de Bonferroni confirma el efecto de la

desconexión con muscimol, con bajos niveles de *freezing* en las ratas con desconexión cruzada en relación a las ratas salina en el test 1 y test 5. (Fig. 50 B, todos los valores de $p < 0.05$).

Estos resultados confirman que la comunicación funcional de la corteza insular con la amígdala es relevante en la adquisición del miedo condicionado. Además siguen fuertemente que existe una alteración en la extinción del miedo condicionado cuando se ve alterada la adquisición.

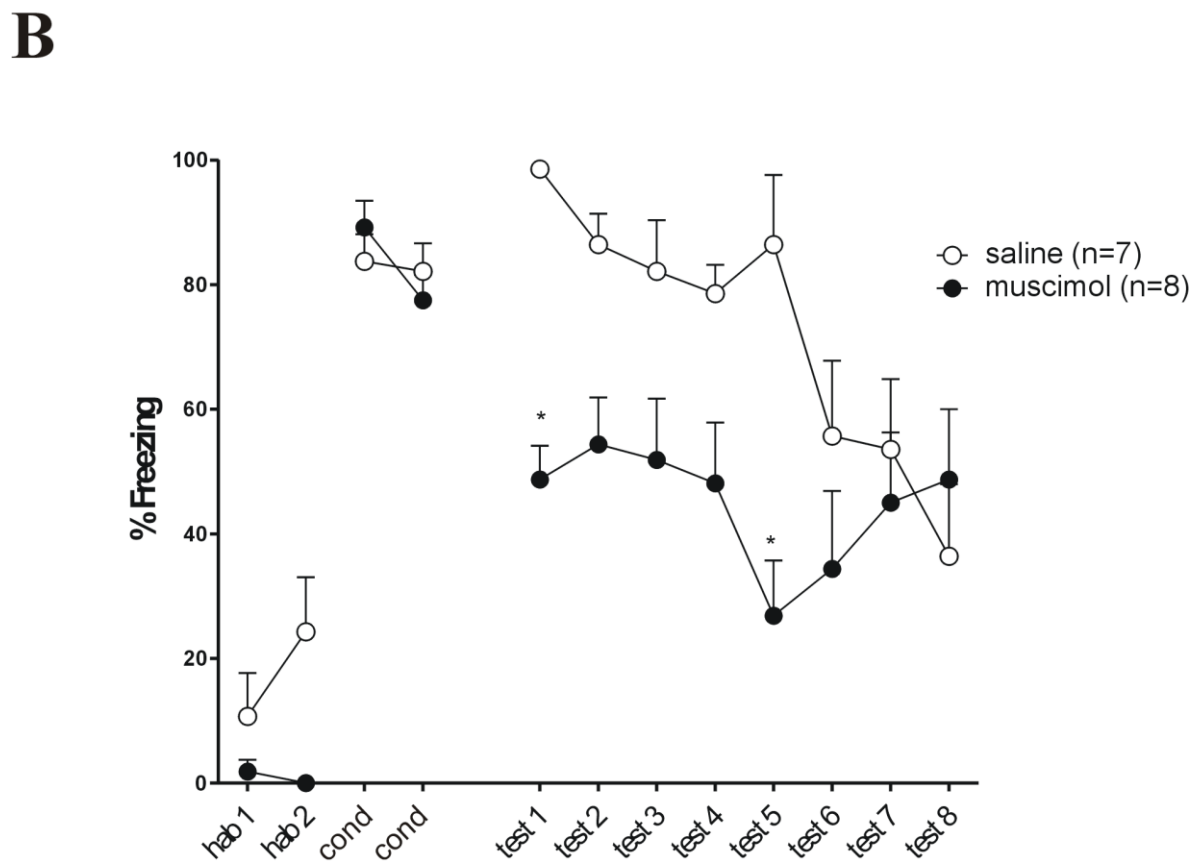
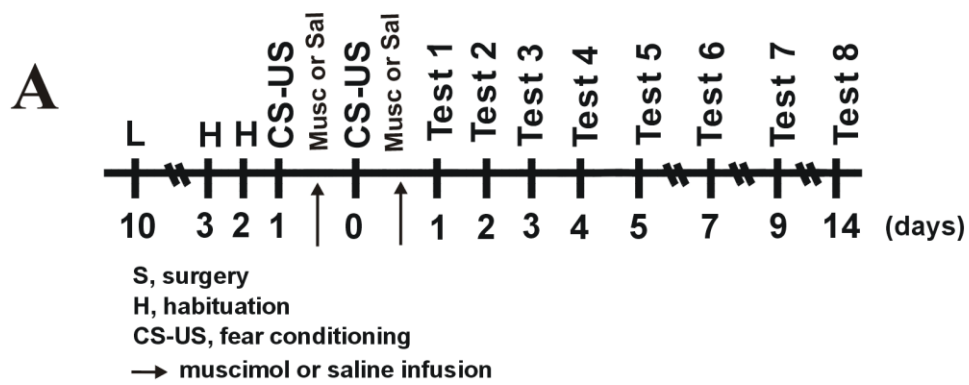


Figura 48. La desconexión de la corteza insular y la amígdala, mediante la inactivación cruzada de la corteza insular agranular rostral y la amígdala basolateral con muscimol altera la memorias emocional de miedo a largo plazo. (A) Protocolo experimental del condicionamiento y la expresión del miedo condicionado. **(B)** Porcentaje de *freezing* en el contexto B, después del condicionamiento los animales son expuestos solo al tono asociado con el *footshock*, aquellos animales con la desconexión cruzada (Muscimol n=8), presentan un *freezing* muy bajo (48%) vs aquellos animales con infusión de salino (n=7) post-condicionamiento (98,57%) durante el test 1. Desde el test 2 al test 4, no hay diferencias significativas entre muscimol y salino. Sin embargo en el test 5 hay una caída en los animales infundidos con muscimol (39%) y un aumento en los salinos (86%), lo cual es significativamente diferente. (*) Indica diferencia significativa de muscimol respecto al salino. Todos los valores de p significativo son $p < 0,05$. El análisis anatómico de las cánulas se puede observar en la figura S3 (apéndice).

V.III.II La corteza insular granular es relevante en la expresión del miedo condicionado

Efecto de la inactivación de la corteza insular interoceptiva primaria durante la reactivación de la memoria testeado en la expresión del miedo condicionado

Para evaluar el rol de la corteza insular en la reconsolidación de las memorias de miedo, nosotros inactivamos la región parietal rostral de la ínsula granular inmediatamente después de la primera reactivación usando NeoSTX. Para evaluar la especificidad de la inactivación insular infundimos NeoSTX en una corteza adyacente como la SSp o salino en la ICgPAr de las ratas condicionadas. 24 horas después del condicionamiento, todas las ratas mostraron niveles similares de condicionamiento al *freezing* durante la primera presentación del tono el contexto B (Fig.49b, Test 1, ANDEVA de una vía, $p=0.8046$). En

los días que continúan, las ratas microinyectadas con NeoSTX en la ICgPAr mostraron una significativa disminución del *freezing* en el contexto B en relación a las inyectadas con NeoSTX en SSp o Vehículo en la ICgPAr. Se observó una significativa disminución del condicionamiento a *freezing* en todos los tests de las ratas ICgPAr con NeoSTX, incluso 29 días después de la infusión (Fig. 49b Tests 2-11; ANDEVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples Bonferroni, $p < 0.0001$) mientras que las ratas inyectadas con NeoSTX en la SSp (ANDEVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples Bonferroni, $p < 0.0001$) o vehículo en la pIC (ANDEVA de una vía seguido del test de comparaciones múltiples Bonferroni, $p < 0.0001$) mostraron altos niveles de *freezing* hasta 10 días después de la inactivación cortical (Fig 49 b, Tests 2-7). Test ANDEVA de dos vías de medidas repetidas mostró un efecto significativo del tratamiento ($F_{(2, 160)} = 20.39$, $p < 0.0001$), el tiempo ($F_{(10, 160)} = 24.21$, $p < 0.0001$) e interacción ($F_{(20, 160)} = 3.67$, $p < 0.0001$). El post-test Bonferroni reveló bajos niveles de *freezing* en las ratas NeoSTX ICgPAr en relación a las ratas vehículo en pIC y NeoSTX SSp en los tests 2-6 (Fig. 42 b, todos los valores de $p < 0.05$).

El *freezing* inducido por contexto en el contexto A fue también afectado por la inactivación de ICgPAr (Fig. 49c). Las ratas condicionadas infundidas con NeoSTX en la ICgPAr mostraron menor *freezing* inducido en el contexto A (el contexto en cual ocurrió el condicionamiento) que los grupos controles. ANDEVA de dos vías de medidas repetidas mostró un efecto significativo del tiempo e interacción ($F_{(18, 144)} = 2.04$, $p = 0.0111$). El post-test Bonferroni reveló bajos niveles de *freezing* en ratas NeoSTX ICgPAr cuando son comparadas con las ratas microinfundidas con vehículo en ICgPAr en los 3-9 o en los test

4-9 en relación a las ratas microinfundidas con NeoSTX en SSp (Fig. 49 c, cada valor de $p < 0.05$).

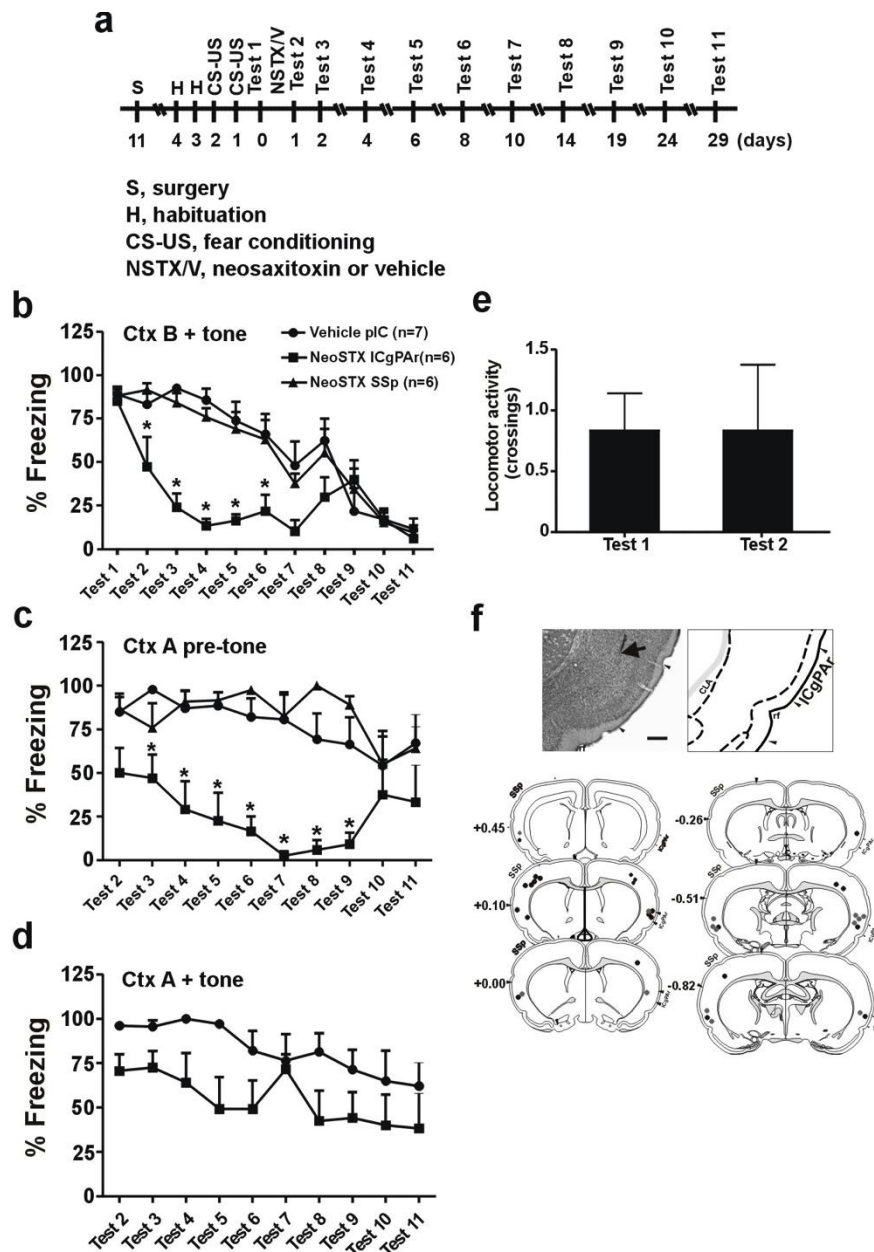


Figura 49. La inactivación de la corteza insular granular parietal rostral altera la expresión del miedo condicionado. **(A)** Protocolo experimental del condicionamiento y la expresión del miedo condicionado. **(B)** porcentaje de *freezing* en el contexto B, después del condicionamiento los animales son expuestos solo al tono asociado con el *footshock*, inmediatamente después del test 1 las ratas eran inyectadas con NeoSTX en la corteza insular, o en la corteza SSp o salino en la corteza insular. Sólo los animales con inyección de NeoSTX en ICgPAr, disminuyeron su *freezing* en el test 2 y los test siguientes de manera sostenida. El asterisco indica $p < 0,05$. **(C y D)** porcentaje de *freezing* en el contexto A, aquellos animales con NeoSTX en la corteza insular disminuyen la expresión del *freezing* cuando está solo la clave de contexto (pre-tono en **C**), ya que cuando están todas las claves (contexto más tono, en **D**) no existen diferencias en relación a infusión de NeoSTX en SSp o salino insula. **(E)** La inyección de NeoSTX en la corteza insular no altera la actividad locomotora en los animales cuando se evalúa el test 1 y test 2. **(F)** En la región superior izquierda, fotomicrografía representativa del sitio de inyección, a la derecha un esquema representativo del atlas de Swanson del área inyectada. En la parte inferior esquemas representativos del posicionamiento de cánulas. Barras de error indican error estándar; n es el número de ratas.

La disminución en el *freezing* de ratas condicionadas observado en ICgPAr con NeoSTX no fue causado por un déficit motor o sensorial, ya que la NeoSTX no tiene efecto sobre el movimiento en general o el procesamiento auditivo (Fig 49 e, test Mann Whitney, $p = 0.3649$). En el contexto A la presentación del tono en las ratas condicionadas con NeoSTX en ICgPAr presentaron un elevado *freezing* durante todos los tests. (Fig 49 d, ANDEVA de una vía de medidas repetidas, Bonferroni post-test; $F_{(9, 45)} = 1.65$, $p = 0.1311$). ANDEVA de dos vías de medidas repetidas mostro un efecto significativo del tratamiento ($F_{(2, 144)} = 7.16$, $p = 0.0215$), time ($F_{(9, 144)} = 2.82$, $p = 0.0055$) pero no de la interacción ($F_{(18, 144)} = 0.58$, $p = 0.8120$). Sin embargo, el post-test bonferroni mostro que no había efecto

significativo. La posición anatómica de las cánulas se observa en la figura. Estos resultados sugieren que la ICgPAr media las respuestas del miedo condicionado y sugiere que podría acelerar la extinción del miedo condicionado.

Efecto de la inactivación de corteza insular interoceptiva primaria en la expresión el miedo condicionado

Para evaluar si la pIC es fundamental en la expresión del miedo condicionado, nosotros la inactivamos previo al tercer test de exposición al tono en el contexto B (día 2) usando muscimol, cuyo efecto dura 3-4 h en lugar de la semana que inactiva NeoSTX. Nosotros evaluamos estos resultados comparándolo con el efecto de la NeoSTX (y los controles que allí se utilizaron). Todas las ratas, al igual que el experimento anterior, mostraron niveles similares de condicionamiento al *freezing* durante la primera presentación del tono en el contexto B (Fig. 50B, test 1, ANDEVA de una vía, $F=0,5944$; $p=0,6253$). Posterior a la inyección de máximo, las ratas microinyectadas en la pIC con muscimol no mostraron una disminución del *freezing* en el contexto B en relación a las inyectadas con vehículo en la pIC (Fig. 50B, test 3, ANDEVA de una vía; $p=0,1055$). Se observó además que, a diferencia de lo que ocurre en las ratas con NeoSTX, estos animales no muestran una curva pronunciada de extinción e incluso se observa que el *freezing* aún sigue siendo elevado respecto a los animales vehículo en la pIC y que poseen NeoSTX en la SSp (Fig. 50B) ANDEVA de dos vías de medidas repetidas, post-test Bonferroni no mostró un efecto significativo del tratamiento ($F_{(2, 144)}=3,48$, $p=0,541$). La inactivación cortical con muscimol no afecta directamente la expresión del miedo condicionado, como se observa en la figura 43.

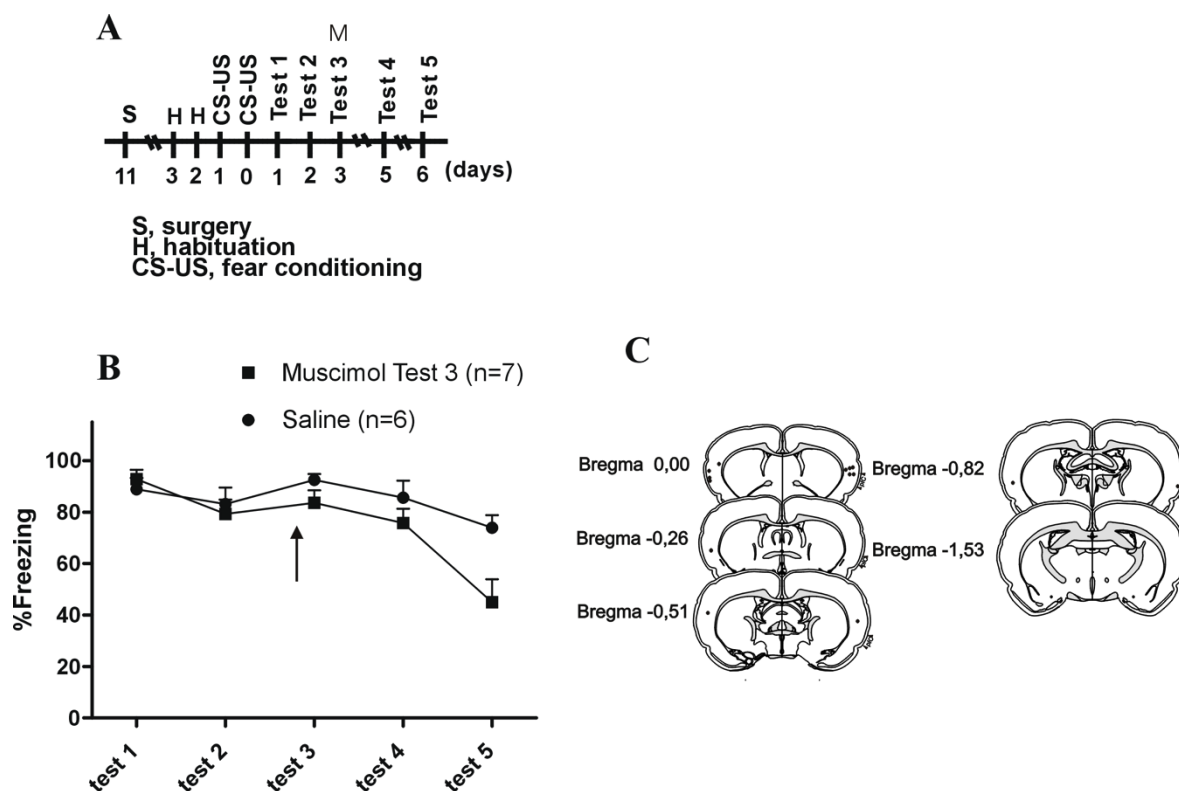


Figura 50. La inactivación de la corteza insular granular parietal rostral (pIC) con muscimol, previo a la exposición al tono, no modifica la expresión de *freezing*. **(A)** Protocolo experimental del condicionamiento y la expresión del miedo condicionado. **(B)** porcentaje de *freezing* en el contexto B; después del condicionamiento los animales son expuestos solo al tono asociado con el *footshock*, previo al test 3 las ratas fueron inyectadas con muscimol en la corteza insular. Las demás curvas son aquellos animales con NeoSTX, en la corteza insular y en SSp y salino en la ínsula. . No hubo efecto con el muscimol. **(C)** Esquema representativos del área inyectada. Barras de error indican error estándar; n es el número de ratas.

VI DISCUSION

Los resultados obtenidos en esta tesis han permitido determinar al menos 4 regiones diferentes de la corteza insular granular de la rata. Estas diferentes áreas de la ínsula granular tienen conexiones recíprocas entre sí, que permitieron proponer una organización jerárquica. Demostramos funcionalmente que la corteza insular agranular anterior (RAIC) y su vínculo con la amígdala son esenciales en el aprendizaje y consolidación de la memoria asociativa del miedo. Sugerimos que este vínculo esta lateralizado e influye fuertemente en las memorias emotivas a largo plazo. Finalmente se demostró que la corteza insular parietal rostral es importante en acelerar la extinción del miedo condicionado, pero no lo es para su expresión.

VI. I. La corteza insular granular presenta cuatro diferentes subdivisiones y está jerárquicamente organizada.

La división clásica de corteza insular anterior y posterior que han planteado diferentes autores, debe ser modificada. Esta división basada en estudios de registros electrofisiológicos gustatorios o viscerales lleva a confusión respecto a la función de la corteza. Debido a su amplia extensión en el eje antero-posterior, cerca de 7mm, y a sus 3 divisiones en el eje dorso-ventral en cortezas granular, disgranular y agranular, es necesario proponer una organización complementaria a la ya existente, la cual debe considerar los nuevos estudios neuroanatómicos, conductuales y electrofisiológicos.

Si bien es cierto hay ideas sobre la extensión de la región interoceptiva primaria en la rata, ella aún no ha sido claramente establecida, y en general se han descrito sus límites en conjunto con la región disgranular y en base a sus conexiones con la corteza

somatosensorial y la amígdala. Nosotros consideramos las proyecciones desde el VPLpc, las proyecciones de otros dos núcleos talámicos VPMpc y el núcleo posterior del tálamo y las proyecciones córtico-corticales como criterios neuroanatómicos para redefinir los límites de la región interoceptiva de la corteza insular. Junto con redefinir los límites de la corteza interoceptiva, hemos sugerido una organización jerárquica y un flujo de información desde la ínsula granular diferente al planteado por otros autores.

En esta parte de la tesis se utilizaron microinyecciones de trazador anterógrado y retrógrado en diferentes regiones de la corteza insular granular, para determinar la posible existencia de una corteza de segundo orden visceral. Los resultados confirmaron la presencia de una región insular granular que es diferente en su patrón de conexiones córtico-corticales y córtico-talámicas con la conocida región parietal granular. Además se demostró la existencia de dos subdivisiones más de esta corteza granular insular.

VI.I.I Corteza insular visceral: La corteza granular anterior es una corteza interoceptiva

El núcleo talámico interoceptivo VPLpc envía sus aferencias exclusivamente a la región granular de la corteza insular. Esta marca se extiende desde 0,45mm por delante de bregma hasta cerca de 1,33mm por detrás de bregma. Además de esta proyección caudal, existe una marca que es consistente en las diferentes inyecciones realizadas en el VPLpc. Esta marca rostral va desde +2,8mm hasta aproximadamente 1,7mm por delante de bregma, y no ha sido descrita previamente. Se ha sugerido que esta región puede ser una zona anterior granular de la corteza insular, lo cual hemos confirmado evaluando sus proyecciones eferentes, las cuales son completamente diferentes de las que se observan en regiones dorsales (no mostradas) o ventrales (RAIC) y diferentes de niveles más caudales

de la región granular; esta región anterior la hemos denominado corteza insular granular anterior (ICgA), mientras que a la región clásica de las proyecciones del VPLpc hacia la región posterior aquí la denominamos corteza insular parietal rostral (ICgPAr), nombre utilizado por Shi y Cassel (1998).

La proyección desde el VPLpc hacia la corteza insular granular parietal descrita aquí difiere levemente con los trabajos más clásicos de estas proyecciones, lo cual puede estar dado por el tamaño de nuestra inyección, ya que es mucho más acotada permitiendo más precisión de las aferencias y con menos errores respecto a la proyecciones de otros núcleos adyacentes al VPLpc en el tálamo. Cecheto y Saper describieron que las aferencias más rostrales terminan en +0,95mm y el límite caudal en -1,4mm; nosotros restringimos el límite rostral hasta +0,45mm. Estudios de registro electrofisiológico (Cechetto 1987; Cechetto 1990; Allen 1991; Saper C. B. 1995; Hanamori y Col 1998) han demostrado que esta zona de la ínsula granular responde a estímulos viscerales y nociceptivos (posiblemente gustatorios, aunque la distinción dorso ventral es poco clara) y estas respuestas fueron registrados entre +2mm y -1,33mm de bregma. Estos límites son aproximados ya que las referencias neuroanatómicas suelen cambiar en estudios diferentes, siendo estas referencias la comisura anterior, el cruce de la arteria cerebral medial o el núcleo lecho de la estría terminal. Los registros dan cuenta de una zona posterior o parietal (nuevamente cambia dependiendo del autor) descrita muchas veces como región visceral sensorial (o interoceptiva) bastante definida, pero a su vez muestran que las respuestas viscerales se extienden más rostralmente al sitio de proyección del VPLpc (Saper C. B. 1982; Cechetto 1987; Cecheto 1990; Allen 1991; Saper C. B. 1995; Hanamori y Col 1998), lo que sugiere la existencia de otro núcleo talámico que está enviando importantes

aferencias viscero-sensoriales hacia regiones rostrales de la corteza insular, y además deja en evidencia que la parte más rostral de la ínsula no puede ser denominada simplemente gustatoria ya que es capaz de responder a estímulos interoceptivos.

VI.I.II La corteza insular parietal rostral es una corteza interoceptiva

La región parietal rostral de la ínsula granular (ICgPAr) presenta proyecciones hacia otras áreas de la corteza insular granular, pero con un patrón diferente en las capas donde llegan sus terminales. Hacia la región anterior presenta densas proyecciones sin un patrón claro de marca, aunque con una gran densidad de proyecciones hacia la capa iv que se extiende desde 2,8mm por delante de bregma hasta +1,7mm. Las proyecciones hacia la ínsula granular posterior (ICgP), son diferentes y se encuentran en ambos hemisferios. Las aferencias hacia núcleos talámicos son principalmente hacia el VPLpc, el VPL y la cara externa del RT.

Esta región ha sido descrita como la región visceral o interoceptiva de la corteza insular. Registros electrofisiológicos realizados en la corteza insular granular denominada posterior (entre 1mm por delante de bregma y 1,5mm por detrás de bregma) indican que sus neuronas responden a una variedad de estímulos sensoriales interoceptivos (Cecheto D. F. and Saper C. B., 1990; Ito S. I., 1998; Saper C. B., 1995; Zhang Z. y Oppenheimer S. M., 2000; Saper C. B., 2002; Ichiyama R. M., Waldrop T. G. y Iwamoto G. A., 2004; Jasmin L y Col 2004). De manera interesante, Cechetto y Saper demostraron que en la corteza insular granular posterior de la rata existe una organización viscerotópica; con neuronas gastrointestinales localizadas rostralmente, neuronas cardiovasculares situadas caudalmente y neuronas quimiosensoriales en una posición intermedia (Cechetto D. F. and Saper C. B., 1987; Cecheto, D. F. and Saper, C. B., 1990). Estas observaciones llevaron a proponer que

esta región de la corteza insular tiene una representación sensorial visceral organizada de una manera similar a la corteza somatosensorial y que tendría un rol clave en el procesamiento de la información visceral.

Trabajos conductuales realizados en nuestro laboratorio, han descrito los efectos de la inactivación de ICgPAr en animales bajo diversos paradigmas conductuales. Casanova y colaboradores en el año 2013 demostraron que la inactivación transitoria de la ICgPAr, llamada pIC en el artículo (por incluir posiblemente áreas ventrales disgranulares y agranulares), en animales bajo con un protocolo de hipoxia intermitente crónica altera algunas variables autonómicas (Casanova y Col 2013). Un importante trabajo realizado por Contreras y col. demostró por primera vez la participación de esta región en el deseo compulsivo en la búsqueda de anfetamina, ya que su inactivación inhibe la búsqueda de droga en el paradigma de preferencia de lugar (Contreras y col 2007) lo cual estaría asociado a la imposibilidad de hacer consciente el malestar asociado al *craving*, y su inactivación suprime el malestar asociado a inyección de cloruro de litio, reforzando esta última idea. Estos resultados sustentan y son antecedentes fundamentales de los resultados conductuales obtenidos en esta tesis y que son discutidos más adelante.

Aunque se ha descrito su función como una corteza interoceptiva, ¿es esta su única función?. Estudios de trazadores y de respuestas electrofisiológica que evalúan las respuestas auditivas de la corteza insular, demostraron que existe una zona que responde a estímulos auditivos y recibe inputs desde diferentes núcleos subcorticales que llevan información auditiva (Rodgers K. et al 2008; Kimura et al 2010). Los límites que se han planteado se han hecho en base a las respuestas electrofisiológicas las cuales coinciden con las proyecciones desde la región auditiva secundaria (VA). Estos límites irían desde 0,3mm

hasta 1,5mm caudales a bregma (en otros van desde -0,5 a -1,5mm) en la región granular (Kimura et al. 2010). En estos mismos trabajos se ha demostrado que la zona caudal a esta zona auditiva sería un área multisensorial, respondiendo a estímulos somatosensoriales, nociceptivos y auditivos.

Además Kimura propone aferencias desde la ínsula granular más caudal. Estas aferencias coinciden en varias regiones con las propuestas aquí pero también describe otras con las cuales discrepamos. Las aferencias hacia regiones prefrontales de manera directa, desde la ínsula granular parietal hacia la corteza agranular más rostral (AId) nos parece que ha sido mal asignada, ya que de acuerdo a diversos artículos previamente descritos (Van De Werd H. y Col 2008; Jasmin L y Col 2004) y según los atlas propuestos por el trabajo de Kimura y aquí también citados, la extensión en el eje dorso-ventral de la capa granular de la ínsula es mayor, y por tanto las aferencias caerían en la zona granular anterior (ICgA). Las proyecciones talámicas coinciden con las descritas en nuestro trabajo, aunque son capaces de describir los grandes botones que se localizan en el Po, posiblemente a que la inyección es menos densa. Nosotros hemos descrito estos terminales con grandes botones hacia el núcleo VPMpc, tipo de aferencia que discutiremos más adelante.

Si bien es cierto estos resultados avalan la idea de una subdivisión de la corteza insular granular caudal en dos zonas completamente diferentes y sugieren que la ínsula granular parietal rostral tendría un límite similar al sugerido en este trabajo, también da cuenta que la región que se ha propuesto como interoceptiva primaria podría también ser un área auditiva, dejando de ser una corteza uni sensorial (monosensorial) a ser una corteza multisensorial.

VI.I.III Corteza insular granular anterior es una corteza visceral secundaria

La región anterior de la corteza insular se ha descrito clásicamente como una zona gustatoria, aunque con poca claridad en el eje dorso ventral de las respuestas electrofisiológicas a sabores. La estimulación eléctrica de la cuerda del tímpano (chorda tympani), rama parasimpática del nervio submandibular y nervios linguales que son responsables del sabor en la parte anterior de la lengua (Yamamoto 1984 y 1987) resultaron en potenciales evocados en la corteza insular anterior, mientras que la estimulación en el glossofaríngeo, noveno par craneal que inerva la parte posterior de la lengua y la faringe, está representada más caudal en la ínsula (Yamamoto 1984; 1987). Si bien es cierto en un inicio se planteó, dado el mapeo de potenciales evocados, que la porción gustatoria estaba en la región anterior de la corteza insular granular (Yamamoto 1984; 1987), estudios posteriores dieron cuenta que la región gustatoria de la corteza insular estaba en la región disgranular y agranular. Mientras que para la región granular anterior se ha demostrado que responde a estímulos termales linguales y no a estímulos gustatorios (Kosar et. al 86).

Los estudios neuroanatómicos de las aferencias talámicas de la región granular anterior de la corteza insular son escasos. El trabajo de mayor precisión de las proyecciones desde la región lateral del VPMpc hacia la corteza insular, demostró que este núcleo proyecta de manera restringida a la región granular y solo hasta 1,7mm rostral a bregma (tampoco detalla con precisión la longitud de las proyecciones en el eje antero-posterior) (Nakashima y Col 2000). Se ha descrito más arriba que la literatura planteaba que el VPLpc envía sus proyecciones hasta aproximadamente 1mm rostral a bregma. En resumen estos trabajos no dan cuenta de la región talámica que proyecta hacia la parte más rostral de la insular granular.

Nosotros proponemos en esta tesis, que ambos núcleos talámicos proyectan hacia la región más anterior de la corteza insular granular y podría ser una región visceral de una organización jerárquica diferente o que represente viscerotópicamente las regiones superiores de nuestro cuerpo. Entonces que esta región que responde a estímulos termales (visceral) es inervada por el VPLpc y VPMpc sería una región visceral anterior cuyo límite rostral sería +2,8 mm hasta +1,7 mm.

Las proyecciones desde la región anterior de la ICgA alcanzan la región interoceptiva primaria. Esta marca se extiende desde +0,45mm hasta -0,51mm. Las proyecciones hacia la ICgPAr sigue un patrón laminar característico de una corteza de alto orden (HO, *high order*) hacia una corteza de primer orden (FO, *first order*). Esta organización laminar, tiene un patrón asimétrico respecto a las proyecciones que recibe desde ICgPAr. Como ha sido descrito por Coogan (Coogan 1990), la organización laminar es un reflejo de la organización jerárquica de las cortezas, y en este caso la región granular rostral sería un área jerárquicamente más elevada que ICgPAr, ya que recibe importantes aferencias desde la ínsula granular parietal rostral, con gran fuerza en la capa iv, organización laminar característica desde una corteza de primer orden (*feedforward projection*) y envía de vuelta (*feedback projection*) aferencias asimétricas.

VI.I.IV Corteza insular granular posterior

Entre corteza insular granular anterior y la corteza interoceptiva primaria, esta una región que hemos denominado región granular posterior (ICgP). Esta es un área intermedia que no ha sido claramente definida.

Como se planteó en nuestros resultados, la inyección en el VPMpc envía aferencias hacia la corteza insular granular a partir de 2,8mm anterior a bregma la cual se extiende con gran densidad hasta 1,45mm anterior a bregma, marca en la ICgA, y luego la marca aparece entre +0,95mm y 0 bregma. Esta última proyección es acotada y representa un área donde sólo el VPMpc proyecta, por lo cual se puede definir como un área completamente diferente de la región interoceptiva primaria (ICgPAr), donde sólo proyecta el VPLpc, y de la región anterior granular que recibe aferencias talámicas de VPLpc y VPMpc. Debido a que un error pequeño puede asignar una aferencia que no existe hacia un área de la corteza insular completamente diferente, nosotros evaluamos de manera exhaustiva las proyecciones y comparamos con aferencias de otros núcleos talámicos realizando un acucioso análisis neuroanatómico para definir con certeza las aferencias del VPMpc.

La proyección del VPMpc hacia la corteza insular granular posterior, ICgP, procesaría información diferente de las otras áreas de la corteza insular granular. La ICgP sería un área visceral secundaria, y la región anterior un área secundaria o multimodal de la corteza granular. Trabajos previos han mostrado que el VPMpc proyecta hacia la región granular, pero de manera acotada (Nakashima y Col 2000), y otros han descrito las aferencias hacia el VPMpc desde la ínsula granular (Shi y Cassel 1998). En este último trabajo se describen aferencias hacia otros dos núcleos talámicos desde ICgP, el VPM y PO. Nosotros encontramos aferencias tanto al VPMpc, VPM y al VAL., siendo esta última aferencia compleja de establecer ya que podría ser parte de la región más rostral del PO. La inyección de trazador retrógrado en esta misma área confirmó la proyección desde el VPMpc, aunque no se observó otro núcleo talámico que proyectará hacia ICgP.

La corteza insular granular posterior (ICgP) es un área que se conecta de manera recíproca con el VPMpc y que proyecta hacia los núcleos VPM y posiblemente el VAL (PO). El VPMpc se ha descrito como un núcleo talámico que transmite información gustatoria, termal y somatosensorial de la cavidad oral (lengua, paladar). La información sensorial proveniente de la cuerda del tímpano, nervios linguales y glossofaríngeos llega ordenada somatotópicamente hasta el núcleo del tracto solitario (NTS) y al núcleo parabraquial (PB). Las neuronas del PB, que reciben aferencias gustatorias y viscerales desde el NTS rostral y caudal, a su vez realizan sinapsis con la región medial y lateral del VPMpc. Se ha planteado que las ramas del nervio facial y el glossofaríngeo pueden ser complementarias, pero distintas de las que provee el sistema trigeminal (que termina en el VPM) y que pueden interactuar tanto a nivel de receptores como de sinapsis centrales; sin embargo, se desconoce dónde interactúan y cuál sería su función. Datos más recientes muestran que la corteza insular granular y la corteza disgranular serían las regiones que más densamente proyectan y reciben de la región dorsolateral del subnúcleo trigeminal caudal (Vc), y del subnucleo oral (Vo) (Sato F. 2013), los cuales envían información nociceptiva de la cavidad oral, y por lo tanto la corteza insular podría ser un buen candidato para la interacción central de estos nervios periféricos.

Las conexiones corticales desde ICgP son escasas y principalmente se dirigen hacia otras áreas de la corteza insular, lo que sugiere que podría ser una corteza de primer orden. Las proyecciones hacia regiones rostrales llegan hacia la ICgA en las capas superficiales y hacia regiones caudales la principal proyección es hacia zonas agranular posterior. A diferencia de otros trabajos, no encontramos proyecciones hacia la región disgranular (gustatoria) de la corteza insular; esto sin duda es controversial, ya que Shi y Cassel,

sugieren un patrón jerárquico de conexiones en base a las proyecciones presentes desde la ínsula granular hacia la corteza disgranular.

Las proyecciones de la corteza insular agranular posterior han sido descritas previamente, y se conoce que sus principales aferencias proyectan hacia regiones rostrales. Llegan a la corteza insular agranular rostral, la posible área de más alto orden jerárquico del sistema interoceptivo la cual podría reunir y procesar toda la información interoceptiva desde la corteza insular granular.

VI.I.V Corteza Insular Parietal Caudal ICgPAc

La región parietal caudal de la corteza insular granular (ICgPAc) se ha descrito por Shi y Cassel 1998 como un área que recibe aferencias desde la corteza somatosensorial secundaria y el núcleo talámico posterior que tienen la representación de las extremidades, y envía aferencias hacia la corteza insular disgranular en niveles más rostrales y parietales, siendo un área de paso de información somatosensorial hacia otras regiones de la ínsula o la amígdala, con representaciones viscerosensoriales con una función poco clara. Los límites rostro-caudales de esta zona serían desde 1,5mm detrás de bregma hasta cerca de 4mm por detrás de bregma.

Nosotros hemos descrito que esta corteza recibe información desde la zona más caudal de la corteza insular granular anterior (ICgA) y parietal rostral (ICgPAr). También recibe aferencias desde la corteza disgranular posterior (+1,2mm -+0,95mm), desde la ínsula agranular rostral ventral y dorsal y desde la región posterior de la corteza insular agranular. Por tanto es un área de convergencia de la información desde las diferentes regiones de la corteza insular, sugiriendo que sería un área de alto orden o multimodal.

También es un área que recibe aferencias de múltiples regiones corticales motoras y sensoriales, las cuales no discutiremos en esta tesis.

A diferencia de las otras regiones de la corteza insular granular, la región ICgPAc recibe aferencias talámicas principalmente desde el núcleo talámico posterior (Po) y los núcleos de la línea media (intralaminares), CM, RH, RE. También recibe leves proyecciones desde una banda ventral del VPMpc. El Po se ha descrito como un núcleo talámico que recibe información del complejo trigeminal, el tracto espinotalámico, el núcleo espinal trigeminal y también desde el colículo inferior, y que proyecta de manera somatotópica hacia las cortezas sensoriales primarias y secundarias. Si bien es cierto es un núcleo que recibe información de diferentes modalidades, la que predomina es la somatosensorial nociceptiva (Gaurian y col 2004).

Se ha sugerido que esta zona de la corteza insular participa en la vía de transmisión de información somática y nociceptiva del estímulo no condicionado hacia la amígdala en un aprendizaje asociativo emocional. Sin embargo, lesiones bilaterales precondicionamiento en la región caudal de la corteza insular parietal (las cuales incluyen la capas granular y disgranular) no alteran la adquisición del condicionamiento a miedo mediado por luz o un tono usando el paradigma de sobresalto potenciado. Cuando esta lesión es combinada con lesiones del extensión posterior del complejo intralaminar la cual incluye al núcleo triangular posterior (PoT), núcleo posterior intralaminar (PIL), el supragenículado (SG), el núcleo subparafasciular parte parvocelular (SPFPC), y posiblemente la subdivisión medial del complejo geniculado medial (MGM), sí afecta la adquisición de la respuesta de sobresalto potenciada (Shi y Davis 1999). Además estudios ulteriores demostraron, con otro protocolo de miedo condicionado, que la lesión combinada

de ínsula parietal caudal y complejo talámico posterior (lesiones hechas después del condicionamiento), disminuyen de manera significativa la respuesta condicionada al tono (Brunzell DH, Kim JJ.2001). En base a estos resultados se ha planteado que esta zona de la ínsula es responsable de una vía difusa para el estímulo no condicionado del *footshock* y sugieren que participaría en el aprendizaje asociativo que se realiza en la amígdala, pero sus resultados son débiles en relación a nuestro trabajo de inactivación de la región rostral a este sitio.

Consideramos que es fundamental comprender cómo la información interoceptiva participa de los procesos de aprendizaje asociativo emocional. En este sentido la región más caudal, al ser un área multisensorial pareciera ser un candidato mejor posicionado para efectuar una alteración, sin embargo el escaso efecto cuando se realizó la lesión bilateral pone en duda su labor en el aprendizaje asociativo, y junto con otros trabajos la posiciona quizás como un área con mayor relevancia en la de percepción de dolor o estímulos somatosensoriales que por sí solos no están involucrados en la adquisición del miedo. Nosotros postulamos que lesionar o inactivar a la región inmediatamente rostral a esta, ICgPAr, tendría efectos importantes ya que es un área que recibe aferencias viscerales de manera directa y sería la estructura clave en procesar información proveniente del cuerpo y en entregar a esta información al resto de las subregiones aquí descritas, principalmente hacia regiones de mayor orden jerárquico como la RAIC, que también sería un blanco adecuado al momento de intervenir sobre la información interoceptiva. (Fig.51 y Fig. 53)

Organización jerárquica de la corteza insular granular

De acuerdo al mapeo de las eferencias y aferencias corticales y talámicas de las diferentes áreas de la corteza insular granular vistas en la primera parte de los resultados de

esta tesis, realizamos una comparación con la organización jerárquica que existen en otros sistemas sensoriales (exteroceptivos), como lo han planteado Sherman y Guillery en diversos trabajos citados aquí. En la Fig. 51 se representan las 4 sub-regiones de la corteza insular granular y sus conexiones córtico-corticales y córtico-talámicas las cuales intentamos cotejar con la organización descrita en la Fig. 1.

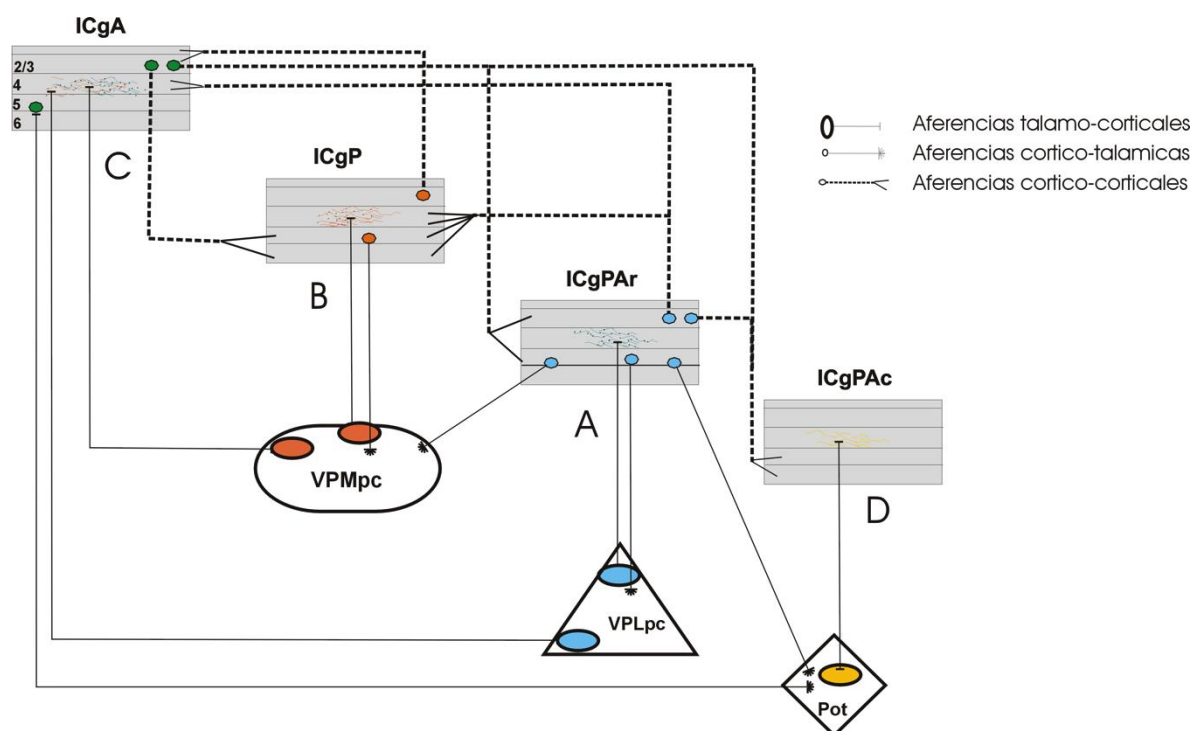


Figura 51. Representación esquemática de la organización jerárquica en la corteza insular granular. En A, ICgPAr recibe su principal inputs talámico desde VPLpc y proyecta hacia el resto de ICg's. Además envía aferencias hacia los núcleos talámicos VPMpc y Po. En B, ICgP recibe su inputs desde el VPMpc, y proyecta solo hacia regiones más rostrales de la corteza insular granular. En C, ICgA Recibe inputs talámicos tanto desde VPMpc como VPLpc, además recibe aferencias de ICgP e ICgPAr y proyecta hacia la región más caudal de la ínsula granular. En D, la región caudal ICgPAc recibe aferencias talámicas de Po, y aferencias corticales principalmente desde la región ICgA y de ICgPAr. Abreviaciones: VPLpc: ventroposterolateral parvocelular; VPMpc: ventroposteromedial parvocelular; Pot: región triangular del núcleo talámico posterior; C-C córtico-cortical.

De acuerdo a los resultados descritos aquí, nosotros reconocemos 4 sub-regiones de la corteza insular granular. La región ICgPAr se conecta de manera recíproca con el núcleo talámico visceral VPLpc (Fig. 51A), además envía aferencias reconocidas como de primer orden (Fig. 23B) hacia el VPMpc y además hacia el Po (no mostradas aquí) lo cual indicaría que el VPMpc y Po son núcleos talámicos de mayor orden jerárquico que el VPLpc para el sistema interoceptivo, y posiblemente que ICgP es una corteza de segundo orden visceral que recibe información visceral del VPMpc y desde la ICgPAr (Fig. 51B). ICgP se conecta de manera recíproca con ICgA pero sin un patrón evidente y envía escasas aferencias hacia regiones de la ínsula granular más caudal, su conexión con el resto de la corteza insular es principalmente con la corteza agranular posterior. ICgA por otra parte parece ser una corteza de más orden jerárquico que reúne información desde ICgP e ICgPAr y además recibe aferencias talámicas desde ambos núcleos interoceptivos (Fig. 30C). Junto con ello, su patrón de conexiones con ICgPAr es evidente y sugiere una organización de una corteza de alto orden (HO) conectada con una de primer orden (FO) como lo ha planteado Sherman y Guillery. Su conexión con las regiones más caudales de la ínsula granular son potentes. La región más caudal (Fig. 51D), ICgPAc, pareciera ser de un dominio sensorial diferente ya que se conoce como un área que recibe información de las cortezas somatosensoriales y del núcleo talámico somatosensorial Po. Nosotros creemos que además reúne información interoceptiva proveniente de manera directa desde ICgPAr y desde la región anterior de la ínsula granular sugiriendo que podría ser un área multisensorial de la corteza insular ya que es reconocida su participación en el dolor, registro sensorial de las extremidades inferiores y transferencia de información táctil a la amígdala.

VI.I.VI Proyecciones al núcleo reticular del tálamo concuerdan con la jerarquía de la corteza Insular granular

Se ha planteado que el núcleo reticular del tálamo es una estructura clave en los procesos atencionales, el cual modula la transmisión tálamo-cortical a través de sus conexiones inhibitorias con los núcleos talámicos (Guillery R. y Col 1998, 2003). El RT recibe inputs colaterales de los axones tálamo-corticales y córtico-talámicos. Ha sido demostrado que la mayoría de los sistemas sensoriales tienen conexiones reciprocas con un sector particular del RT, es decir existen conexiones topográficamente mapeadas de las proyecciones corticales y talámicas.

El sector visceral de RT descrito por Stehberg (Sthenbergh et al,...2001), da cuenta de dos regiones de la corteza insular granular que proyectan de manera diferenciada hacia el tálamo reticular. La región anterior (para nosotros parietal rostral, en -0,5mm de bregma) envía proyecciones axonales a la cara interna del RT, sugiendo que esta sería una posible región secundaria de la corteza insular. Nosotros creemos que la delimitacion de la ínsula anterior no fue bien definida y que los criterios para establecer esa zona como secundaria no son suficientes. Nuestra inyección de trazador anterógrado BDA reveló que la región más anterior de la corteza insular granular (ICgA) marca axones y terminales la cara interna del RT, en un nivel más rostral (-1,78mm) que los descritos para la ínsula visceral. La zona caudal a ésta, la ICgP, proyecta de manera similar que ICgA hacia la cara interna del RT en -1,78mm y también se observa marca en la cara interna en niveles más caudales hasta -2,85mm. La corteza granular parietal rostral, cuya inyección fue realizada en -0,51mm en el eje anteroposterior marca con mucha fuerza la cara externa del RT; esto es completamente diferente de lo planteado por Stehberg 2001. Más caudalmente, la inyección

de CTB en ICgPac marca de manera difusa hacia el RT, siendo esta marca un poco más densa hacia la cara externa en la parte ventral del núcleo, lo cual coincide con las inyecciones realizadas por Kimura y Col 2010 en la región granular más caudal, y más densidad en la cara interna en la región más dorsal.

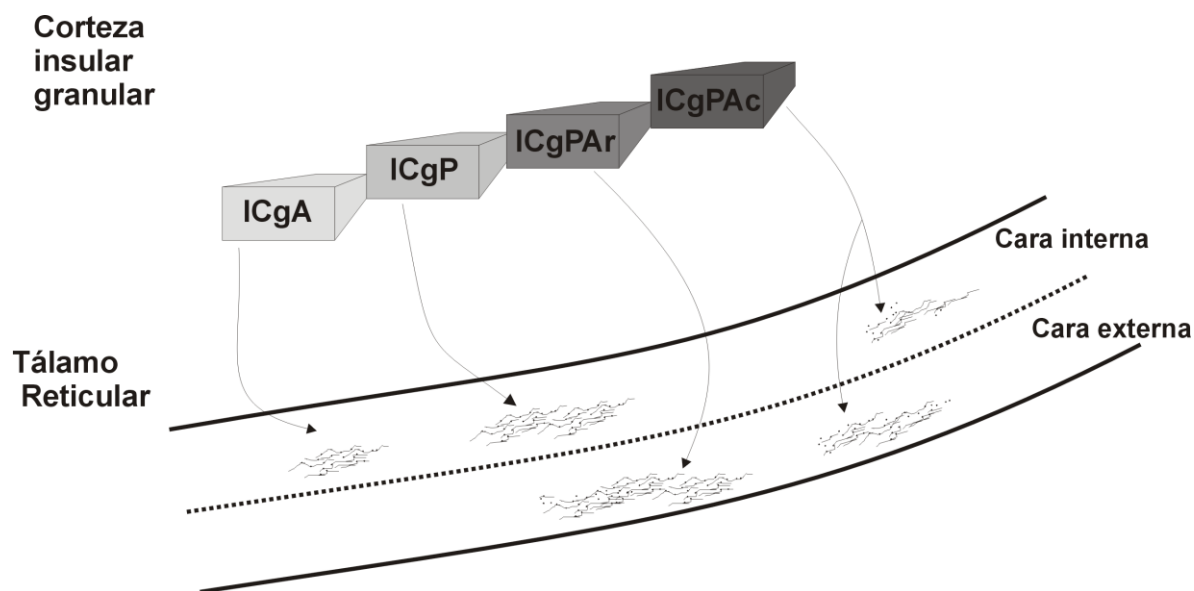


Figura 52. Representación de las conexiones con el núcleo reticular del tálamo. Las aferencias hacia el RT son diferentes en el eje rostro-caudal y en medial-lateral (interno-externo) para las distintas subregiones de la corteza insular granular.

Estos datos reflejan una organización diferencial en las distintas áreas de la corteza insular granular, tal como se ha descrito en diversos trabajos anteriores para otros sistemas sensoriales. Se ha planteado que para cada vía tálamo-cortical funcional y su sector asociado del RT, usualmente hay más de un núcleo talámico o área cortical asociada. Así como los sistemas visuales, auditivos o somatosensorial tienen muchas áreas corticales

asociadas a más de un núcleo talámico (Guillery R. y Col 2003), nosotros, como hemos propuesto en el apartado anterior, planteamos que la ICgPAr es la región primaria del sistema interoceptivo y sus conexiones son hacia la cara externa, como ha sido propuesto previamente. Las regiones más rostrales que tienen un orden jerárquico superior proyectan hacia la cara interna, y la zona más caudal envía sus aferencias hacia ambas caras del RT, todas estas conexiones apoyan la organización jerárquica planteada más arriba.

VI.I.VII El flujo de información interoceptiva llega a la RAIC principalmente a través de la región agranular posterior

Nuestro trabajo es el primero que propone un flujo de información interoceptiva en la corteza insular granular, y ha sugerido la organización jerárquica de esta información. Además nuestros mapeos junto con datos bibliográficos dan cuenta de que esta información continúa su procesamiento llegando hacia las regiones anteriores de la corteza insular, específicamente la región agranular rostral (RAIC). El camino a través de cual la RAIC recibe las aferencias viscerales se ha propuesto en otros trabajos. Nosotros no hemos visto un flujo directo desde las regiones granulares (Kimura y Col 2010), como tampoco hemos visto una gran aferencia hacia las regiones disgranulares, las cuales serían las que proyectarían hacia la región agranular (Shi y Cassel 1998). Nosotros consideramos que el mayor origen de aferencias hacia la RAIC que envían información interoceptiva es la región agranular posterior (Fig. 53) ya que todas las sub-regiones de la ínsula granular proyectan de manera fuerte hacia AIp. Esta región de la cual poco se conoce sobre su organización parece ser un intermediario clave en el procesamiento y envío de información interoceptiva hacia la RAIC, la cual se ha propuesto como un área fundamental en la representación cortical de los estados interoceptivos y que podría participar en conjunto con

la amígdala de la significancia emocional, la que se adquiere al asociar estados interoceptivos con respuestas emocionales, cuestión que discutiremos a continuación en términos anatómicos y conductuales.

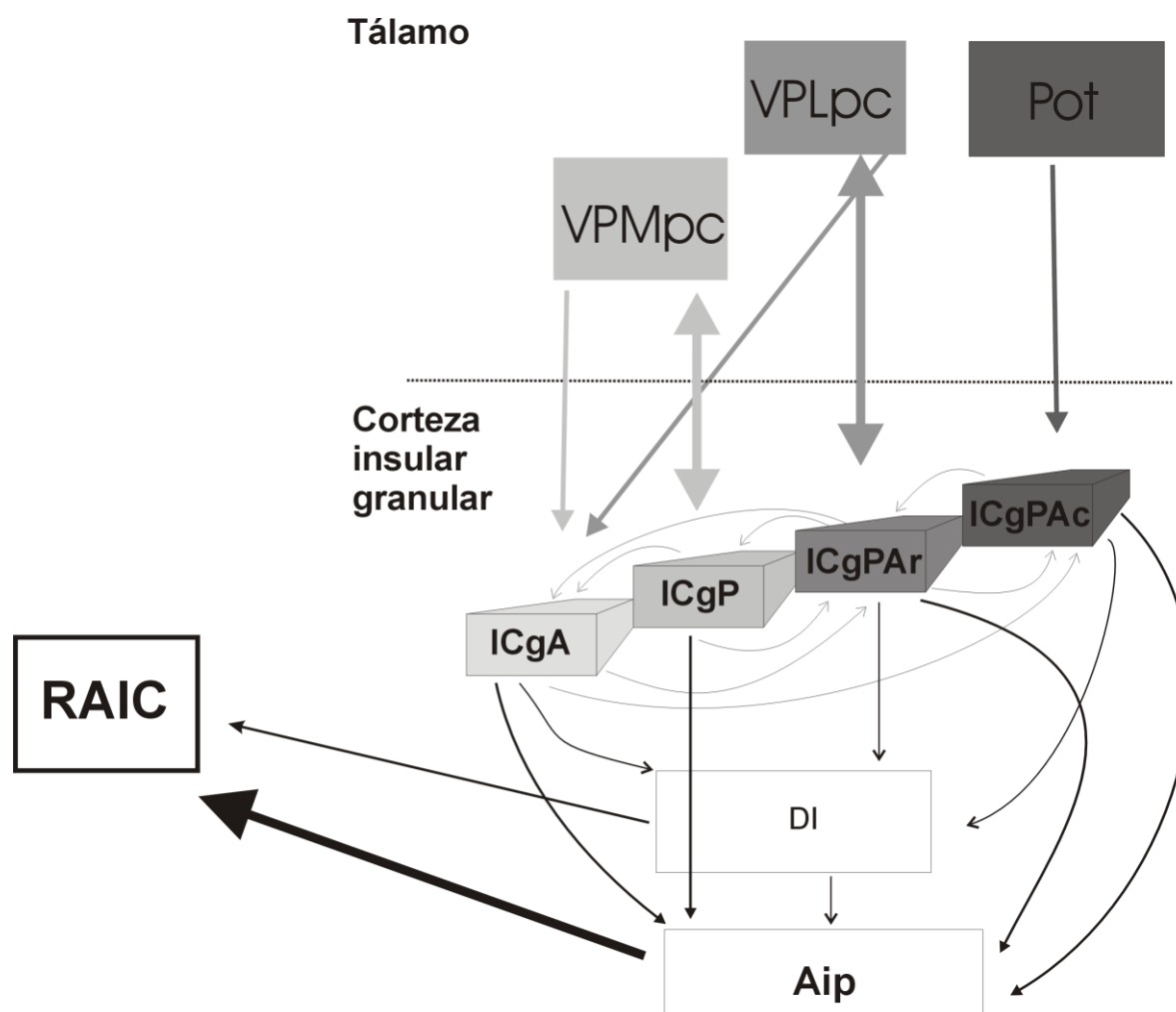


Figura 53. Representación del flujo de información interoceptiva hacia la RAIC. El flujo de información interoceptiva que alcanza las diferentes áreas de la corteza insular granular descitas en esta tesis, llegan a la región de más alto orden de la corteza insular RAIC, atravez de proyecciones desde la insula disgranular y la corteza insular agranular posterior.

VI.II Segunda Parte: La corteza insular Agranular anterior y su vínculo con memorias emocionales

Diferentes autores han planteado que la región anterior de la corteza insular contiene representaciones interoceptivas que proveen una base para los sentimientos subjetivos desde el cuerpo y podría participar del alerta emocional (*emotional awareness*) y, como se ha mencionado antes, proponen la idea de que allí reside una integración de la información interoceptiva de tal manera que los estados emocionales son integrados con estados interoceptivos, lo cual podría ser clave en la representación de los sentimientos subjetivos (Craig, 2009).

La región anterior de la corteza insular recibe las aferencias interoceptivas de las distintas regiones viscerales provenientes de las áreas granulares y disgranulares. La ruta o vía por la cual la RAIC accede a la información interoceptiva sigue en discusión. Se ha descrito que la RAIC recibe las aferencias interoceptivas y viscerales desde regiones disgranulares, en una cadena que va desde áreas granulares a disgranulares y luego a regiones agranulares rostrales y caudales (Shi y Cassel 1998). Otros autores han propuesto que la ruta de acceso vendría directamente desde las regiones granulares, lo cual de acuerdo a nuestros mapeos no ocurre. Nosotros hemos propuesto que la región ICgPAr que se conecta con ICgP envía sus aferencias hacia ICgA, la que a su vez proyecta hacia la AIp. La cual envía potentes aferencias hacia la RAIC.

Por otra parte, se ha planteado que la amígdala recibe aferencias de todas las modalidades sensoriales a través de sus conexiones con el tálamo y las cortezas. El detalle de las conexiones de la ínsula con la amígdala, sugiere que recibe información desde la ICgPAr, regiones disgranulares y la RAIC.

Conectividad de la RAIC con la Corteza prefrontal medial

Aunque las aferencias desde las dos áreas de la región agranular rostral dorsal y ventral habían sido detalladas, nosotros realizamos un complemento neuroanatómico en el contexto del sistema interoceptivo. Las aferencias de la región ventral más relevantes descritas aquí van hacia cortezas prefrontales mediales, la corteza prelímbica (PL) y hacia la corteza orbitofrontal medial (ORBm). Los terminales también alcanzan la región dorsal de la RAIC. Además la corteza infralímbica y no la prelimbica, envía fuertes aferencias hacia AIV (Ver Fig. 54), datos que son similares a los obtenidos por Vertes (Vertes RP. 2004), con trazadores anterógrados en la PFCm. La región AID, en cambio, se conecta de manera recíproca y similar con la PL e ILA sin aferencias hacia ORBm (Fig. 54). Si bien es cierto hay varios trabajos de trazadores en la corteza prefrontal medial (Sessack y Col 1989; Conde y Col 1995; Vertes RP. 2004; Hoover WB y Vertes RP 2007), un trabajo previo realizado por Gabbott 2003 describió importantes conexiones entre AID y la corteza prefrontal medial, donde describen fuertes aferencias de ILA hacia AID (Gabbott y Col 2003), donde nosotros hallamos una leve marca retrógrada.

Conectividad de la RAIC con la amígdala

La conectividad con los núcleos de la amígdala son variadas y han sido estudiadas previamente en la rata (McDonald y Col 1996; Shi y Cassel 1998; Reynolds S. y Col 2005) y en primates (Stefanacci L. y Col. 2000; Miyashita T y Col 2007) e incluso Hamsters (Reep R. Winans S. 1982), aunque sólo algunos han detallado diferencias respecto a subregiones de la RAIC, diferencias que serán discutidas a continuación.

La región ventral de la RAIC, proyecta principalmente hacia núcleos mediales de la amígdala y recibe de los núcleos lateral (LA), y la región basomedial (BMA). La región dorsal en cambio presenta fuertes aferencias hacia el núcleo central de la amígdala, mientras que las conexiones hacia núcleos basales (BLAp) y laterales y el núcleo basomedial en la subdivisión posterior (BMAp) son recíprocas. Comparando nuestro mapeo con descripciones anteriores de estas aferencias, hemos encontrado algunas diferencias importantes. Por ejemplo en McDonald 1996, un estudio ampliamente citado donde realizaron descripciones anatómicas de las proyecciones desde la corteza prefrontal hacia la amígdala extendida, AIV tendría aferencias importantes hacia el núcleo central, cuestión que nosotros no observamos. Esto se debe principalmente a que la inyección de trazador que ellos realizaron es bastante grande e incluso, de acuerdo a los nuevos datos neuroanatómicos, se extiende hacia la región dorsal de la RAIC. Además, la inyección de trazador anterógrado en AId, también muestra algunas diferencias importantes. El sitio de inyección es un tanto más anterior y más dorsal, por lo que consideramos que incluso llega a difundir hacia la región disgranular (Shi y Cassel 1998) y granular, aunque esta última no proyecta hacia amígdala. Los casos 42 y 11 en el artículo de Shi y Cassel 1998, muestran inyecciones realizadas en la región disgranular anterior, y el caso 22, donde la inyección es agranular anterior, muestran proyecciones hacia la amígdala idénticas a las propuestas por McDonald. Nosotros encontramos aferencias hacia las regiones mediales, aunque en menor densidad que AIV, principalmente dirigidas hacia el núcleo BMA, incluso hacia regiones corticales, cuestión no señalada en estos trabajos.

Como ha sido comentado en la introducción, diferentes trabajos han descrito la relación funcional que existe entre la corteza prefrontal medial y la amígdala. Estos trabajos

realizados en el paradigma del miedo condicionado han evaluado la influencia que tienen tanto la corteza prelímbica en la expresión del miedo condicionado (Blum y Col. 2006; Corcoran y Quirk, 2007; Sierra-Mercado D. y Col 2011) como infralímbica (Herry C, Garcia R 2002; Barrett y Col, 2003; Burgos-Robles y Col 2007) en la extinción a través de sus aferencias hacia la amígdala. Se desconoce cómo la región prefrontal lateral contribuye en este proceso, a pesar de las relevantes conexiones descritas. La RAIC entonces, como ha sido descrito en humanos y como hemos descrito aquí, participaría de este proceso de memorias emocionales, cuestión que se discutirá en el siguiente apartado.

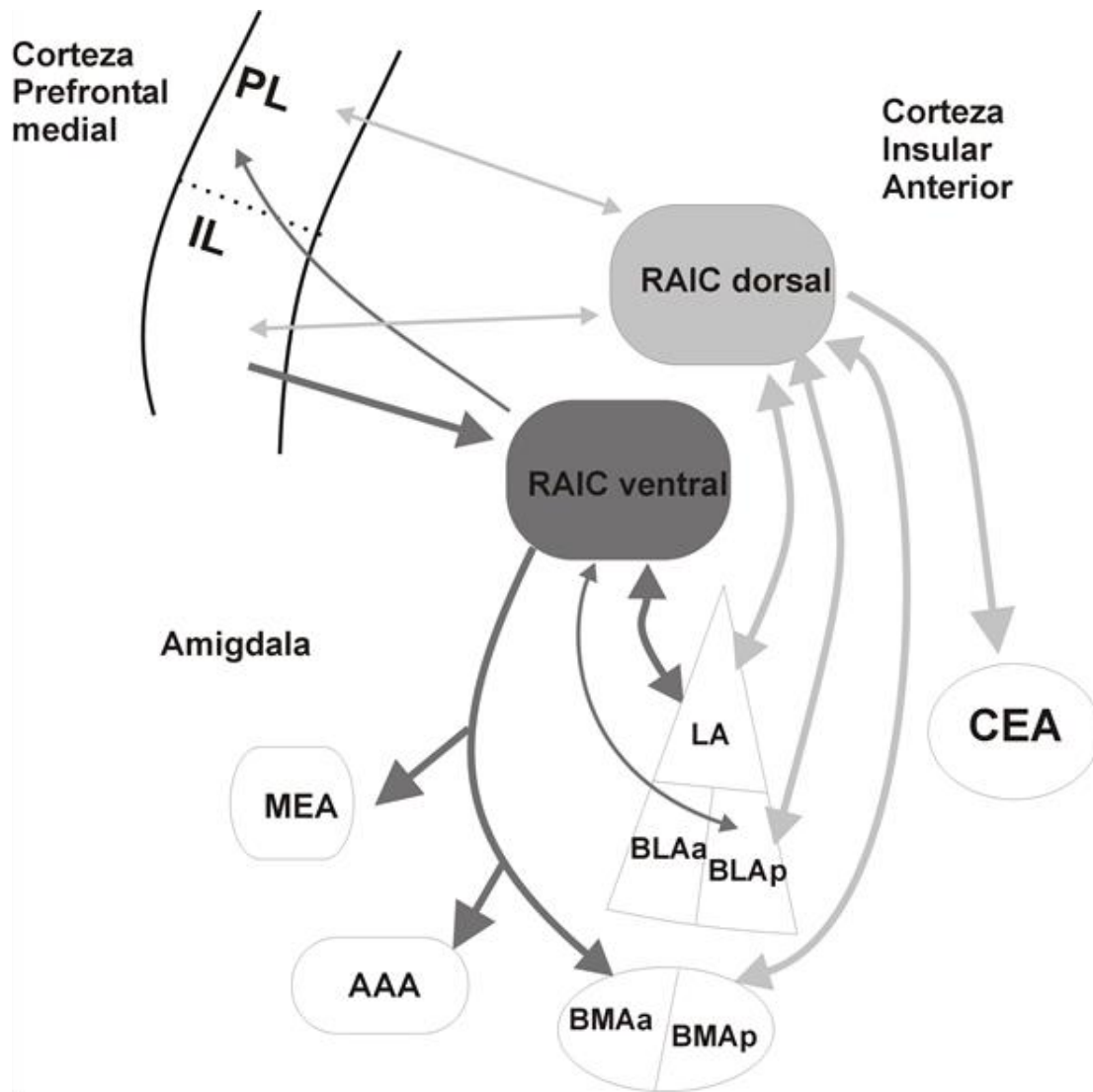


Figura 54. Principales conexiones de las subdivisiones ventral y dorsal de la RAIC hacia la corteza prefrontal medial y los núcleos amigdalinos. La corteza insular granular rostral (RAIC) presenta dos subdivisiones (RAICd, y RAICv) que reciben y envían proyecciones diferenciadas desde la amígdala y la corteza prefrontal medial. Las flechas gruesas y delgadas indican la fuerza de la proyección.

VI.III.I Tercera Parte: Participación del sistema interoceptivo en el miedo condicionado

La corteza insular granular es relevante en la expresión del miedo condicionado

El desarrollo de técnicas como la resonancia magnética funcional (fMRI), la cual permite vincular la actividad neuronal a un evento específico, han permitido estudiar en humanos diferentes procesos cerebrales vinculados con el miedo condicionado, de los cuales se distinguen principalmente la adquisición, expresión y extinción.

Trabajos previos han mostrado un incremento de actividad de la amígdala durante la fase inicial de adquisición y la extinción del miedo. Aunque estos estudios de imágenes funcionales demuestran que la amígdala está involucrada en el miedo condicionado en humanos, no pueden demostrar que es una estructura única e indispensable para tales procesos. La evidencia actual en humanos muestra que en pacientes con lesiones en la amígdala, las cuales suelen ser poco acotadas, existe una alteración del condicionamiento del miedo, medido indirectamente como un índice por los cambios en la actividad electrodérmica (en inglés EDA por *electrodermal activity*). Cabe destacar que los daños a la amígdala no perjudican los recuerdos explícitos del condicionamiento a miedo, sólo las consecuencias afectivas de tal condicionamiento (para una mejor revisión ver Calder AJ y Col 2001)

Los estudios de neuroimágenes han mostrado, además, otras estructuras involucradas en el condicionamiento a miedo. En particular regiones del mesencéfalo/hipotálamo, la corteza cingulada y la corteza insular son activadas consistentemente. Estas han sido implicadas en estudios de procesamiento del miedo en

varias especies animales, pero su rol en humanos aún es poco clara. Diversos trabajos han planteado la idea de un sistema de defensa externa jerárquica, en el cual de manera progresiva, componentes de niveles de alto orden proporcionan soluciones más sofisticadas y flexibles para el problema de evitar el peligro o atenuar el miedo (M. Fendt y Col 1999) y podrían ser necesarias para regular las respuestas autonómicas y el estado interno del individuo.

La teoría de James-Lange argumenta que los cambios en las respuestas corporales son necesarios para la experiencia emocional. Antonio Damasio complementó esta teoría con la hipótesis del marcador somático, en la cual enfatizó el *feedback* corporal, es decir los cambios autonómicos y músculo-esqueléticos generados como consecuencia de un estímulo emocionalmente relevante, que son sentidos a nivel central (*arousal* autonómico), y son una influencia sobre la toma de decisiones motivadas, lo cual sería la base de la conducta emocional y social (Damasio et al., 1991; Bechara et al., 1996, 1997; Damasio, 1994).

Estudios en pacientes con insuficiencia autonómica pura (PAF, por sus siglas en inglés) son incapaces de generar el *arousal* autonómico asociado a un estímulo emocional, debido a la denervación periférica circunscrito al sistema nervioso autónomo (Mathias, 2000). PAF no está asociado con la degeneración central o deterioro cognitivo, y por lo tanto representa un poderoso modelo de déficit por lesión para examinar las consecuencias de una falla en la integración del *feedback* del *arousal* autonómico.

De manera simplista, Critchley postula que las regiones del cerebro que mapean los cambios corporales muestran una actividad disminuida cuando la información aferente está ausente. De manera interesante se ha reportado que la región medial de la corteza insular esta disminuida en pacientes con PAF (Critchley y col 2002)

El miedo condicionado, a través del condicionamiento pavloviano a miedo, ha demostrado ser un ejemplo experimental útil de algunas de las predicciones de la teoría de emociones de James-Lange. La comparación de la actividad cerebral relacionada al condicionamiento mostró una actividad reducida de la región medial de la ínsula derecha y la amígdala derecha en pacientes PAF, a estímulos que típicamente evocan respuestas autonómicas en controles. Esto indica sensibilidad tanto de la región medial de la corteza insular y la amígdala, sobre todo en el lado derecho, a la representación de los aferentes viscerales del *arousal* autonómicos generados por la emoción. Dado el papel de la ínsula como corteza viscerosensorial (Saper C. 2002; Craig A.D. 2002, Craig A.D. 2003), estas observaciones además sugieren un papel de la ínsula derecha en las representaciones emocionales, en donde "sentimientos" surgen de la representación de respuestas corporales (Damasio 1994). Este conjunto de trabajos (revisar Critchely y col 2005) es fundamental en asignar a la corteza insular como un foco de investigación en afecciones de representación emocional.

De acuerdo a nuestro trabajo neuroanatómico y a los antecedentes mostrados más arriba sugerimos la región parietal rostral de la corteza granular como un área fundamental en la vía viscerosensorial donde podríamos encontrar esta representación de los estados interoceptivos. Aquí, al inactivar la región parietal rostral inmediatamente después de la primera reactivación usando NeoSTX, se alteró completamente la expresión del miedo aprendido, incluso 29 días después de la infusión. Esto plantea dos puntos fundamentales. Primero sugiere fuertemente, tal como los trabajos en pacientes con PAF que no generan respuestas emocionales adecuadas, que las ratas al tener inactiva la región que recibe las aferencias viscerales desde el tálamo interoceptivo, son negligentes a los cambios fisiológicos provocados por el tono (el cual luego del aprendizaje asociativo, genera

cambios autonómicos, *arousal* autonómico) lo cual impide al animal generar el estado emocional (y posiblemente el sentimiento) del miedo. Craig, ha descrito la activación de las regiones mediales y posteriores de la corteza insular de humanos en respuesta a estímulos autonómicos (Craig A.D 2002; Craig A.D. 2009)

Segundo, propone que la ínsula podría almacenar memorias emocionales, vinculadas a estados afectivos negativos como el miedo, memoria que se ve alterada al inactivar de manera prolongada esta región. Nosotros hemos descrito que la infusión de anisomicina, un inhibidor de la síntesis proteica, en pIC (para nosotros ahora ICgPAr) suprime la búsqueda de anfetamina inducida por clave, lo que estaría asociado a un efecto amnésico. Junto con esto, la inactivación transitoria con bupivacaina acelera el proceso de extinción. Estos datos en conjunto aportan a la idea de la formación de memoria en esta región de la corteza insular granular en vincular una clave externa con estados internos, lo cual fortalece la idea planteada por nosotros y otros autores de memorias emocionales.

La neosaxitoxina se ha descrito como un anestésico local que actúa, como otros anestésicos locales (ej: lidocaína, TTX, Bupivacaina), inhibiendo los canales de sodio voltaje dependiente. Se ha reportado que la duración del efecto anestésico de la neosaxitoxina es más larga que el de bupivacaina (un anestésico local), incluso más de 24 hrs. cuando se ha testado en humanos (Rodriguez-Navarro AJ y Col 2007). Trabajos no publicados de nuestro laboratorio han testado el efecto anestésico en el sistema nervioso central de la neosaxitoxina, utilizando técnicas de registro electrofisiológico. Esto ha permitido testar dos cosas importantes, primero que su difusión es restringida (cerca de 0,5mm) y segundo que su la actividad neuronal en el centro de la inyección retorna cerca de 7 días después de la inactivación (Contreras y Col no publicado). De acuerdo a estos

reportes la actividad de la corteza insular, sería clave en la expresión del miedo condicionado inducido por clave, aunque cuando inactivamos con muscimol no hubo una disminución en el *freezing*. Esto podría sugerir que la inactivación prolongada tiene un efecto más potente sobre las memorias emocionales, aunque también podría indicar un rol de la corteza insular en los procesos de extinción.

VI.III.II. La interacción del sistema interoceptivo y la amígdala es fundamental en la consolidación del miedo condicionado

Vínculo RAIC y amígdala en memorias emocionales

Con algunas notables excepciones, ha habido pocos intentos de entender cómo el lóbulo temporal medial y la corteza prefrontal podrían trabajar juntos, para construir modelos cognitivos o neurales de sus interacciones. Estudios en humanos (principalmente estudios de neuroimágenes) han mostrado co-activación de algunas áreas de la corteza prefrontal y el lóbulo temporal medial en procesos de memoria, particularmente regiones de la corteza prefrontal medial y del hipocampo, pero poco se ha investigado sobre la interacción de otras regiones prefrontales como la las áreas ventrolaterales donde está la RAIC y su relación con la amígdala, ubicada en el lóbulo temporal.

Emergente evidencia indica que la PFC y el MTL pueden formar parte de una red funcional distribuida de regiones que están involucradas en memoria, donde la contribución relativa de estas regiones es modulada por factores como el procesamiento de memoria que se está llevando a cabo, el material que está siendo recordado y la accesibilidad de la información almacenada. Aunque conocer las contribuciones individuales de las regiones frontales y temporales en el almacenamiento y el recuerdo de las memorias es útil, una

comprensión de la interacción entre estas regiones podría ser fundamental en entender el procesamiento de la(s) memoria(s) emocionales en el cerebro.

Nuestros resultados dan cuenta de una relación fundamental entre la región agranular anterior de la corteza insular y la amígdala basolateral en el aprendizaje asociativo del miedo. Aquellos animales que presentan la desconexión, mediante las lesiones cruzadas con ácido iboténico, no son capaces de aprender el condicionamiento miedo asociado a una clave, cuando se evalúa el miedo en uno o varios test de retención en respuesta a la clave condicionada. Además, la lesión bilateral de la RAIC impide que el aprendizaje se mantenga por sobre 72hrs. después del condicionamiento, no así lesiones unilaterales de RAIC o amígdala.

Es sabido que la amígdala es una estructura fundamental en el aprendizaje y expresión del miedo condicionado, ya que recibe aferencias de diferente origen sensorial tanto de regiones talámicas como corticales que le permiten dar una valencia emocional a un estímulo inicialmente neutro, y luego de esta adquisición inicial ejecutar respuestas emocionales a través de sus eferencias hacia núcleos de control autonómico, cuando el estímulo se presenta en ocasiones posteriores. Se ha demostrado en diversos trabajos que la amígdala es una estructura fundamental en la formación de memorias asociativas durante la adquisición del miedo condicionado (LeDoux y Col 2000, Nader y Col 2000; Schafe GE y Col. 1999; Schafe GE y Col 2000). Además Edmund Rolls, plantea que en la corteza orbitofrontal ocurren asociaciones de un estímulo con su efecto recompensante y que, a diferencia de la amígdala, en esta región las asociaciones pueden ser modificadas, por ejemplo, al cambiar el valor recompensante que tiene un estímulo (Rolls, 1999).

El rol que tienen ambas estructuras en formar asociaciones con estímulos externos está ampliamente difundido en la literatura, sin embargo, es poco claro si el estado interno participa de las asociaciones que realizan estas estructuras o si el estado interno puede evocar o modificar las memorias que allí fueron formadas.

En un artículo previo nosotros hemos descrito que la RAIC almacena memorias vinculadas al contexto donde se ha administrado anfetamina, ya que la infusión de anisomicina (ANI), un inhibidor general de la síntesis proteica, causa una pérdida del condicionamiento a lugar de manera prolongada pero reversible (Contreras y Col 2012). Aunque no es concluyente respecto al almacenamiento de memorias emocionales, sugiere la participación de la RAIC en el recuerdo de una clave asociada a un evento emocional como el consumo de droga. La RAIC es la región de mayor orden jerárquico del sistema interoceptivo (Craig A.D 2002 y 2009) y sería el área de convergencia de la información interoceptiva proveniente de áreas corticales primarias, participando de la percepción consciente de los estados emocionales. La relación anatómica de la RAIC con la amígdala ha sido estudiada, pero poco se conocía de la relación funcional de estas estructuras.

Estudios de lesiones en humanos han dado señales de la importancia de la interacción de estas dos regiones. Se ha descrito que la mayoría de los pacientes con lesiones en el lóbulo temporal y que padecen amnesia experimentan dificultades con el reconocimiento y evocación (*recall*) de la información mientras que pacientes con lesiones en la corteza prefrontal pueden tener un reconocimiento normal, pero un detrimento en el recuerdo o en la recolección contextual (recuerdo contextual).

Un paciente cuya lesión incluye el fascículo uncinado, una importante ruta de conexión entre las áreas frontales y temporales, se mostró particularmente deteriorado al

recordar eventos autobiográficos de su pasado, pero realizó con total normalidad las pruebas de un nuevo aprendizaje. Esto indica que en situaciones complejas, donde hay una recuperación (evocación o *recall*) más elaborada, como en un recuerdo, donde por lo general hay mayores demandas en los procesos de organización, búsqueda estratégica y verificación, las interacciones entre PFC y regiones temporales pueden ser más importantes que ejemplos automáticos de recordar, como muchos casos de reconocimiento basado en la familiaridad.

Otros trabajos de neuroimágenes en humanos han mostrado el correlato neural de un recuerdo emocional negativo. Estos trabajos han descrito actividad en la corteza insular frente a estímulos nocivos, temperatura, ira, tristeza, disgusto así como en emociones positivas como felicidad o lujuria (Craig A.D. 2009). Por otra parte estudios de dolor en pacientes con lesiones que entre otras regiones, incluyen a la corteza insular, han mostrado asimbolia para el dolor, un estado en el cual los pacientes no son conscientes del componente emocional que tiene un estímulo nocivo, es decir pueden reconocer el dolor pero carecen de la apropiada respuesta motora y emocional a estímulos dolorosos (Berthier, 1988). Mesulam y Mufson (Mesulam, 1982b) postularon que las conexiones (e interacción) entre la Corteza insular y el sistema límbico es esencial en la evaluación (*appraisal*) del contenido afectivo-motivacional de la experiencia perceptual, y postulan que en estos pacientes con asimbolia del dolor esta desconexión sensorial-límbica es la causante de prevenir una adecuada asociación causando un déficit en reacciones cognitivas y conductuales apropiadas frente al dolor, lo cual podría eventualmente ocurrir también en el aprendizaje asociativo del miedo.

La relación funcional con la amígdala ha sido descrita en animales. Trabajos realizados en animales, han vinculado a la RAIC principalmente en la percepción de dolor (Burkey, 1996; Jasmin L, 2004; Ohara, 2005; Tracey, 2007). La sensación de dolor tiene 2 componentes, el primero corresponde al componente discriminativo sensorial, el cual entrega información sobre ubicación, modalidad e intensidad del estímulo y el segundo corresponde al componente emocional. Para el componente sensorial se han descrito vías clásicas que llevan información nociceptiva hasta regiones corticales, principalmente a cortezas somatosensoriales y la región caudal de la corteza insular. Con respecto al componente emocional, se ha descrito a regiones orbitales ventrolaterales (VLO), y a las corteza cinguladas (ACC) como áreas que participan en la parte afectiva del dolor. Sin embargo, aún no se tiene certeza del verdadero rol de estas cortezas por sus resultados algo controversiales (Ohara, 2005; Vogt B.A., 2005; Tracey, 2007) El grupo de Luc Jasmin describió que la RAIC tiene una participación relevante en modular la percepción del dolor, a través de sus conexiones directas con la amígdala.(Jasmin y Col. 2004). El trabajo demostró que la RAIC es un área pro-nociceptiva, ya que incrementos en los niveles de GABA, producen analgesia. Si durante este incremento de GABA se inyecta un bloqueador de receptores GABAB en la RAIC se produce hiperalgesia. Esto último ocurre ya que en la RAIC existe una gran cantidad de neuronas con receptores a GABAB en la capa 5, las cuales (cerca del 50%) proyectan a la amígdala Basolateral (BLA). De esta manera si se apaga el control inhibitorio sobre la amígdala se tiene una respuesta hiperalgésica, que es dependiente de este vínculo RAIC-Amígdala, ya que no se observan respuestas de percepción de dolor si bajo las mismas condiciones de incrementos de GABA en la RAIC, se inhibe la amígdala con fármacos que bloquean los canales de Na⁺ dependientes de voltaje, como bupivacaína (Jasmin, 2003; Jasmin L, 2004).

La desconexión no impide la adquisición pero si altera la consolidación de la memoria asociativa del miedo

De acuerdo a los antecedentes de lesiones en la amígdala, animales con lesiones unilaterales electrolíticas son capaces de adquirir el condicionamiento a miedo (LaBar K. y Col 1996; Nader K. y Col 2001). Un artículo del mismo grupo de trabajo demostró que la lesión bilateral de la amígdala lateral es suficiente para impedir la adquisición del aprendizaje a miedo inducido por una clave (Goosens y Col 2001). Este trabajo además demuestra que también se ve alterado la expresión del miedo con lesiones bilaterales electrolíticas del núcleo central de la amígdala (CeA), sin embargo es ampliamente aceptado que CeA no participa de la adquisición del miedo si no más bien de la salida autonómica y motora, es decir, es esencial en la expresión del miedo por sus diversas conexiones con núcleos autonómicos y la sustancia gris periaqueductal (Ledoux JE 2000). Estos trabajos demuestran que si un animal presenta tan solo una amígdala intacta debiese ser capaz de adquirir el condicionamiento asociado a una clave condicionada. En esta tesis cuando se efectúa la desconexión mediante lesión cruzada de la RAIC y la amígdala, los animales tienen una amígdala intacta por lo que debiesen adquirir normalmente el condicionamiento, y el déficit que observamos en los test de retención, posiblemente sean causa de una alteración en los procesos posteriores a la adquisición de un aprendizaje, esto sería la consolidación, o la expresión o retención del miedo cuando se evalúa el aprendizaje asociativo presentando la clave condicionada.

Nosotros postulamos que la relación entre RAIC y BLA es fundamental en la consolidación del aprendizaje asociativo del miedo, lo cual eventualmente podría ser consecuencia de que estas dos estructuras son relevantes en dar una valencia emocional al

estímulo que se presenta siendo capaces de modularse de manera reciproca, entiendo que la actividad neuronal de ambas estructuras es fundamental una vez ocurrido un evento emocionalmente relevante o serian regiones donde se almacenan trazos de memorias emocionales durante el condicionamiento a miedo y que estas memorias son fundamentales, de tal manera que son capaces contribuir a las asociaciones que realiza la amígdala durante el aprendizaje y/o durante la evocación de memorias de miedo.

Si bien es cierto que la lesión cruzada muestra una importante contribución de la interacción de ambas regiones, las lesiones pueden generar cambios neuronales fuera de la zona objetivo que puede perjudicar la aparente especificidad del área estudiada. Además, esta desconexión por lesión podría ocultar una real función del sistema, ya sea en la expresión o en la evocación del miedo. Para despejar esta incertidumbre decidimos evaluar con un protocolo más refinado, desconectando ambas estructuras utilizando inactivaciones cruzadas reversibles (*Cross-inactivation disconnection*), lo cual nos permitió determinar lo fundamental que es la interacción de este sistema en el procesamiento de memorias emocionales durante una ventana de tiempo específica, cuestión que se discutirá a continuación.

VI.III.III.I. La inactivación cruzada altera la consolidación del miedo condicionado y su efecto es dependiente de tiempo.

Interacción ínsula-amígdala es fundamental en la consolidación de miedo condicionado

Resulta difícil de aprender acerca de la naturaleza dinámica de las interacciones del sistema interoceptivo con la amígdala de los estudios clínicos de lesiones en humanos o en ratas, ya que no se puede examinar de forma sistemática los efectos específicos de

desconectar, porque las lesiones abarcan más estructuras que las que se quiere observar e impiden evaluar en un momento determinado, las regiones implicadas en el proceso.

La desconexión realizada mediante inactivación con muscimol inmediatamente después del condicionamiento, afectó la consolidación del aprendizaje asociativo del miedo, cuando se evaluó 24hrs. después bajo un protocolo de extinción, lo que plantea la existencia de un circuito implicado en la formación de memorias de miedo.

Múltiples trabajos han mostrado que la corteza insular sería una de las regiones con mayores conexiones bilaterales con la amígdala, pero poco se comprende de la relación funcional de estas dos estructuras. La mayoría de los trabajos han relacionado la corteza prefrontal medial y la amígdala, vinculando sus diferentes regiones con adquisición, consolidación y extinción. Un reciente estudio utilizando técnicas de optogenética ha demostrado la relevancia de las redes neuronales de gran escala, particularmente de las conexiones de la corteza prefrontal medial con la amígdala, en los procesos de memorias de miedo (Senn V. y Col 2014) y sugieren que el balance de la actividad los circuitos prefrontales con la amígdala son relevantes en memorias de largo plazo.

Esta tesis y otros trabajos (Reep 1982; Reep 1994; McDonald AJ y Col. 1996; Shi y Cassel 1998) indican que la amígdala proyecta de manera fuerte hacia la RAIC y la RAIC hacia la región LA y BLA de la amígdala. Es sabido que las neuronas de proyección desde las cortezas son excitatorias. Estudios donde se ha evaluado la eficacia sináptica de las proyecciones de la corteza prefrontal medial en paradigmas de condicionamiento a miedo, han mostrado que las aferencias hacia la amígdala son excitatorias, y estas pueden llegar tanto a neuronas principales como interneuronas, y de esta manera tener un efecto excitatorio o inhibitorio en las neuronas de BLA (Cho Jun-Hyeong y Col 2013). Por otra

parte las proyecciones desde la amígdala basolateral son excitatorias y llegarían a neuronas piramidales de la corteza, lo que se sugiere de trabajos realizados en la corteza prefrontal medial (Sotres-Bayon F. 2012). Tal como ocurre en las relaciones funcionales de la corteza prefrontal medial con la amígdala basolateral, nosotros creemos que existe una interacción sináptica de la RAIC y BLA posterior al aprendizaje, que es alterada cuando son inhibidas estas estructuras, lo cual tiene un efecto en la consolidación del aprendizaje asociativo del miedo. Esta interacción estaría presente en una ventana de tiempo específica, ya que la inactivación con muscimol 6hrs. después del aprendizaje no altera con igual fuerza la adquisición del miedo.

Los procesos de consolidación de memoria han sido un foco de la investigación por varios grupos de investigación. Se ha planteado que luego de un aprendizaje, donde la memoria es frágil, existe un periodo posterior donde las memorias se vuelven menos lábiles y se consolidan, por lo cual existiría una ventana de tiempo donde la consolidación puede ser alterada (Alvarez P, Squire LR. 1994; Schafe GE y Col 1999, Schafe GE, LeDoux JE.2000; Frankland PW y Bontempi B. 2005). Varios trabajos han revelado que las memorias son susceptibles a ser perturbadas por fármacos como sRNA o inhibidores de la síntesis proteica cuando son infundidos inmediatamente después o dentro de unas pocas horas posteriores al aprendizaje (Davis y Squire, 1984; Dudai 1996; Shafe G.E y col 2000). El grupo de Ledoux ha demostrado que la consolidación del condicionamiento a miedo requiere la síntesis de proteínas en la amígdala (Schafe G.E y Col 2000), ya que la infusión de anisomicina (ver más arriba) inmediatamente después del condicionamiento, altera la retención de la memoria de miedo, sin embargo la inactivación bilateral de la amígdala inmediatamente después del condicionamiento no altera la consolidación del miedo

aprendido (Wilensky A.y col 1999), por lo que en la amígdala la consolidación es dependiente de síntesis proteica y no de actividad neuronal, sin embargo nuestro trabajo demuestra que la desconexión mediante inactivación cruzada impide que este aprendizaje sea consolidado, lo cual sugiere que la consolidación es dependiente de la actividad neuronal entre la insula y la amígdala.

La contribución de la corteza insular en aprendizaje y memoria ha quedado demostrada en estudios realizados por otros grupos, utilizando el paradigma de condicionamiento aversivo a sabores (Bermudez-Rattoni F y Col 1997, 2004) y en consolidación de las memorias implicadas en el reconocimiento de objetos (Bermudez-Rattoni F. 2005 y 2013). Cuando realizamos la inactivación bilateral de la RAIC inmediatamente después del condicionamiento no hubo efecto a las 24hrs, pero en el *recall* el *freezing* fue significativamente menor respecto al control, lo que sugiere, en conjunto con el trabajo de lesión bilateral, que la RAIC por sí sola no influye en la adquisición del miedo asociativo, sin embargo participaría de la consolidación a largo plazo del miedo condicionado en conjunto con la amígdala, y podría ser el sitio donde estas memorias remotas permanecen para su posterior evocación.

Circuitos lateralizados de la corteza insular con la amígdala

Al observar la conducta individual de los animales notamos la existencia de una lateralización del efecto del muscimol. Si bien es cierto que no hay efecto 24hrs posterior a la inactivación, cuando se efectúa el test de retención 48hrs. después de la desconexión, se evidencia la diferencia. En base a esto nosotros sugerimos que la desconexión de la ínsula izquierda con la amígdala derecha es más efectiva en alterar la consolidación del

aprendizaje asociativo, efecto que estaría vinculado con la lateralización de las funciones del cerebro en emociones.

Varios artículos han propuesto que la activación de las redes temporales y prefrontales tiende a estar lateralizada, dependiendo del tipo de la cuestión involucrada o suceso que se quiere recordar (Phelps E y Col 2001; Smith AP y Col 2005; Schiller D. y Col 2009). Además, diferentes trabajos han descrito funciones o respuestas lateralizadas en la corteza insular. Pacientes con accidente vascular en el lado derecho de la corteza insular son más susceptibles a desarrollar disfunción autonómica cardiovascular, indicando la existencia de una lateralización en el control autonómico (Meyer S y Col 2004). Otros trabajos han descrito que la actividad neuronal de la corteza insular anterior derecha se correlaciona con la percepción subjetiva de la intensidad del estímulo térmico (Craig A.D. y Col., 2000). Craig ha planteado incluso un modelo de función del cerebro en base a las respuestas lateralizadas de asimetría emocional, cuya base sería la relación anatómica y funcional con el sistema nervioso autónomo (Craig A.D. 2005). Estas evidencias sugieren que el hemisferio derecho se ha especializado tanto en la percepción y expresión de emociones y podría participar también en la experiencia emocional.

En ratas la evidencia de lateralización de respuestas emocionales no es abundante. Se ha descrito lateralización de las funciones en la corteza prefrontal medial derecha en la activación de las respuestas fisiológicas al estrés (Sullivan R. y Col 1999). Así mismo se ha descrito lateralización amígdala basolateral. Lesiones post-condicionamiento en la amígdala basolateral derecha, mostraron un déficit en el miedo contextual pero no en el miedo asociado al tono (Baker K.B. y Col 2004). Otros trabajos han mostrado incremento temprano de la expresión Arc (un gen asociado con memoria) siguiendo estados afectivos

negativos como el condicionamiento a miedo en la amígdala derecha antes que en la amígdala izquierda, y un aumento de Arc solamente en la amígdala derecha frente a una reducción en la recompensa vinculada a comida (Young EJ y Col 2013).

Aunque el efecto de desconectar dos regiones supone que la conexión amígdala e ínsula está suprimida para ambos hemisferios, creemos que el vínculo de esta red amígdala-ínsula es crucial en la consolidación del miedo. El grupo de investigación de Elizabeth Phelps, uno de los grupos de investigación más importantes que ha estudiado las bases neurales del miedo en humanos y ratas, ha descrito la relación funcional de este circuito en humanos, bajo un protocolo de miedo instruido, donde las personas conocían o podían anticipar que una clave señalizaba un castigo (ref). La activación de la amígdala izquierda se correlacionó fuertemente con la expresión de la respuesta de miedo (aunque también hubo un efecto significativo pero menor en la amígdala derecha), medida por la conductancia de la piel. Esta actividad de la amígdala izquierda es transitoria y decae rápidamente. Junto con esto se observó que la actividad de la corteza insular en ambos hemisferios se correlacionaba con la magnitud de la respuesta emocional, mientras que la amígdala izquierda sólo con la respuesta (no la magnitud). Esto sugiere que la amígdala es fundamental en la generación y la fuerza de la respuesta emocional, pero no es indispensable para sostenerla (Phelps E y Col 2001). Un trabajo previo de este mismo grupo (Lebar K. y Col 1998) mostró, con un protocolo diferente, que la actividad de la amígdala derecha se correlaciona con la adquisición y la respuesta del miedo condicionado.

Aunque la lateralización de la respuesta emocional en la amígdala puede estar asociada al tipo de aprendizaje de miedo evaluado y en el procesamiento global o local de la respuesta emocional (Daan Baas y Col 2004), podemos dar cuenta que la corteza insular

es una estructura primordial en la mantención de esta respuesta y podría ser clave en enviar información a la amígdala para generar y mantener el estado emocional, aunque nos faltan datos para robustecer algunas de estas ideas, sería importante conocer mediante registro electrofisiológico como es el vínculo ínsula-amígdala en el miedo condicionado.

La interacción ínsula-Amígdala en TEPT

El recién publicado Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-5), define el trastorno de estrés postraumático (TEPT) como un "trauma y trastorno relacionado con el estrés" (DSM 2013). Las patogenias de TEPT se basan en cambios paradójicos de procesamiento de la memoria emocional inducidos por la exposición al trauma y asociadas a disfunción emocional. Varios modelos animales de estrés postraumático se han validado y se utilizan en la actualidad, aunque sin un protocolo unificado (Siegmund A y Wotjak CT. 2006; Berardi A. y Col 2014). Entre los modelos actuales más utilizados es el condicionamiento a miedo, aplicado de diferente forma de acuerdo a múltiples autores, ha permitido estudiar los diferentes procesos de memoria aberrantes que participan al desarrollo de TEPT.

Los procesos de consolidación (o re-consolidación) que tienen lugar inmediatamente después de cualquier síntoma que se re-experimenta luego de un episodio de trauma podría actualizar la memoria traumática y prolongar su permanencia en el tiempo con consecuencias en el proceso de extinción. Nuestro modelo de condicionamiento a miedo expuesto en la fig. 42 nos permitió evaluar en el largo plazo las consecuencias de una situación estresante como el condicionamiento a miedo. Evaluando las conductas de los animales con dos días de condicionamiento, un total de 10 exposiciones al shock, los animales muestran una conducta hipervigilancia (*hiperarousal*) en sus cajas hogar y cuando

son puestos en el contexto b, aunque esto no fue medido de manera sistemática. Junto con esto, la memoria emocional vinculada al miedo permanece cerca de un mes luego del aprendizaje asociativo, lo cual es señal de una difícil extinción del miedo, e incluso el miedo al contexto no extingue. Estos datos sugieren que el protocolo de condicionamiento se asemejaría a un modelo de TEPT (Siegmund A y Wotjak CT. 2006).

Para evaluar si la conexión ínsula - amígdala participa de las memorias aversivas de un TEPT, evaluamos la inactivación de este circuito bajo el paradigma de un TEPT. La desconexión afectó la consolidación del condicionamiento, cuando se evaluó la expresión mediante un test de retención de memoria 24hrs. después del condicionamiento. Este efecto se logró ver inclusive 6 días (144hrs) después de la infusión de muscimol. Mientras que los animales con las estructuras funcionales presentan un elevado miedo a lo largo de todo el protocolo, lo que indica que estas memorias aversivas poderosas se asemejan a un TEPT.

Aunque nosotros no evaluamos otras conductas vinculadas con el TEPT, como actividad motora, *hiperarousal* o respuestas generalizadas a otras situaciones estresantes, o interacción social, nuestro protocolo se asemeja al planteado en Berardi y col 2014, ya que corresponde a un aprendizaje de miedo con un shock que el animal no podía evitar (*Innescapable footshock*), y luego los animales son dejados en sus cajas hogar de manera individual, lo cual impide la interacción con otras ratas. Este procedimiento, plantean ellos, aumenta la susceptibilidad a las consecuencias emocionales adversas luego de la exposición a un trauma, sugiriendo un modelo para TEPT.

Las terapias conductuales actuales para muchos de los desórdenes de ansiedad (o estrés), entre los cuales se incluye el TEPT, intentan amortiguar las respuestas afectivas relacionadas con claves vinculadas al trauma. Este alivio se logra a menudo a través de la

extinción, donde la re-exposición a las claves que inducen el miedo suprime la memoria original. Sin embargo, la extinción es a menudo incompleta, y la respuesta afectiva inducida por clave se recupera espontáneamente con el tiempo. Por lo tanto, un objetivo principal de la investigación en extinción es determinar combinaciones de intervenciones farmacoterapéuticas y conductuales que mejoren la formación de la memoria de extinción, dando origen a una disminución más robusta y persistente en las respuestas afectivas inducidas por clave (Whittle y Col 2014). Un importante trabajo, ha descrito como la infusión de BDNF (factor neurotrófico que ha sido implicado en el desarrollo del sistema nervioso y plasticidad sináptica Maddox S.A y Col 2013), en la corteza infralímbica induce una extinción del miedo al contexto, mismo efecto que se obtiene con sucesivas exposiciones al contexto, efecto que sería mediado por el circuito de BDNF hipocampo-corteza prefrontal. En humanos el hallazgo de los individuos con el polimorfismo BDNF Val66Met, ven mermada la extinción de la memoria de miedo, da luces de la relevancia del BDNF en las memorias emocionales.

Nuestro trabajo con inactivaciones cruzadas bajo un potencial protocolo de TEPT, muestra como estas memorias que son difíciles de modificar y por tanto resistentes a la extinción, son perturbadas al intervenir el circuito ínsula-amígdala durante la consolidación, empeorando la expresión y la retención del miedo, y propone la importancia de estudiar este circuito en el contexto de estas poderosas y resistentes memorias aversivas. Bajo este concepto sería importante evaluar el rol del BDNF en este circuito y su implicancia en las memorias emocionales asociativas, principalmente vinculadas a una clave no contextual ya que poco se conoce al respecto. El BDNF al estar altamente enriquecido en regiones del cerebro vinculadas con el aprendizaje emocional, como la amígdala, el hipocampo y PFC

(Maddox S.A y Col 2013), participa de distintos procesos de memoria, como la adquisición y consolidación de memorias de miedo, actuando vía activación del receptor TrkB (tropomyosin-related kinase B). Se ha descrito la participación del BDNF en aprendizaje del miedo asociado a una clave en la amígdala (Rattiner LM y Col 2004; Chhatwal JP y Col 2006), en la consolidación en la corteza prefrontal (Maddox S.A y Col 2013), incluso en la corteza perirhinal (Schulz-Klau y Col 2013), lo cual podría extenderse hacia nuestro circuito de estudio. En cuanto a los modelos de estrés post-traumático en ratas, los trabajos con BDNF son variados, pero la gran mayoría centrados en el miedo contextual (Peters J y Col. 2010) y por consiguiente efectos a nivel del hipocampo o la amígdala (Takei S. y Col.2011; Roth T. 2011; Maddox S.A y Col 2013), sin profundizar en modelos de miedo vinculados a una clave emocional, en nuestro caso el tono. La expresión de BDNF es regulada por factores epigenéticos, como acetilaciones y metilaciones de las histonas. Un reciente trabajo demostró que animales *Knock Out* para la histidinadeacetilasa 2 (Hdac2 KO) se alteraba la extinción del miedo condicionado. Los animales Hdac KO, podrían alterar diferentes tipos de aprendizajes, así como componentes específicos en tareas de aprendizaje asociativo, memorias de largo plazo, extinción, entre otros, lo que podría ser resultado de diferentes efectos sobre el funcionamiento de distintos circuitos neuronales que median formas específicas de aprendizaje o diferentes etapas de la formación de memorias (Morris MJ y Col 2013). Juntos estos datos muestran la relevancia del BDNF e las memorias emocionales, lo cual evidentemente de acuerdo a nuestros resultados podría jugar un rol clave en los circuitos Corteza insular –amígdala en las distintas etapas del proceso emocional.

VII. Conclusiones

Las evidencias aportadas por esta tesis permiten afirmar que:

1. La corteza insular granular presenta cuatro subdivisiones, de acuerdo a su patrón de conexiones.
2. Sugerimos que el flujo de información interoceptiva llega hasta la corteza insular granular rostral (RAIC) por medio de la corteza agranular posterior.
3. Las subdivisiones de la RAIC ventral y dorsal, presentan conexiones diferentes que representarían roles múltiples en el procesamiento de memorias emocionales.
4. Sugerimos la transferencia de memorias de miedo condicionado que llegarían desde la corteza interoceptiva primaria hasta la RAIC, ya que la lesión bilateral de la RAIC no impide la adquisición pero si la estabilidad a largo plazo de esta memoria y su inactivación bilateral inmediatamente después del condicionamiento no altera el almacenamiento a corto plazo.
5. El sistema interoceptivo y la amígdala participan en conjunto en la consolidación de memorias de miedo condicionado, lesiones cruzadas alteran la expresión del miedo 24hrs después del condicionamiento mientras que la inactivación cruzada post condicionamiento pero no 6hrs. después, perturbó el establecimiento de estas memorias.
6. Esta tesis sugiere fuertemente que la consolidación de las memorias aversivas que incluyen la participación de la RAIC y la amígdala estarían lateralizadas.
7. La comunicación RAIC- Amígdala participaría de memorias altamente perjudiciales como el estrés post-traumático, ya que su inactivación disminuye de manera fuerte el miedo en un protocolo de PTSD.

8. La información interoceptiva que alcanza la corteza insular parietal rostral, interoceptiva primaria, es esencial en mantener una memoria aversiva como el miedo condicionado, ya que su inactivación persistente con NeoSTX acelera la extinción del miedo condicionado. Esta memoria sería transferida a regiones jerárquicamente superiores, RAIC, para su evocación a largo plazo.

Consideramos entonces que la RAIC, como la región del alto orden del sistema interoceptivo, entrega información relevante a la amígdala acerca del estado interno del animal, siendo esta interacción relevante en la consolidación de memorias emocionales, como el miedo condicionado. Entender el vínculo existente entre estas dos regiones resulta fundamental para comprender como el cerebro integra información proveniente del medio externo e interno, para llevar a cabo diferentes conductas motivadas.

VIII. BIBLIOGRAFIA

Allen, G., Saper CB, Hurley KM, Cechetto DF (1991) "Organization of visceral and limbic connections in the insular cortex of the rat" *J Comp Neurol*; 311(1): 1-16.

Alvarez P, Squire LR. (1994) "Memory consolidation and the medial temporal lobe: a simple network model" *Proc Natl Acad Sci U S A*; 91(15):7041-5.

American Psychiatric Association (2013) "Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM-5" Fifth Edition. Washington, DC: American Psychiatric Publishing.

Baas D, Aleman A, Kahn RS (2004) " Lateralization of amygdala activation: a systematic review of functional neuroimaging studies" *Brain Res Brain Res Rev*;45(2):96-103.

Benison AM, Chumachenko S, Harrison JA, Maier SF, Falci SP, Watkins LR, Barth DS. (2011) "Caudal granular insular cortex is sufficient and necessary for the long-term maintenance of allodynic behavior in the rat attributable to mononeuropathy." *J Neurosci*; 31(17):6317-28.

Berardi A, Trezza V, Palmery M, Trabace L., Cuomo V., Campolongo P (2014) "An updated animal model capturing both the cognitive and emotional features of post-traumatic stress disorder (PTSD)" *Front Behav Neurosci*; 142 (8): 1-12.

Bermúdez-Rattoni, F., Introini-Collison I., Coleman-Mesches K., Mcgaugh J. L. (1997) "Insular Cortex and Amygdala Lesions Induced after Aversive Training Impair Retention: Effects of Degree of Training." *Neurobiology Of Learning And Memory*; 67(1):57-63

Bermúdez-Rattoni, F., Introini-Collison I. B. and McGaugh J. L. (1991) "Reversible inactivation of the Insular Cortex by tetrodotoxin produces retrograde and anterograde amnesia for inhibitory avoidance and spatial learning" *Proc. Natl. Acad. Sci*; 88(12):5379-82.

Bermúdez-Rattoni F., Ramírez-Lugo L., Gutiérrez R. and Miranda M.I (2004) "Molecular Signals into the Insular Cortex and Amygdala during Aversive Gustatory Memory Formation" *Cellular and Molecular Neurobiology*; 24(1):25-36.

Bermúdez-Rattoni F. (2014) "The forgotten insular cortex: its role on recognition memory formation" *Neurobiol Learn Mem.*; 109:207-16.

Bissière, S., Plachta N, Hoyer D, McAllister KH, Olpe HR, Grace AA, Cryan JF. (2008). "The rostral anterior cingulate cortex modulates the efficiency of amygdala-dependent fear learning." *Biol Psychiatry*; 63(9): 821-31.

Block AE, Dhanji H, Thompson-Tardif SF, Floresco SB (2007) "Thalamic-prefrontal cortical-ventral striatal circuitry mediates dissociable components of strategy set shifting" *Cereb Cortex.*; 17(7):1625-36

Burgos-Robles A., Vidal-Gonzalez I, Santini E, Quirk GJ (2007) "Consolidation of fear extinction requires NMDA receptor-dependent bursting in the ventromedial prefrontal cortex." *Neuron*; 53(6): 871-80.

Brunzell DH, Kim JJ (2001) "Fear conditioning to tone, but not to context, is attenuated by lesions of the insular cortex and posterior extension of the intralaminar complex in rats" *Behav Neurosci*; 115(2):365-75.

Calder AJ., Lawrence AD, Young A (2001) "Neuropsychology of fear and loathing" *Nat Rev Neurosci*; 2(5):352-63.

Campeau S., Davis M. (1995) "Involvement of Subcortical and Cortical Afferent To the Lateral Nucleus of the Amygdala in Fear Conditioning Measured with Fear-Potentiated Startle in Rats Trained Concurrently with Auditory and Visual Conditioned Stimuli" *The Journal Of Neuroscience* 15(3): 2312-2327.

Casanova JP, Contreras M, Moya EA, Torrealba F, Iturriaga R (2013)" Effect of insular cortex inactivation on autonomic and behavioral responses to acute hypoxia in conscious rats." *Behav Brain Res*; 253:60-7

Cecheto, D. F., Saper CB (1990). "Role of the cerebral cortex in autonomic function." en: Loewy A.D. and Spyer K.M "Central regulation of autonomic functions", Oxford University Press. Cap.12 ;208-223

Cechetto, D., Saper CB. (1987)."Evidence for a viscerotopic sensory representation in the cortex and thalamus in the rat" *J Comp Neurol*. 262(1): 27-45.

Chhatwal JP, Stanek-Rattiner L, Davis M, Ressler KJ (2006) "Amygdala BDNF signaling is required for consolidation but not encoding of extinction." *Nat Neurosci*; 9 (7):870-2.

Coogan TA, Burkhalter A (1990) "Conserved patterns of cortico-cortical connections define areal hierarchy in rat visual cortex." *Exp Brain Res*; 80 (1):49-53.

Contreras M, Ceric F., Torrealba F (2007) "Inactivation of the interoceptive insula disrupts drug craving and malaise induced by lithium." *Science*; 318(5850):655-8.

Contreras, M., Ceric F., Torrealba F. (2008). "El lado negativo de las emociones: la adicción a drogas de abuso." *Rev Neurol* 47 (9): 471-476.

Contreras M., Billeke P, Vicencio S, Madrid C, Perdomo G, González M, Torrealba F. (2012) "A role for the insular cortex in long-term memory for context-evoked drug craving in rats. *Neuropsychopharmacology*; 37(9):2101-8

Craig, A. D. (2002). "How do you feel? Interoception: the sense of the physiological condition of the body." *Nat Rev Neurosci*; 3(8): 655-66.

Craig AD. (2005) "Forebrain emotional asymmetry: a neuroanatomical basis?" Trends Cogn Sci; 9 (12):566-71

Craig, A. D. (2009). "How do you feel--now? The anterior insula and human awareness " Nat Rev Neurosci; 10 (1):59-70.

De Pasquale R, Sherman SM (2013) "A modulatory effect of the feedback from higher visual areas to V1 in the mouse" J Neurophysiol; 109 (10):2618-31.

Dudai Y. (1996) "Consolidation: fragility on the road to the engram." Neuron; 17 (3):367-70.

Ehrlich I, Humeau Y., G. F., Ciocchi S, Herry C, Lüthi A. (2009). "Amygdala Inhibitory circuits and the control of fear memory" Neuron review; 62(6):757-71.

Eisenberg M, Kobil T, Berman DE, Dudai Y (2003). "Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance" Science; 301(5636):1102-4.

Evans JM, Bey V, Burkey AR, Commons KG (2007) "Organization of endogenous opioids in the rostral agranular insular cortex of the rat" J Comp Neurol; 500(3):530-41.

Fujita S, Adachi K, Koshikawa N, Kobayashi M (2010) "Spatiotemporal dynamics of excitation in rat insular cortex: intrinsic corticocortical circuit regulates caudal-rostral excitatory propagation from the insular to frontal cortex" Neuroscience; 165(1):278-92.

Frankland PW, Bontempi B (2005) "The organization of recent and remote memories" Nat Rev Neurosci; 6 (2):119-30.

Gabbott PL, Warner TA, Jays PR, Bacon SJ (2003) "Areal and synaptic interconnectivity of prelimbic (area 32), infralimbic (area 25) and insular cortices in the rat" Brain Res; 993(1-2):59-71.

Garfinkel SN, Minati L, Gray MA, Seth AK, Dolan RJ, Critchley HD.(2014) "Fear from the heart: sensitivity to fear stimuli depends on individual heartbeats." J Neurosci; 7; 34(19):6573-82.

Gauriau C, Bernard JF (2004) "Posterior triangular thalamic neurons convey nociceptive messages to the secondary somatosensory and insular cortices in the rat" J Neurosci; 24(3):752-61.

Ghashghaie, H. T., Barbasa H. (2002) "Pathways For Emotion: Interactions Of Prefrontal And Anterior Temporal Pathways In The Amygdala Of The Rhesus Monkey" Neuroscience; 115(4): 1261-1279.

Guldin, W., Markowitsch HJ (1983) "Cortical and thalamic afferent connections of the insular and adjacent cortex of the rat" J Comp Neurol; 215 (2): 135-53.

Guillery RW, Feig SL, Lozsádi DA. (1998) "Paying attention to the thalamic reticul Paying attention to the thalamic reticular nucleus.ar nucleus" Trends Neurosci;21(1):28-32.

Guillery RW, Sherman SM (2002) "Thalamic relay functions and their role in corticocortical communication: generalizations from the visual system" Neuron; 33(2):163-75.

Guillery RW, Harting JK. (2003) "Structure and connections of the thalamic reticular nucleus: Advancing views over half a century" J Comp Neurol; 463(4):360-71.

Gutiérrez H., Hernández-Echeagaray E., Ramírez-Amaya V. and Bermúdez-Rattoni F. (1999) "Blockade of N-Metil-D-Aspartato receptors in the Insular Cortex disrupts taste aversion and spatial memory formation" Neuroscience; 89 (3):751-8.

Hanamori T, Kunitake T, Kato K, Kannan H (1998) "Responses of neurons in the insular cortex to gustatory, visceral, and nociceptive stimuli in rats." J Neurophysiol; 79(5):2535-45.

Hoover W., Vertes RP (2007) "Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat" Brain Struct Funct; 212(2): 149-79.

James W (1884)"Physical basis of emotion" Psychol Rev; 101: 205-210.

Jasmin L, B. A., Granato A, Ohara PT (2004) "Rostral agranular insular cortex and pain areas of the central nervous system: a tract-tracing study in the rat" Comp Neurol; 468(3): 425-40.

Kesner RP, Gilbert PE (2007) "The role of the agranular insular cortex in anticipation of reward contrast" Neurobiol Learn Mem; 88(1):82-6.

Kimura A, Imbe H, Donishi T (2010) "Efferent connections of an auditory area in the caudal insular cortex of the rat: anatomical nodes for cortical streams of auditory processing and cross-modal sensory interactions." Neuroscience; 166(4):1140-57.

Krettek JE, Price JL (1977) "The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat" J Comp Neurol; 171(2): 157-91.

Krettek JE, Price JL (1978) "A description of the amygdaloid complex in the rat and cat with observations on intra-amygdaloid axonal connections" J.Comp. Neurol; 178(2):255-80.

Kosar E, Grill HJ, Norgren R (1986) "Gustatory cortex in the rat II. Thalamocortical projections" Brain Res; 379(2):342-52.

Kosar E, Grill HJ, Norgren R (1986) "Gustatory cortex in the rat I. Physiological properties and cytoarchitecture" *Brain Res*; 379(2):329-41.

LaBar KS, Gatenby JC, Gore JC, LeDoux JE, Phelps EA (1998) " Human amygdala activation during conditioned fear acquisition and extinction: a mixed-trial fMRI study" *Neuron*; 20(5):937-45

Lanuza E., Moncho-Bogani J, Ledoux JE (2008) "Unconditioned stimulus pathways to the amygdala: effects of lesions of the posterior intralaminar thalamus on foot-shock-induced c-Fos expression in the subdivisions of the lateral amygdala" *Neuroscience*; 155(3): 959-68.

Lebrón K., Milad MR, Quirk GJ. (2004) "Delayed recall of fear extinction in rats with lesions of ventral medial prefrontal cortex" *Learn Mem*; 11(5): 544-8.

LeDoux J. (1993) "Emotional memory systems in the brain" *Behav Brain Res* 58(1 2): 69-79.

LeDoux J., Farb CR, Romanski LM (1991) "Overlapping projections to the amygdala and striatum from auditory processing areas of the thalamus and cortex" *Neurosci Lett*; 134(1): 139-44.

LeDoux J. E. (2000) "Emotion circuits in the brain" *Annu. Rev. Neurosc*; 23:155-84.

Lonsdorf TB, Haaker J, Kalisch R (2014) " Long-term expression of human contextual fear and extinction memories involves amygdala, hippocampus and ventromedial prefrontal cortex: a reinstatement study in two independent samples" *Soc Cogn Affect Neurosci*.

Maddox SA, Schafe GE, Ressler KJ.(2013) Exploring epigenetic regulation of fear memory and biomarkers associated with post-traumatic stress disorder. *Front Psychiatry* 1; 4:62.

Maren S., Quirk GJ (2004) "Neuronal Signalling Of Fear Memory" *Nature Reviews Neuroscience*; 5(11):844-52.

Mcdonald AJ, Mascagni F, Guo L (1996) " Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat" *Neuroscience*; 71(1):55-75.

McDonald AJ, Shammah-Lagnado SJ, Shi C, Davis M (1999) "Cortical afferents to the extended amygdala" *Ann N Y Acad Sci*; 877:309-38.

McGaugh JL, Introini-Collison IB, Cahill LF, Castellano C, Dalmaz C, Parent MB, Williams CL. (1993) " Neuromodulatory systems and memory storage: role of the amygdala." *Behav Brain Res*; 58(1-2):81-90.

Mesulam M., Mufson EJ (1982) "Insula of the old world monkey I. Architectonics in the insulo-orbito-temporal component of the paralimbic brain" *J Comp Neurol*; 212(1): 1-22.

Milad M., Quirk GJ (2002) "Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction" *Nature*; 420(6911): 70-4.

Monfils MH, Cowansage K., Klann E. LeDoux JE (2009) "Extinction-Reconsolidation Boundaries: Key to Persistent Attenuation of Fear Memories" *Science*; 324(5929):951-5.

Morgan MA, LeDoux JE (1999) "Contribution of ventrolateral prefrontal cortex to the acquisition and extinction of conditioned fear in rats" *Neurobiol Learn Mem*; 72(3):244-51.

Morris MJ, Mahgoub M, Na ES, Pranav H, Monteggia LM (2013) "Loss of histone deacetylase 2 improves working memory and accelerates extinction learning" *J Neurosci*; 33(15):6401-11.

Myers K. M., Davis M. (2007) "Mechanisms of fear extinction" *Molecular Psychiatry*; 12 (2):120-50.

Nader K, Schafe GE, Le Doux JE (2000) "Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval" *Nature*; 406 (6797):722-6.

Nader K., Hardt O (2009) "A single standard for memory: the case for reconsolidation" *Nature Reviews Neuroscience*; 10(3):224-34.

Nakashima M., Uemura M, Yasui K, Ozaki HS, Tabata S, Taen A (2000) "An anterograde and retrograde tract-tracing study on the projections from the thalamic gustatory area in the rat: distribution of neurons projecting to the insular cortex and amygdaloid complex" *Neurosci Res*; 36 (4):297-309.

Nerad L., Ramírez-Amaya V., Ormsby C. E. and Bermúdez-Rattoni F (1996) "Differential Effect of Anterior and Posterior Insular Cortex Lesions on the Acquisition of Conditioned Taste Aversion and Spatial Learning" *Neurobiology of Learning and Memory*; 66(1):44-50.

Öngür D., Price, J. L. (2000) "The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats; monkeys and humans" *Cereb Cortex*; 10(3):206-19.

Peters J, Dieppa-Perea LM, Melendez LM, Quirk GJ (2010) "Induction of fear extinction with hippocampal-infralimbic BDNF" *Science*; 328 (5983):1288-90

Petrovich GD. and Swanson LW (1997) "Projections from the lateral part of the central amygdalar nucleus to the postulated fear conditioning circuit" *Brain Res*; 763 (2):247-54.

Phelps EA., O'Connor KJ, Gatenby JC, Gore JC, Grillon C, Davis M (2001) "Activation of the left amygdala to a cognitive representation of fear." *Nat Neurosci*; 4 (4):437-41.

Price JL., Amaral DG (1981) "An Autoradiographic Study of the Projections of the Central Nucleus of the Monkey Amygdala" *The Journal of Neuroscience*; 1(11):1242-59.

Quirk G., Likhtik E, Pelletier JG, Pare D (2003) "Stimulation of medial prefrontal cortex decreases the responsiveness of central amygdala output neurons" *The Journal of Neuroscience*; 23(25):8800-7.

Quirk GJ, Armony JL, LeDoux JE (1997) "Fear conditioning enhances different temporal components of tone-evoked spike trains in auditory cortex and lateral amygdala" *Neuron*; 19(3):613-24.

Quirk GJ, Russo GK, Barron JL, Lebron K (2000) "The role of ventromedial prefrontal cortex in the recovery of extinguished fear" *J Neurosci.* 20(16): 6225-31.

Quirk G J, Mueller D (2008) "Neural Mechanisms of Extinction Learning and Retrieval" *Neuropsychopharmacology Reviews*; 33(1):56-72.

Ragozzino ME, Detrick S, Kesner RP (1999) "Involvement of the prelimbic-infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in behavioral flexibility for place and response learning" *J Neurosci*; 19 (11):4585-94.

Rattiner LM, Davis M, French CT, Ressler KJ.(2004)" Brain-derived neurotrophic factor and tyrosine kinase receptor B involvement in amygdala-dependent fear conditioning." *J Neurosci*; 24 (20):4796-806.

Ray J, Price JL (1992) "The organization of the thalamocortical connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the ventral forebrain-prefrontal cortex topography" *J Comp Neurol*; 323 (2):167-97.

Reep RL, Winans SS (1982) "Afferent connections of dorsal and ventral agranular insular cortex in the hamster *Mesocricetus auratus*" *Neuroscience*; 7 (5):1265-88.

Reep RL, Winans SS. (1982)." Efferent connections of dorsal and ventral agranular insular cortex in the hamster, *Mesocricetus auratus*." *Neuroscience*; 7 (11):2609-35.

Reichova I, Sherman SM (2004) "Somatosensory corticothalamic projections: distinguishing drivers from modulators" *J Neurophysiol*; 92(4):2185-97.

Rodgers KM, Benison AM, Klein A, Barth DS (2008) "Auditory, somatosensory, and multisensory insular cortex in the rat" *Cereb Cortex*; 18(12):2941-51

Rodriguez-Navarro AJ, Lagos N, Lagos M, Braghetto I, Csendes A, Hamilton J, Figueroa C, Truan D, Garcia C, Rojas A, Iglesias V, Brunet L, Alvarez F (2007) "Neosaxitoxin as a local anesthetic: preliminary observations from a first human trial" *Anesthesiology*;106(2):339-45.

Rolls,E.T. (1999) "The Brain and Emotion" Oxford University Press: Oxford.

Romanski L., LeDoux JE (1992) "Bilateral destruction of neocortical and perirhinal projection targets of the acoustic thalamus does not disrupt auditory fear conditioning" *Neurosci Lett*; 142(2): 228-32.

Romanski L., LeDoux JE (1992) "Equipotentiality of thalamo-amygdala and thalamo-cortico-amygdala circuits in auditory fear conditioning" *The Journal Of Neuroscience* 12(11):4501-9.

Rosen J., Hitchcock JM, Miserendino MJ, Falls WA, Campeau S, Davis M (1992) "Lesions of the perirhinal cortex but not of the frontal, medial prefrontal, visual, or insular cortex block fear-potentiated startle using a visual conditioned stimulus" *The Journal Of Neuroscience* 12(12): 4624-4633.

Roth TL, Zoladz PR, Sweatt JD, Diamond DM (2011) "Epigenetic modification of hippocampal Bdnf DNA in adult rats in an animal model of post-traumatic stress disorder" *J Psychiatr Res.*;45(7):919-26.

Sacco T, Sacchetti B (2010) "Role of secondary sensory cortices in emotional memory storage and retrieval in rats." *Science*; 329(5992):649-56.

Sadikot AF, Parent A, François C. (1992) "Efferent connections of the centromedian and parafascicular thalamic nuclei in the squirrel monkey: a PHA-L study of subcortical projections." *J Comp Neurol*; 315(2):137-59.

Santini E, Ge H, Ren K, Peña de Ortiz S, Quirk GJ.(2004) "Consolidation of fear extinction requires protein synthesis in the medial prefrontal cortex" *JNeurosci*; 24(25):5704-10.

Saper C.B. (1982) "Convergence of Autonomic and limbic in the Insular Cortex of the rat" *The Journal of Comparative Neurology*; 210(2):163-73.

Saper C.B. (1995) "The Rat nervous system" San Diego, Academic Press. 2 ed.

Scannell JW, Blakemore C, Young MP (1995) "Analysis of connectivity in the cat cerebral cortex" *J Neurosci*; 15 (2):1463-83.

Schafe GE, Nadel NV, Sullivan GM, Harris A, LeDoux JE (1999) "Memory consolidation for contextual and auditory fear conditioning is dependent on protein synthesis, PKA, and MAP kinase" *Learn Mem*; 6(2):97-110.

Schafe GE, LeDoux JE.(2000) "Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala" *J Neurosci*; 20(18):1-5.

Schiller D., Monfils M.H., Raio C. M., Johnson D. C. , LeDoux J.E., Phelps E.A. (2009) "Preventing the return of fear in humans using reconsolidation update mechanisms" *Nature*; 463(7277):49-53

Scholz A (2002) "Mechanisms of (local) anaesthetics on voltage-gated sodium and other ion channels" *Br J Anaesth*; 89(1):52-61.

Schier LA, Hashimoto K, Bales MB, Blonde GD, Spector AC (2014) " High-resolution lesion-mapping strategy links a hot spot in rat insular cortex with impaired expression of taste aversion learning." *Proc Natl Acad Sci U S A*; 111(3):1162-7.

Senn V, Wolff SB, Herry C, Grenier F, Ehrlich I, Gründemann J, Fadok JP, Müller C, Letzkus JJ, Lüthi A. (2014) "Long-range connectivity defines behavioral specificity of amygdala neurons" *Neuron*; 81(2):428-37.

Sesack SR, Deutch AY, Roth RH, Bunney BS (1989) "Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin" *J Comp Neurol*; 290(2):213-42.

Sharpee TO, Atencio CA, Schreiner CE (2011) "Hierarchical representations in the auditory cortex" *Curr Opin Neurobiol*; 21(5):761-7.

Sheila M., Reynolds, Zahm D. (2005)"Specificity in the Projections of Prefrontal and Insular Cortex to Ventral Striatopallidum and the Extended Amygdala" *The Journal of Neuroscience*; 25(50):11757–11767.

Sherman SM, Guillery RW (1996) "Functional organization of thalamocortical relays" *J Neurophysiol*; 76(3):1367-95.

Sherman SM, Guillery RW (1998) "On the actions that one nerve cell can have on another: distinguishing "drivers" from "modulators".*Proc Natl Acad Sci U S A* ;95(12):7121-6.

Sherman SM, Guillery RW (2002) "The role of the thalamus in the flow of information to the cortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 357(1428):1695-708.

Sherman SM (2005) "Thalamic relays and cortical functioning" *Prog Brain Res*; 149():107-26.

Sherman SM., Guillery RW (2011) "Distinct functions for direct and transthalamic corticocortical connections" *J Neurophysiol*; 106(3):1068-77.

Shi C., Davis M. (1999) "Pain Pathways Involved in Fear Conditioning Measured with Fear Potentiated Startle: Lesion Studies" *The Journal Of Neuroscience*; 19(1): 420-430.

Shi C. J., and Cassel M.D. (1998) "Cortical, Thalamic and Amygdaloid connection of the anterior and posterior Insular Cortices" *The Journal of Comparative Neurology*;399(4):440-68.

Schulz-Klaus B, Lessmann V, Endres T (2013) "BDNF-dependent consolidation of fear memories in the perirhinal cortex" *Front Behav Neurosci*. 17;7:205

Siegmund A, Wotjak CT (2006) "Toward an animal model of posttraumatic stress disorder" *Ann N Y Acad Sci*; 1071:324-34.

Sierra-Mercado D., Padilla-Coreano N, Quirk GJ (2011) "Dissociable Roles of Prelimbic and Infralimbic Cortices, Ventral Hippocampus, and Basolateral Amygdala in the Expression and Extinction of Conditioned Fear" *Neuropsychopharmacology*; 36 529–538

Smith AP, Henson RN, Rugg MD, Dolan RJ (2005) "Modulation of retrieval processing reflects accuracy of emotional source memory" *Learn Mem*; 12(5):472-9.

Squire LR (2004) "Memory systems of the brain: a brief history and current perspective" *Neurobiol Learn Mem*; 82(3):171-7.

Stefanacci L., Amaral D. G (2000) "Topographic Organization of Cortical Inputs to the Lateral Nucleus of the Macaque Monkey Amygdala: A Retrograde Tracing Study" *The Journal of Comparative Neurology*; 421(1):52-79.

Stefanacci L., Amaral D.G (2002) "Some Observations on Cortical Inputs to the Macaque Monkey Amygdala: An Anterograde Tracing Study" *The Journal of Comparative Neurology*; 451(4):301-23.

Sullivan RM, Gratton A (1999) "Lateralized effects of medial prefrontal cortex lesions on neuroendocrine and autonomic stress responses in rats" *J Neurosci*; 19(7):2834-40.

Swanson L. W. (1998). "Brain Maps: Structure of Rat Brain." Elsevier B.V.

Swanson L. W. (1998). Brain maps: structure of the rat brain. Amsterdam.

Takei S, Morinobu S, Yamamoto S, Fuchikami M, Matsumoto T, Yamawaki S.(2011) "Enhanced hippocampal BDNF/TrkB signaling in response to fear conditioning in an animal model of posttraumatic stress disorder" *J Psychiatr Res.*;45(4):460-8.

Tuerke KJ, Limebeer CL, Fletcher PJ, Parker LA (2012) "Double dissociation between regulation of conditioned disgust and taste avoidance by serotonin availability at the 5-HT(3) receptor in the posterior and anterior insular cortex" *J Neurosci* ;32(40):13709-17.

Van De Werd HJ, Uylings HB (2008) "The rat orbital and agranular insular prefrontal cortical areas: a cytoarchitectonic and chemoarchitectonic study." *Brain Struct Funct*; 212(5):387-401

Van Hoesen G., Yeterian EH, Lavizzo-Mourey R. (1981) "Widespread corticostriate projections from temporal cortex of the rhesus monkey" *J Comp Neurol*; 199(2): 205-19.

Verdejo-García A, Bechara A (2009) "A somatic marker theory of addiction" *Neuropharmacology*; 56 (1):48-62.

Vertes RP (2004) "Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat" *Synapse*; 51(1):32-58.

Whishaw I. and Kolb B.(2004) "The behaviour of the laboratory rat" Oxford Scholarship

Yamamoto T, (1984) "Taste responses of cortical neurons" *Prog Neurobiol*; 23(4):273-315.

Yamamoto T (1987) "Cortical organization in gustatory perception" *Ann N Y Acad Sci*. 510:49-54

Yasui Y., Breder C., Saper C B., Cechetto D. (1991) "Autonomic responses and Efferent Pathways from the Insular Cortex in the Rat" *The Journal of Comparative Neurology*; 303(3):355-74.

Zhang X, Giesler GJ Jr. (2005) "Response characteristics of spinothalamic tract neurons that project to the posterior thalamus in rats" *J Neurophysiol*; 93(5):2552-64.

Zikopoulos B, Barbas H (2012)"Pathways for emotions and attention converge on the thalamic reticular nucleus in primates". *J Neurosci*; 32(15):5338-50

IX. APENDICE

Figuras Suplementarias

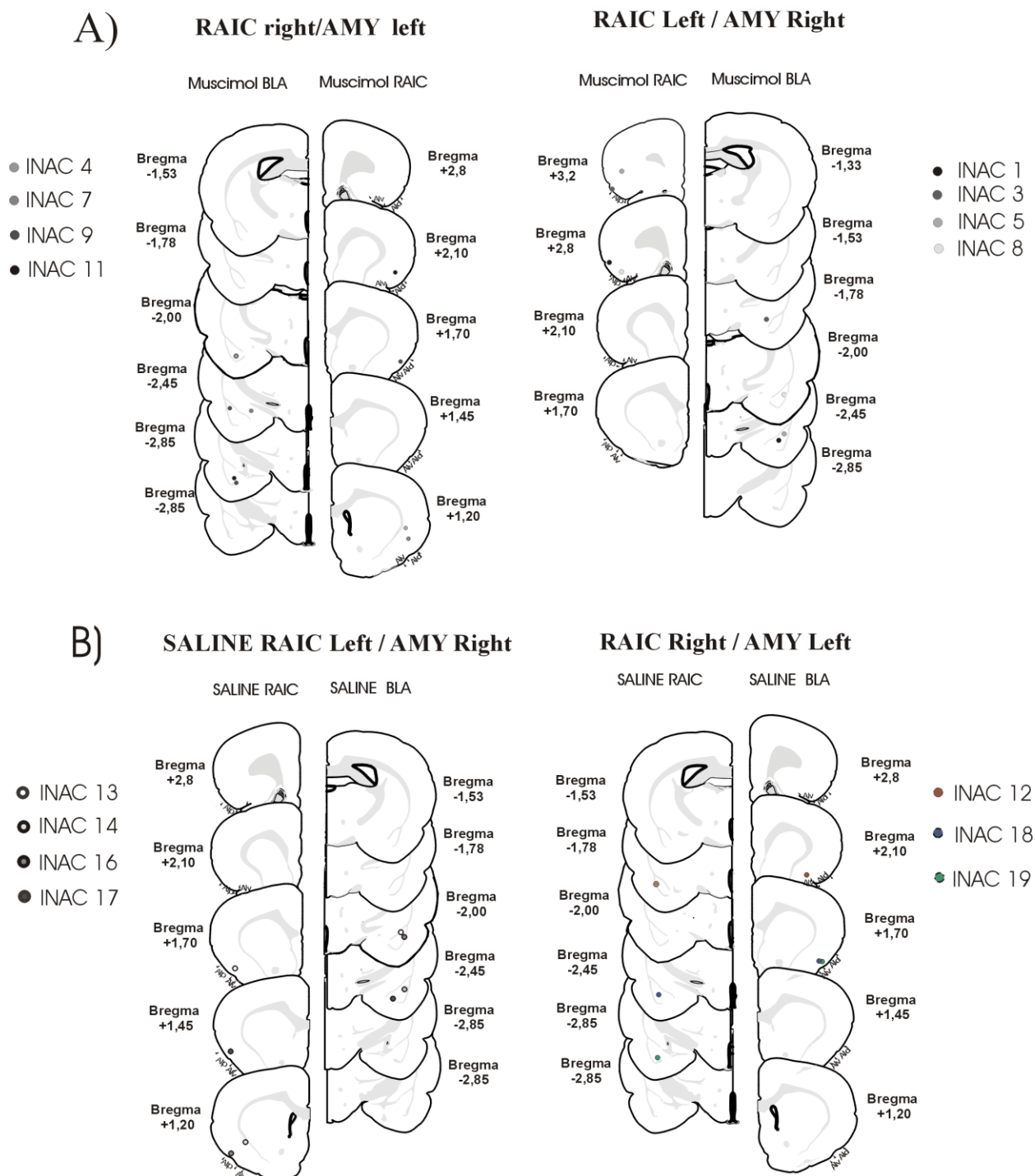


Fig.S1 Esquemas representativos del posicionamiento de cánulas para el tratamiento de inactivación cruzada en el protocolo de extinción. A) Animales microinyectados con

muscimol. Izquierda, animales canulados en RAIC L/AMIG R. Derecha animales canulados en RAIC D/AMIG L. B) Animales microinyectados con salino. Izquierda, animales canulados en RAIC L/AMIG R. Derecha animales canulados en RAIC D/AMIG L. Al costado de cada figura se indica en nivel anteroposterior de acuerdo a bregma según el atlas deA (Swanson 1998).

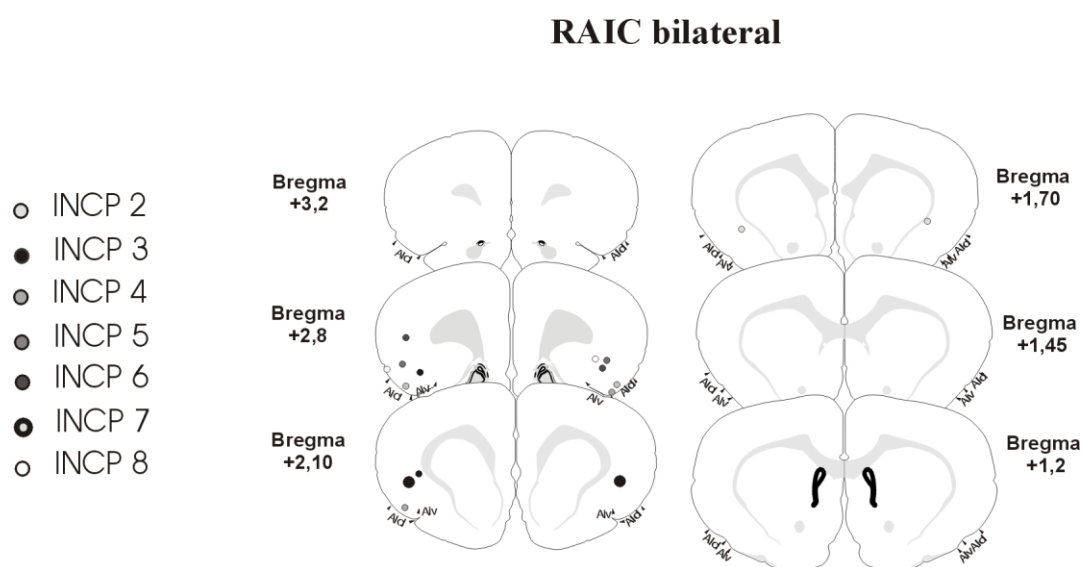


Fig. S2 Esquemas representativos del posicionamiento de cánulas para el tratamiento de inactivación bilateral de la RAIC con muscimol. A la izquierda los 8 animales utilizados. Al costado de cada figura se indica en nivel anteroposterior de acuerdo a bregma según el atlas deA (Swanson 1998).

