



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

CARRERA DE BIOLOGÍA

**Caracterización del Perfil temporal de la
Expresión de la Proteína Fos Inducida por la
Administración de Cocaína en el Sistema
meso-límbico-cortical de la rata.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

PRESENTA

Diana Isabel Rodríguez García

Asesor: Dr. Alberto Salazar Juárez.



Los Reyes Iztacala, Edo. De México 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

ESTA TESIS VA DEDICADA A MIS PADRES QUE ME HAN DADO TODO SU APOYO, QUE SIEMPRE HAN ESTADO A MI LADO Y POR DARMES ESE AMOR INCONDICIONAL Y GRACIAS POR CREER EN MI

A MIS HERMANOS QUE LOS QUIERO MUCHO, A MIS MARAVILLOSOS SOBRINOS GRACIAS POR SER PARTE DE MI VIDA.

A MI ASESOR EL DOCTOR ALBERTO SALAZAR, POR DARMES LA OPORTUNIDAD DE TRABAJAR CON ÉL Y POR TENERME MUCHA PACIENCIA.

A MIS DEMÁS ASESORES POR DEDICARME ESE TIEMPO Y POR INFLUIR EN MIS IDEAS.

A MIS AMIGOS DEL INSTITUTO NACIONAL DE SIQUIATRÍA QUE PASAMOS MUY BUENOS MOMENTOS Y QUE NOS HEMOS ESTADO EN LAS BUENAS Y EN LAS MALAS JUNTOS.

Y POR ULTIMO A TODAS LAS PERSONAS QUE HAN COINCIDIDO EN MI VIDA Y QUE DE TODAS HE APRENDIDO ALGO.

“Tu tiempo es limitado, de modo que no lo malgastes viviendo la vida de alguien distinto. No quedes atrapado en el dogma, que es vivir como otros piensan que deberías vivir. No dejes que los ruidos de las opiniones de los demás acallen tu propia voz interior. Y, lo que es más importante, ten el coraje para hacer lo que te dicen tu corazón y tu intuición. Steven Jobs”

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
Epidemiología del consumo.....	3
Conceptos básicos hacia la adicción a la droga.....	4
¿Qué es la cocaína?.....	8
Historia.....	9
Formas de la cocaína.....	11
Vías de administración.....	11
Efectos.....	16
Sistema Neuronal de Recompensa.....	17
Mecanismo de acción.....	19
Expresión Génica (Fos).....	20
ANTECEDENTES.....	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
HIPÓTESIS.....	27
OBJETIVOS.....	27
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
METODOLOGÍA.....	29
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	34
RESULTADOS.....	35
Actividad Locomotora.....	35
Histología.....	36
DISCUSIÓN.....	50
CONCLUSIÓN.....	61
BIBLIOGRAFÍA.....	63

RESUMEN

En este trabajo se evaluó un modelo del perfil temporal de la expresión de la proteína Fos en las diferentes áreas del Sistema Neuronal de Recompensa, basado en 1, 3, 5, 7 y 10 administraciones continuas de cocaína (10 mg/kg) a ratas Wistar macho. Se correlacionó el aumento gradual en la actividad locomotora inducida por la administración continua de cocaína con un aumento en el número de células inmunoreactivas a la proteína Fos en diferentes regiones del sistema de recompensa. Para su evaluación, se examinaron cortes histológicos del cerebro utilizando la técnica inmunohistoquímica hacia la proteína Fos. Los resultados mostraron que existen dos posibilidades; la primera, se refiere a que en las diferentes áreas del sistema neuronal de recompensa la administración de cocaína induce la activación de un grupo inicial de neuronas las cuales son las responsables de cambios **bioquímicos** que fundamentan la sensibilización y facilitan el aprendizaje adictivo. Lo cual se vea reflejado como un aumento gradual en el número de neuronas inmunoreactivas a c-fos. La segunda, se expresa un aumento en la actividad motora y en el valor de reforzamiento, generando el hábito adictivo.

ABSTRACT

In this paper a model of the temporal profile of the expression of Fos protein in the different areas of Neuronal Reward System , based on 1 , 3, 5 , 7 and 10 continuous administration of cocaine (10 mg / kg) was evaluated in rats Wistar male . The gradual increase in locomotor activity induced by the continuous administration of cocaine with an increase in the number of immunoreactive cells on the Fos protein in different regions of the reward system is correlated . For evaluation, brain tissue sections using immunohistochemistry to Fos protein were examined. The results showed that there are two possibilities : the first refers to the different areas of neuronal reward system cocaine administration induces activation of an initial group of neurons which are responsible for biochemical changes underlying sensitization and addictive facilitate learning . Which is reflected as a gradual increase in the number of immunoreactive neurons in c -fos . The second , is expressed in an increase in motor activity and reinforcement value , generating the addictive habit .

INTRODUCCIÓN

Epidemiología del consumo

En México el fenómeno de las adicciones es un problema de salud pública, que de manera alarmante se ha agudizado en los últimos 20 años, ya que las generaciones actuales tienen mayor accesibilidad a las drogas, mayor consumo que las generaciones anteriores, e índice de dependencia más alto (Medina y Rojas, 2003). En los resultados que arroja la encuesta nacional de adicciones realizada en el año 2008, se encontró que la cocaína es la segunda droga preferida en la población urbana indicando que el intervalo de edad más vulnerable es de 12 a 17 años; ya que el cerebro de los adolescentes está menos desarrollado, precisamente en las áreas que se asocian con la toma de decisiones, y es por ello que tendrían más propensión a tomar riesgos. Por lo tanto, enfrentan importantes riesgos que obligan a pensar en mecanismos para protegerlos de los daños potenciales a la salud durante este periodo de sus vidas (ENA, 2008).

A nivel nacional, el consumo de cocaína tanto en la población urbana como la rural, es mayor en el norte del país, seguido por el centro y finalmente por la región sur. En el país, la ciudad con más consumo es Baja California, seguida por Chihuahua. Los datos socio demográficos indican que del total de los consumidores, 89% son hombres, de ellos 60% solteros y 64% de nivel socio económico bajo. Del total de las mujeres 11% son solteras y 62.7% de nivel socio económico bajo. En cuanto a la edad de los hombres, la mayor proporción de ellos tiene 30 años o más (32.9%) y la edad de las mujeres es de entre 15 y 19 años (34.2%) (ENA, 2008).

En cuanto a la ocupación, 34.6% de los hombres consumidores es empleado o comerciante y el 34.7% de las mujeres consumidoras es estudiante. La escolaridad de los hombres es secundaria completa en 24.4%, mientras que en las mujeres es de 19.4%. El mayor uso de sustancias tanto para hombres como para mujeres corresponde a marihuana, cocaína e inhalables, mostrándonos que el

consumo es mucho mayor en los hombres que en las mujeres, independientemente de la región (ENA, 2008).

Conceptos básicos hacia la adicción a la droga

El término “adicción a las drogas” o “dependencia a las drogas” generalmente se refieren a una respuesta que el individuo genera a la droga que implica pasar por una serie de pasos desde su *uso recreativo, abuso, dependencia, adicción, tolerancia e intoxicación* (Redda *et al.*, 1990).

El uso recreativo de una droga es el más común, y se refiere al consumo de sustancias psicoactivas con propósitos recreacionales principalmente para divertirse en ambientes nocturnos. De hecho es muy común, que las personas consuman una droga solo con el fin de alcanzar un objetivo concreto como el ser parte de un grupo social determinado, aprender experiencias nuevas, conocer el cuerpo y sus reacciones, etc. (Ahmed *et al.*, 2002).

El abuso de una droga consiste en un patrón desadaptativo de consumo de una sustancia que conlleva a un deterioro o malestar clínicamente significativo, expresado por uno o más de los siguientes criterios durante un período de doce meses (Koob *et al.*, 2010).

1. Consumo recurrente de sustancia, que da lugar al incumplimiento de obligaciones en el trabajo, la escuela o el hogar.
2. Consumo recurrente de la sustancia en situaciones en la que hacerlo es físicamente peligroso.
3. Problemas legales repetidos relacionados con la sustancia.
4. Consumo continuado de la droga a pesar de tener problemas sociales o interpersonales causados por la ingesta de la droga.

La dependencia a la droga, se desarrolla junto con la tolerancia, las administraciones de dosis repetidas o periódicas ocurre para evitar el síndrome de abstinencia fisiológica y experimentar sus efectos psíquicos (Eddy *et al.*, 1965) Por ejemplo, el uso de las benzodiazepinas para inducir el sueño en sujetos que sufren

dificultades para conciliar el mismo; el uso continuo de las benzodiazepinas provoca, finalmente, que el sueño sólo sea inducido gracias a su consumo. De tal forma, que un sujeto que lleva un tiempo consumiendo benzodiazepinas para dormir, tendrá luego grandes dificultades para conciliar el sueño si no las consume. Este sujeto se ha hecho dependiente al uso de las benzodiazepinas. Su consumo, entonces, se hace de modo preventivo (en prevención de no poder dormir), o bien, para inducir el sueño cuando descubre que de otro modo no puede lograrlo (uso paliativo). De tal forma, que cuando la vida cotidiana del sujeto gira prioritaria o exclusivamente en torno a la búsqueda y al consumo de la sustancia; es entonces cuando puede decirse que una persona es dependiente a esa sustancia.

Existen dos tipos de dependencia, *la física y la psíquica*, asociadas o no, se caracterizan por estos síntomas generales: la dificultad de resistirse a las ganas de consumir, hay un incremento de ansiedad ante el evento de consumo habitual, pero experimentan un alivio cuando se produce el consumo y al final surge el sentimiento de pérdida del autocontrol respecto al consumo (Nelson, 1982).

La dependencia psíquica se refiere a que durante la privación de una droga de la que se es dependiente se provoca una sensación de malestar y ansiedad que puede llegar a la depresión. Esta interrupción altera las costumbres, deja un vacío y permite la reaparición del malestar que el consumo intentaba suprimir. Esto explica en gran medida las recaídas, que forman parte del lento proceso de des-adicción que permite consolidar una vida sin relación problemática con las drogas.

La dependencia física es cuando el organismo reclama la sustancia mediante la aparición de síntomas fisiológicos que se traducen en un estado de carencia. La privación de algunas drogas tales como los opiáceos, el tabaco, el alcohol y ciertos psicofármacos genera un malestar físico que varía según la sustancia de la que se trate: dolores con los opiáceos, temblores con el alcohol, convulsiones con los barbitúricos y las benzodiazepinas, etc. Estos síntomas pueden ir acompañados de alteraciones psicológicas (ansiedad, irritabilidad, angustia, agitación, entre otros).

La adicción es una dependencia hacia una sustancia de abuso, actividad o relación que arrastra a una persona lejos de todo lo demás que le rodea. Está caracterizada por alteraciones neurofisiológicas crónicas asociadas a un deseo compulsivo que consume los pensamientos y comportamientos de las personas, y modifica patrones conductuales encaminados a conseguir la cosa deseada (la búsqueda y el consumo de sustancias psicotrópicas) o para comprometerse en la actividad deseada (comportamientos adictivos), así como la manifestación de un estado emocional alterado cuando se impide el acceso a ellas (American Psychiatric, 1994). Y, a diferencia de los simples hábitos o influencias consumistas, las adicciones son "dependencias" con graves consecuencias en la vida real que deterioran, afectan negativamente, y destruyen relaciones, salud (física y mental), y la capacidad de funcionar de manera efectiva.

Un adicto es una persona "dependiente" de aquella cosa que domina sus pensamientos y deseos y dirige su comportamiento, y la pretensión de esa cosa se convierte en la actividad más importante de su vida. Sin embargo, un sujeto dependiente no es necesariamente un sujeto adicto y viceversa. Por ejemplo, algunas drogas (algunos medicamentos para la diabetes) no causan adicción, pero pueden provocar dependencia física. Otras drogas causan adicción sin llevar a la dependencia física (la cocaína es un ejemplo) (Koob, 2006). Existe un concepto erróneo sobre la cocaína, se considera que es una droga recreativa segura (Redda et al., 1990). Esta idea podría deberse, en parte, a las declaraciones en la literatura que la cocaína no es adictiva.

La tolerancia se refiere al proceso del aumento de las dosis para producir el efecto inicial de la droga, ya que hay una disminución de este, debido a que el consumo de la sustancia es usada de manera regular. Este fenómeno es muy importante para el desarrollo de la dependencia a una sustancia; en estos procesos, la necesidad de tomar dosis más grandes, y repetir su autoadministración, también coinciden con los eventos observados con los opiáceos, barbitúricos y el alcohol. Existen varios tipos de tolerancia:

-
-
- a) *Cruzada*: La cocaína genera tolerancia a todos los psicoestimulantes, aun cuando el sujeto no haya tenido contacto con esta segunda sustancia.
- b) *Inversa*: Es la posibilidad que posee la cocaína de producir los mismos efectos psicológicos y fisiológicos con dosis cada vez más pequeñas. Generalmente esta propiedad tiene su base en la farmacocinética de las sustancias.
- c) *Tolerancia farmacocinética*: También llamada tolerancia metabólica, viene determinada por una serie de características del propio fármaco. La vida media de la cocaína (tiempo que tarda en reducirse una determinada concentración a la mitad) puede modificarse por la vía de administración, pero también por la frecuencia de consumo o por el modelo de distribución.
- d) *Tolerancia funcional*: Es la denominada celular, tisular o farmacodinámica. Se desarrolla en los lugares de acción de las drogas (tejidos, receptores).

Intoxicación es cuando un sujeto adicto a una sustancia psicoactiva como la cocaína consume dosis supra-umbrales del psicoestimulante, el sujeto entra en un estado de intoxicación, el cual es definido por los siguientes criterios:

1. Presencia de un Síndrome reversible específico debido a su ingestión reciente.
2. Cambios psicológicos o del comportamiento, des-adaptativos, clínicamente significativos, debidos al efecto sobre el sistema nervioso central, que se presentan durante el consumo de la sustancia o poco tiempo después.
3. Presencia de dos o más de los siguientes signos que aparecen durante o poco tiempo después del consumo de cocaína : Taquicardia o bradicardia, dilatación pupilar, aumento o disminución de la tensión arterial, sudoración o escalofríos, náuseas o vómitos, pérdida de peso demostrable, agitación o retrasos psicomotores, debilidad muscular, depresión respiratoria, dolor en el pecho o arritmias cardíacas, confusión, crisis comiciales (ataques epilépticos), discinesias (movimientos anormales e involuntarios), distonías (contracciones sostenidas de los músculos) o coma.
4. Los síntomas no se deben a una enfermedad médica y no se explican por la presencia de otro trastorno mental.

La dosis tóxica es variable, hay personas que tienen una sensibilidad especial a la cocaína que las hace reaccionar ante dosis muy pequeñas y entran rápidamente en estado de shock, a veces durante la misma aplicación de la droga. La cifra tóxica está generalmente alrededor de los 20 a 30 mg, pudiendo en los adictos llegar a los 3-5 g en una dosis.

¿Qué es la cocaína?

La cocaína es una droga estimulante natural que se encuentra en las hojas de la planta de coca *Erythroxylon coca* (figura 1), aunque no fue extraída de la hoja de la coca hasta mediados del siglo XIX (Roger *et al.*, 1994). Al consumirla se experimenta mejoría de la autoestima y la auto-confianza, acompañada de excitación. Estos efectos son inmediatos y duran entre 30 y 60 minutos y son consecuencia de la inhibición de la recaptura de dopamina. Adicionalmente la cocaína inhibe el apetito y el sueño. Sus efectos adversos son la contracción de los vasos sanguíneos, espasmos musculares, dolor de pecho, embolias o derrames cerebrales, aumento de frecuencia cardíaca y muerte.

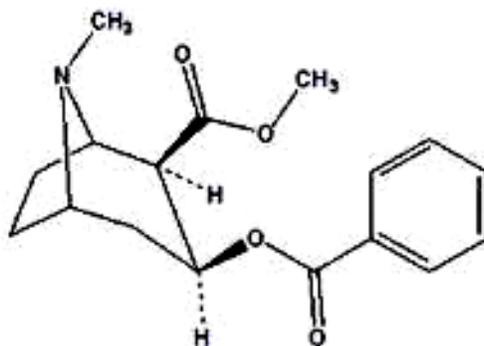


Figura 1: Estructura química de la cocaína

Historia

El uso de la planta de coca, generalmente se asocia con las civilizaciones peruanas prehispánicas, específicamente con el imperio Inca (Oropeza et al., 2005). La hoja de coca se ha utilizado en el pasado para una variedad de ritos religiosos, medicinales y relacionados con el trabajo. Los pueblos andinos masticaban las hojas secas, junto con cenizas de otras plantas, para combatir el hambre y el cansancio (Roger et al., 1994).

Después de la conquista de los Incas en el siglo XVI, los españoles buscaron terminar con la asociación ritual y religiosa que tenían las hojas de coca. Aunque, así como sucedió con el peyote, la marihuana y los hongos en otras culturas prehispánicas, el uso de la coca continuó entre los esclavos indígenas en la minas de plata para aumentar su rendimiento (Oropeza et al., 2005). Los españoles usaron la planta como moneda para pagar a los trabajadores indios.

La iglesia católica se oponía fuertemente a esta práctica, sin embargo, las costumbre continuaron y finalmente los conquistadores españoles adoptaron la costumbre de pagar en “Moneda de Coca” (Weinswig, 1974). En 1855 un químico alemán llamado Friedrich Gaedecke fue el que extrajo el ingrediente activo de la hoja de coca llamada *Erythroxyline*. En 1859, en Alemania, Albert Niemann; aisló la cocaína a partir de las hojas del arbusto y lo renombró cocaína. El que llevó a cabo una gran cantidad de investigación sobre esta droga en 1880 fue Sigmund Freud, este empleó y recomendó la cocaína en el tratamiento de afecciones físicas y psicológicas, como el asma, problemas gastrointestinales, depresión y alcoholismo, además como anestésico local en los oídos, boca y ojos (Oropeza et al., 2005).

Un químico Corso llamado Angelo Mariani comprendió el poder de esta nueva droga descubierta, y se dio cuenta de que había dinero de por medio, en 1863 produce una mezcla de hojas de cocaína y vino, que él llamó “Vin Mariani”. Este tónico fue un suceso fenomenal: entre los que consumían el tónico se encontraban reyes, reinas, dos papas y figuras tan notables como Thomas Edison, H. G. Well y

Julio Verne. La dependencia a la cocaína alcanzó proporciones alarmantes en Alemania, abarcando todos los estratos sociales.

En América, el cirujano Halstead descubrió que la cocaína podía ser utilizada como bloqueador del sistema nervioso; en el proceso de experimentación, él mismo se volvió dependiente de la droga (Weinswing, 1974).

En 1886, un químico americano llamado John Styth Pemeberton creó una nueva patente medicinal que fue anunciada como “un tónico valioso para el cerebro y la cura para todas las afecciones nerviosas, enfermedades como, dolor de cabeza, neuralgia, histeria, melancolía, etc.” Esta patente medicinal más tarde fue promovida como una bebida sin alcohol con cocaína como el mayor ingrediente activo, así nació la Coca Cola.

El consumo de la cocaína también fue popularizado en la literatura a finales del siglo XIX; nada menos que Sherlock Holmes regularmente se inyectaba la droga. Eventualmente; sin embargo, en la primera parte del siglo XX, este entusiasmo adictivo sin límites por la cocaína empezó a ser atenuado por la creciente evidencia de las propiedades adictivas de la droga (Roger *et al.*, 1994). En 1914, en Estados Unidos de América, se promulgó la Ley Harrison, esta ley prohibió el consumo de la cocaína, lo que dio lugar al tráfico ilegal de la sustancia. En 1923, en México, el general Obregón lanzó un decreto que prohibía la importación del opio, cocaína, heroína y sus derivados; una de las aplicaciones detrás de este decreto era la necesidad del régimen obregonista, de congraciarse con el gobierno de Estados Unidos que cada vez ampliaba más su campaña antinarcótica. En 1925, el presidente de México Plutarco Elías Calles derogó el decreto de 1923 y lo sustituyó por uno donde se establecía que el Departamento de Salubridad Pública otorgaría los permisos de importación de cocaína, entonces retomó su auge el comercio ilícito de drogas (Pérez, 1999).

En los años setentas, el aumento en el consumo, se asoció con el surgimiento y difusión de diversos movimientos sociales y de contra cultura.

Formas de la cocaína

De acuerdo con Brailowsky (1995) la cocaína es un alcaloide (una base de nitrógeno de la planta), con distintas formas químicas:

Crack o Roca es la forma de la cocaína base libre procesada de la sal con bicarbonato de sodio. Este producto contiene todavía impurezas encontradas en el material original junto con un poco de bicarbonato en exceso del proceso. Es el bicarbonato en los pedazos resultante de la cocaína que hace el sonido crujiente cuando la mezcla se calienta, de ahí su nombre. Cuando se prepara de esta manera, al fumar 50 mg de base solamente se inhala de 16 a 32 mg de cocaína (Perez *et al.*, 1982; Folti *et al.*, 1991; Paly *et al.*, 1982 y Jeffcoat *et al.*, 1989). La potencia de la cocaína fumada es de un 60% sobre la de la cocaína que solo es inyectada, por lo menos en lo que respecta a la producción de efectos cardiovasculares (Folti *et al.*, 1991).

La pasta de coca es una forma de cocaína base libre. Es muy común en América del sur donde las hojas de coca son fácilmente disponibles y no es muy apreciada en Estados Unidos. La pasta es un extracto parcialmente purificado de la hoja y que contiene entre 20 a 90% de sulfato de cocaína. Un material de hoja precipitado se extrae en queroseno y la mezcla es filtrada y es secada para producir una preparación que es esencialmente una forma impura de la base libre. La pasta puede contener queroseno atrapado y/u otros solventes usados en el proceso, el habito de fumarla podría traer efectos patológicos en el pulmón y el hígado, además de la posible toxicidad de la cocaína en sí (Redda *et al.*, 1990).

El clorhidrato de sal, es un polvo blanco y cristalino, que usualmente se mezcla con cafeína, azúcares, anfetaminas, u otras sustancias para “rebajarlo o cortarlo” (Brailowsky, 1995).

Vías de administración

El principal objetivo del abuso de la cocaína es conseguir el efecto más intenso y estimulante o “*high*”. La intensidad y duración del *high* son dependientes de la dosis y de la ruta de administración. La duración del *high* es mayor cuando la

cocaína se consume por vía de absorción lenta; por otro lado, la intensidad del efecto es lento. En contraste, cuando la cocaína es administrada por vías de absorción rápida, el resultado del *high* es intenso, pero su duración es breve. Distintas vías de administración han sido utilizadas por el consumidor de cocaína y cada una produce su propio patrón de absorción característico y problemas asociados (cuadro 1).

Tópica: Es la única vía lícita de administración y se utiliza para la aplicación local de anestésicos. Hay una absorción insuficiente en esta ruta cutánea para causar una respuesta psicotrópica ya que se ha visto que los niveles en la sangre en estos pacientes sometidos a un proceso quirúrgico son muy bajos en comparación con usuarios recreativos. Los otorrinolaringólogos y cirujanos plásticos aun usan una combinación de epinafrina y cocaína para mantener un campo operatorio seco. El peligro de esta práctica se ha convertido en más evidente, aunque ya es usada con mucho menos frecuencia.

Oral (masticación de hojas): Los nativos del sur de América masticaban hojas de coca mezclados con álcali (cenizas) y luego de masticarla se la colocaban entre la mejilla y la encía. El resultado del *high*, producido por la masticación era muy poco o ninguno, probablemente debido a la lenta absorción y a la poca concentración de cocaína en la sangre, que es únicamente la mitad que la que se obtiene por medio de la esnifada (inhalación). Habitualmente los usuarios mastican un promedio de 12 a 15 gr de hojas en un lapso de tres a cuatro veces al día. Dependiendo de la cantidad de la hoja, el alcaloide contenido es usualmente menos del 0.5%. En consecuencia la cantidad total consumida en un momento dado es únicamente de 75 mg.

Inhalación nasal (esnifada): La cocaína se absorbe rápidamente por medio de la mucosa nasal. El *high* inducido por la inhalación de la cocaína pudo haber sido notado por primera vez por un enfermo que sufría de alergia, ya que la cocaína se utilizaba como un descongestionante y por un tiempo era el remedio oficial que usaban en la Asociación de la Fiebre de Heno. Los resultados de los niveles en la concentración plasmática varían cuando la cocaína es inhalada. En general, las

concentraciones plasmáticas máximas son proporcionales a la cantidad de la ingesta de cocaína (Wilkinson *et al.*, 1980). Porque la cocaína es un vaso constrictor, que inhibe su absorción, y el tiempo que tarda en llegar a la concentración máxima se hace más larga cuando la dosis es mayor. Cien mg, que aproximadamente equivalen a dos o tres “líneas”, produce un nivel en la sangre de 50-100 ng/mL, suficiente para causar un incremento trascendente en el pulso y en la presión arterial (Javaid *et al.*, 1978; Javaid *et al.*, 1983; Fischman *et al.*, 1983 y Foltin *et al.*, 1988).

Administración intravenosa: Cuando la cocaína es tomada por vía parental, el rápido comienzo produce un intenso *high* que es similar al de la inhalación nasal y mucho más bajo que masticarla. Un aspecto importante del uso de la cocaína intravenosa es que se requieren múltiples inyecciones frecuentes para obtener el “high”, en comparación con los usuarios de estupefacientes que se inyectan con poca frecuencia para obtenerlo. Este no es un método muy popular de administración, debido a los problemas asociados con las agujas ya que corren mayor riesgo de infectarse de SIDA y de otras complicaciones infecciosas por el uso de drogas administradas por vía intravenosa.

Aplicación genital: Tiene dos aplicaciones la rectal y la genital, su absorción es rápida y relativamente completa. Los altos niveles en la sangre se alcanzan muy rápidamente. Además, la cocaína utilizada de esta manera también actúa como un anestésico local. Por obvias razones, la aplicación rectal se ha hecho muy popular entre los homosexuales.

Absorción dérmica: La cocaína se adhiere a la piel y puede ser absorbida a través de ella. La cocaína se puede recuperar de la piel de las personas que han manejado el *crack*, incluso después de lavarse bien las manos, aunque en la mayoría de los casos, es muy poco probable recuperarla ya que han estado en contacto con otros objetos (Maloney *et al.*, 1994). Incluso en cantidades muy pequeñas de cocaína aplicada sobre la piel puede causar la aparición del metabolito de cocaína en la orina, los niveles por la exposición de la piel general mente son muy bajos para producir síntomas.

Fumada (pasta base): Esto se hace colocando el alcaloide de cocaína puro en una pipa, se fuma una mezcla del alcaloide y perejil, tabaco, o mariguana, o mediante la mezcla de una pasta en los cigarros. La extracción de la cocaína base con solventes volátiles, se hizo popular a principios de los 80s, y se conoció como pasta base, y dio paso a fumar crack. El origen de esta práctica no es muy preciso. Fue principalmente observado en Jamaica en 1983 (Jekel *et al.*, 1986). La primera mención del uso en Estados Unidos fue en la ciudad de Nueva York en 1985 (Gross, 1985). Cuando la cocaína base es fumada, los niveles máximos en la sangre son comparados con los obtenidos con los del uso intravenoso, que son rápidamente alcanzados.

TIPO DE SUSTANCIA	CONCENTRACIÓN DE COCAÍNA	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	% PLASMA	VELOCIDAD APARICIÓN DE EFECTOS	CONCENTRACIÓN MÁXIMA PLÁSMA	DURACIÓN EFECTOS	DESARROLLO DEPENDENCIA
HOJAS DE COCA	0.5 – 1.5%	Mascado infusión oral	20 - 30%	Lenta	60 Minutos	30 – 60 Minutos	No
CLORHID. COCAÍNA	12 - 75%	Tópica: ocular, genital, intranasal (esnifar)	20 - 30%	Relativamente Rápida	5 – 10 Minutos	30 – 60 Minutos	Si Largo Plazo
CLORHID. COCAÍNA	12 - 75%	Parental: endovenosa, subcutánea, intramuscular	100%	Rápida	30 – 45 Segundos	10 – 20 Minutos	Si Corto Plazo
PASTA DE COCA	40 – 85% (Sulfato de cocaína)	Fumada	70 - 80%	Muy Rápida	8 – 10 Segundos	5 – 10 Minutos	Si Corto Plazo
COCAÍNA BASE	30 – 80% (alcaloide cocaína)	Inhalada - fumada	70 - 80%	Muy Rápida	8 – 10 Segundos	5 – 10 Minutos	Si Corto Plazo

Cuadro 1: Las diferentes vías de administración y sus principales características

Efectos

El “high” es la acción de interés para el consumidor de cocaína. Los efectos de la cocaína en dosis bajas (aproximadamente hasta 200 mg) y a corto plazo son: sentimientos de energía, poder, competencia, aumento en el estado de alerta, percepción de mayor capacidad para el trabajo físico e intelectual, disminución de la fatiga, del hambre, del sueño, locuacidad, entre otros. Además, produce temblor, dilatación de las pupilas, inquietud, náuseas, aumento de la temperatura corporal, del ritmo cardíaco y de la presión arterial. Cuando se usan dosis altas (mayores a 200 mg) a corto plazo, el *high* es mayor. Los consumidores pronto se desploman y el sentimiento de euforia es remplazado por una fase de irritabilidad, temblores, vértigo, espasmos musculares, paranoia, ansiedad y rara vez ocurre muerte súbita debida a paros cardíacos o paro respiratorio (Oropeza *et al.*, 2005).

Con el consumo repetido de cocaína se desarrolla la tolerancia a la droga, esto implica, la necesidad de aumentar la dosis para obtener el mismo efecto. Entre los efectos de dosis altas a largo plazo, se pueden presentar alucinaciones, cambios súbitos en el estado de ánimo, pérdida de apetito (anorexia), insomnio, conductas estereotipadas y repetitivas (como tocar algunas partes del cuerpo y rechinar los dientes al punto de dañarlos), e ideas paranoides (Roger *et al.*, 1994).

En cuanto a los efectos fisiológicos a largo plazo por el consumo de la cocaína, se pueden presentar hemorragias nasales, complicaciones respiratorias (debido a la perforación del tabique nasal) (Hautant, 1910 y Maier, 1926), cardiovasculares, neurobiológicas, gastrointestinales, o lesiones en la piel que resultan de alucinaciones táctiles, como sentir insectos. Además, los usuarios pueden sufrir depresión, somnolencia y una fuerte necesidad de obtener la droga (Krutchkoff *et al.*, 1990).

Los efectos de la cocaína sobre el embarazo se manifiestan como abortos, prematuridad y complicaciones obstétricas. En el producto se pueden observar malformaciones congénitas, una circunferencia craneal de menor tamaño, bajo peso y una probable dependencia a la sustancia (Redda *et al.*, 1990).

Sistema Neuronal de Recompensa

Al llevar a cabo conductas como comer o tener sexo (reforzador), el sujeto experimenta una sensación placentera (reforzamiento), la cual el sistema nervioso central regula mediante un circuito neuronal muy específico, denominado, sistema de motivación-recompensa (figura 2) (Martel *et al.*, 1996 y Fiorino *et al.*, 1997).

La función primaria de este circuito neuronal, es traducir, integrar y generar una respuesta adecuada a un reforzador dado, ya sea natural como el alimento, agua, sexo o artificial como las drogas de abuso. Se ha reportado que el consumo de alguna droga de abuso, como la cocaína, activa a este circuito de dos a 10 veces más que el inducido por un reforzador natural (Zombeck *et al.*, 2008); dando como resultado que el sujeto interprete al reforzador subjetivamente como una “sensación intensa de placer”.

El sistema de recompensa está integrado por distintas áreas del cerebro las cuales trabajan de forma conjunta. El área tegmental ventral (VTA), es uno de los componentes neurales de más importancia no solo para traducir el estímulo-droga, sino también para generar una respuesta adecuada al mismo, la sensación reforzante-placentera (Koob *et al.*, 2010; Robinson *et al.*, 1993 y Mc Clure *et al.*, 2003). El VTA es un núcleo del cerebro que está compuesto principalmente por dos poblaciones de neuronas; neuronas dopaminérgicas de proyección larga e inter-neuronas de tipo GABAérgicas.

Las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas que se originan en el área tegmental ventral se proyectan a otra área del cerebro muy importante para integrar la información del estímulo, el núcleo acumbens (NAc) (Schultz, 2001).

El núcleo acumbens está compuesto por neuronas espinosas GABAérgicas. Las cuales se localizan en dos sub-compartimientos funcionalmente distintos, llamados, shell y core (Kelley, 2004). La región shell recibe proyecciones de varias áreas del cerebro provenientes de la corteza, amígdala y el VTA (Robinson *et al.*, 1993 y Kelley, 2004). Esta característica le permite al núcleo acumbens shell integrar

los impulsos, uniendo motivación con acción, por un lado, la información referente a un reforzador natural o artificial, a establecer e integrar las asociaciones contextuales entre eventos reforzantes y las percepciones concurrentes del entorno, y por otro, generar y modular la intensidad de la respuesta motivacional-consumatoria al reforzador (Bassareo *et al.*, 1999 y Di Ciano *et al.*, 2001).

Por el contrario la región core, es el sitio efector primario de mediación de la expresión de conductas aprendidas/consumatorias en respuesta al estado de estimulación en la región shell del núcleo acumbens (Kelley, 2004 y Di Ciano *et al.*, 2001). El grado de estimulación de ambas áreas del núcleo acumbens está determinado por la cantidad de dopamina que se libera por un reforzador dentro de sus terminales (Ito *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2003).

Otra estructura neural del sistema de recompensa de suma importancia es la corteza prefrontal (PFC). La PFC está compuesta por neuronas de proyección principalmente de tipo glutamatérgica, las cuales proyectan a las neuronas GABAérgicas localizadas en la porción shell del núcleo acumbens. Entre las funciones de la PFC se encuentra el control de los impulsos, la toma de decisiones, el juicio y el análisis en contexto de la información visceral y emocional (Hutcheson *et al.*, 2003)

Finalmente la estructura encargada de establecer las asociaciones aprendidas entre los eventos motivacionalmente relevantes y los estímulos neutros que se convierten en predictores del evento es la amígdala, principalmente en su región baso lateral (Everitt *et al.*, 2003). La amígdala está compuesta por neuronas de tipo glutamatérgicas las cuales también proyectan a la porción shell delacumbens.

De tal forma las áreas antes descritas al ser afectadas por la cocaína integran y generan una respuesta adecuada al estímulo droga, el desarrollo de la conducta compulsiva de búsqueda y consumo de la droga.

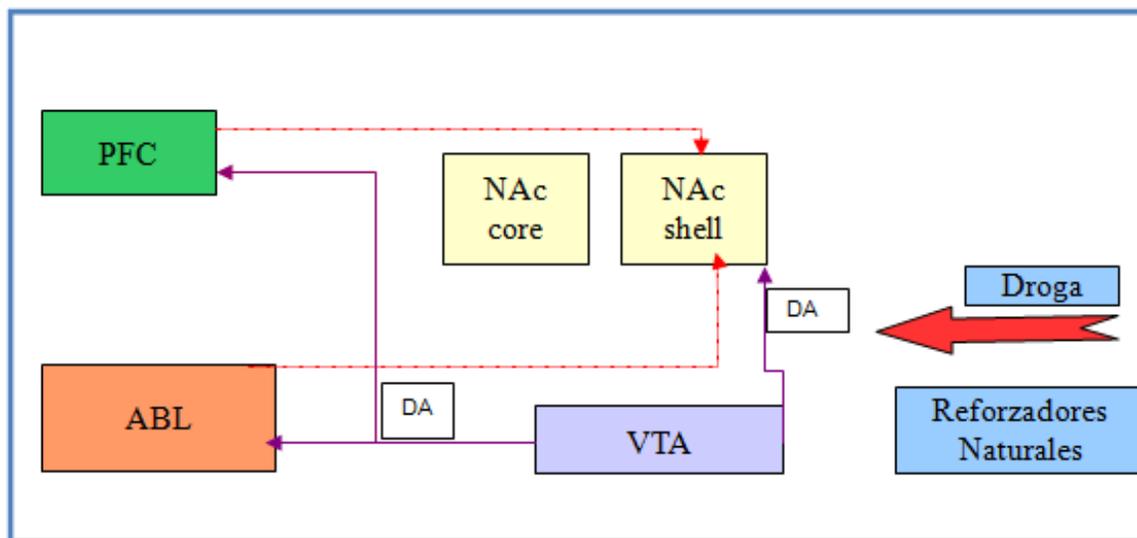


Figura 2: Vías dopaminérgicas mesolímbicas y mesocorticales. Las líneas punteadas rojas representan las conexiones recíprocas glutamatergicas que de la corteza prefrontal y la amígdala se proyectan sobre el núcleo accumbens. PFC: corteza prefrontal; NAc: núcleo accumbens; VTA: área tegmental ventral; ABL: amígdala basolateral.

Mecanismo de acción

Una neurona dopaminérgica al ser estimulada eléctrica o químicamente libera dopamina dentro del espacio sináptico (el pequeño espacio entre dos neuronas). Allí, la dopamina tiene tres caminos; primeramente se une con proteínas específicas, llamadas receptores de dopamina, localizados principalmente en la neurona postsináptica, resultando en la activación de la misma (figura 3).

El segundo camino que sufre la dopamina es el catabolismo (*clearence*) de la molécula de dopamina, por parte de enzimas especializadas localizadas en la hendidura sináptica y finalmente el tercer camino es la recaptura de las moléculas de dopamina por parte de una proteína especializada llamada transportador de dopamina (DAT), la cual permite la internalización de las moléculas de dopamina al interior del botón sináptico, donde a través del transportador vesicular de las catecolaminas (VMAT-2) ingresan al interior de las vesículas sinápticas, el mismo VMAT-2 sesa la concentración en citosol e indirectamente puede detener la liberación de la misma (Harvey *et al.*, 1998).

La cocaína interfiere con este proceso normal de comunicación (figura 3). La cocaína que es inhalada o es administrada por vía intravenosa atraviesa rápidamente la barrera hematoencefálica, de tal forma que se observan los niveles máximos de cocaína en el cerebro a los 30 segundos, mientras que fumada sólo tarda 5 segundos.

Una vez localizada la cocaína dentro del cerebro, ésta se adhiere al transportador de dopamina y lo bloquea totalmente, esto da como resultado que se evite la recaptura de la dopamina por el DAT, y que la neurona siga liberando la dopamina y finalmente que la concentración de dopamina intra-sináptica aumente significativamente. La acumulación de dopamina causa una estimulación continua de la neurona postsináptica, lo que contribuye a aumentar los efectos placenteros de la cocaína (Harvey *et al.*, 1998).

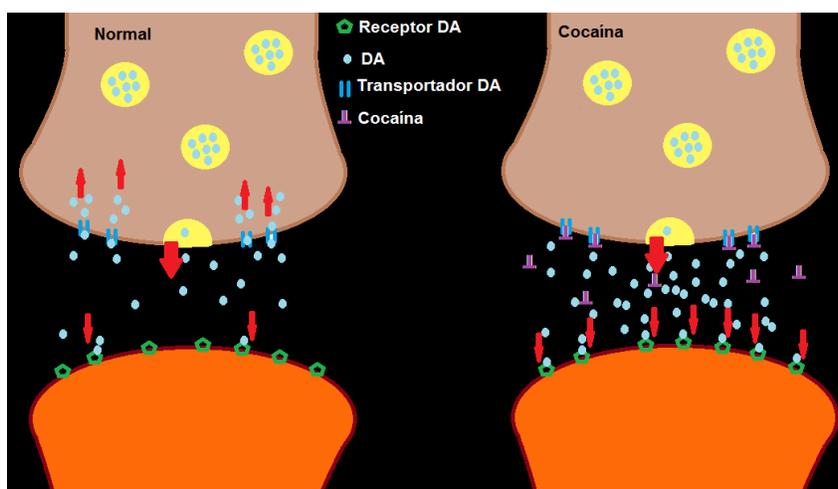


Figura 3: Mecanismo acción normal y con cocaína de una neurona.

Expresión Génica (Fos)

Existen dos familias de receptores dopaminérgicos los D1-like y los D2-like. Ambas familias de receptores están localizadas en los mismos sitios del sistema nervioso central, principalmente en neuronas estriatales que proyectan a la parte interna del globo pálido/sustancia nigra reticulada, en núcleos del sistema límbico, e

importantemente en el núcleo acumbens, en sus dos porciones, y en la corteza prefrontal.

Estos receptores median el efecto reforzador de los psicoestimulantes. Los receptores D1-like están acoplados a una proteína G que estimula a la adenilato ciclasa (AC) la cual activa a proteínas quinasas (PKA) dependientes del AMPc. En cambio los receptores D2-like inhiben a la adenilato ciclasa inhibiendo la activación de las proteínas quinasas dependientes del AMPc.

Como se mencionó anteriormente, a nivel neuroquímico la administración aguda y repetida de cocaína incrementa los niveles extracelulares de dopamina, al bloquear la recaptura de la misma a través de su transportador. Esto genera una acumulación de la dopamina en la hendidura sináptica, incrementando la activación de los receptores dopaminérgicos.

Como se mencionó en el párrafo anterior, la unión de la dopamina (DA) con el receptor D1 conduce, a la estimulación de la proteína quinasa A (PKA) dependiente del AMPc. La cual fosforila al CREB en la serina 133 (Gonzalez *et al.*, 1989; Sheng *et al.*, 1990). CREB (Elemento Respuesta al AMPc), es una proteína que actúa como una señal de regulación de la transcripción de algunos genes, mediante la unión a secuencias consenso del ADN denominadas Elementos de Respuesta a AMPc (CRE). Al unirse a estas regiones CREB tiene la capacidad de aumentar o disminuir la transcripción de algunos genes.

De tal forma CREB es la molécula llave a través de la cual estímulos externos pueden inducir un aumento o una disminución de la transcripción de un gen dado (acoplamiento estímulo-transcripción) y de esta forma regular la respuesta adecuada al estímulo. CREB se expresa en todas las células en el cerebro, se localiza fuera del núcleo.

La fosforilación de CREB en la serina 133 le va a permitir entrar al núcleo, unirse a la región CARE/CRE y activar una serie de genes como fra-1, fra-2, fos-B, c-jun, jun-B, jun-D, Krox-20 y c-Fos. (Lanahan) (Figura 4). Se ha reportado que los cambios inducidos por las drogas en la maquinaria regulatoria transcripcional (factores de

transcripción) puede inducir la expresión alterada de genes blanco específicos lo cual podría generar las anomalías conductuales que caracterizan la adicción (Nestler, 2000 y Nestler, 2005).

Mediante el uso de la técnica de microarreglos (por ejemplo, Affymetrix U3A) se detectó un total de 117 genes regulados por la administración de cocaína de los cuales 89 son regulados a la alta y 22 son regulados a la baja. Muchos de los genes regulados a la alta representan factores de transcripción de genes de expresión temprana (c-fos, krox-20, NGFI-A, NGFI-b, Per, entre otros) los cuales influyen en la actividad celular indirectamente regulando la expresión de genes blanco. Otro grupo de genes que son regulados por la cocaína son genes que codifican proteínas efectoras que directamente afectan las funciones neuronales, como Homer, Arc y Vesl, proteínas que participan en la regulación de la plasticidad neuronal (Yuferev *et al.*, 2003).

Con respecto a la expresión de la proteína Fos, esta fue la primera proteína descrita de una superfamilia de factores de transcripción que contienen en su estructura primaria un cierre de leucinas, el cual promueve la dimerización con otros productos proteicos provenientes de otros oncogenes. Comúnmente, la proteína FOS dimeriza con los miembros de la familia Jun (c-Jun, Jun B y Jun D).

Los factores de la familia Fos (Fos, FosB, Fra1, Fra2) forman heterodímeros con los de la familia Jun (Jun, JunB, JunD), dando lugar a los factores de transcripción denominados AP1 que se unen a secuencias consenso en el ADN (sitios AP1) (Morgan *et al.*, 1991). Desde su descubrimiento a finales de los ochentas, esta proteína ha sido utilizada ampliamente como una herramienta histológica a nivel celular.

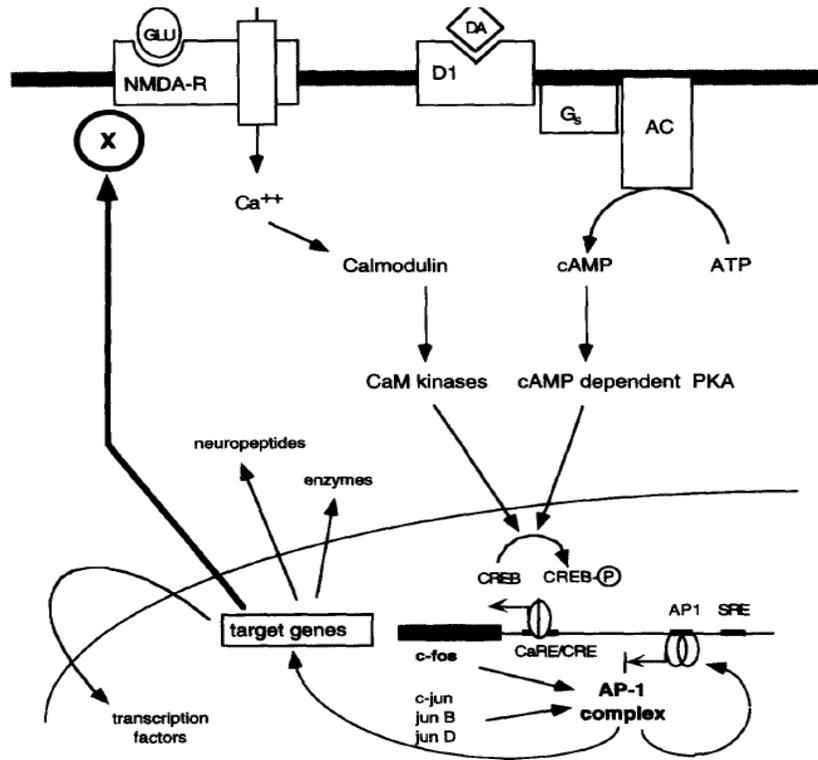


Figura4: Expresión de c-fos durante la fase de consumo crónico de cocaína (Sommer and Fuxe, 1997)

ANTECEDENTES

Como se mencionó anteriormente, desde su descubrimiento a finales de los 80's, la expresión de la proteína Fos, ha sido utilizada ampliamente como una herramienta histológica para caracterizar los efectos de diferentes estímulos (farmacológicos o sensoriales) a nivel celular. Desde entonces se considera que la expresión de la proteína Fos refleja la actividad neuronal debido a su función de controlar la transcripción génica; debido a que Fos se puede unir a sitios regulatorios localizados en el DNA. Debido a su utilidad como un marcador neuronal, la expresión de la proteína Fos ha sido ampliamente usada para examinar los efectos de numerosos psicoestimulantes en un esfuerzo por comprender las áreas cerebrales en las cuales se lleva a cabo el mecanismo de acción de estos psicoestimulantes (Gabrybiel *et al.*, 1990). Se ha visto que el tratamiento crónico de cocaína conduce a cambios a largo plazo en la expresión de algunos genes de expresión temprana y necesariamente en sus productos proteicos; los cuales juegan un papel importante en la transducción de estímulos extracelulares pero no tienen ninguna función en el desarrollo y consolidación del proceso adictivo. Hope Bruce y cols. (1992), demostraron que ratas tratadas aguda y crónicamente con cocaína mostraban cambios en los niveles del ARNm de c-Fos, c-Jun, Fos B, JunB y zif268 en el núcleo accumbens.

Posteriormente, Miller y Marshall en 2005 reportaron que la administración de cocaína a ratas en un ambiente en el cual los sujetos pudieran asociar diferentes tipos de señales ambientales con el efecto de la droga, induce un aumento en los niveles de expresión de genes de expresión temprana (por ejemplo c-Fos); en áreas del sistema de recompensa como la corteza pre límbica (PRL), la amígdala baso lateral (ABL) y el núcleo accumbens en su porción core (NAc). La PRL y ABL están recíprocamente conectadas y ambas proyectan a NAc.

De tal forma que estas regiones interactúan como un circuito que contribuye, no solo a la búsqueda de la droga, sino también a la integración de la información de las señales ambientales asociadas a la búsqueda y consumo de la droga. En este caso la utilización de la proteína Fos, permitió evidenciar el aumento significativo de esta proteína en el área ABL que es la encargada de traducir la administración de la droga asociándola a las señales de contextuales y así proporcionando esta información al NAc.

En 2002, Crombag y cols reportaron que la expresión de la proteína Fos en el NAc y en el estriado de la rata era afectada de manera diferencial. Ellos reportaron que la expresión de la proteína FOS dependía de la dosis de cocaína administrada (7.5, 10, 15, 20 y 30 mg/kg) y de si las ratas eran sensibilizadas previamente con la droga; de tal forma que cuando la dosis de cocaína aumentaba y no tenían antecedentes de haber sido sensibilizadas previamente con cocaína, había una expresión de la proteína Fos en el estriado (caudado-putamen) pero no en el NAc. Esto correlaciona con el hecho de que la actividad locomotora inducida por la cocaína es dosis dependiente, a mayor dosis de cocaína mayor actividad locomotora. Adicionalmente, este trabajo demostró que el patrón de expresión era diferente cuando a un sujeto se le sometía a un protocolo de 7 administraciones de cocaína (1 diaria/15 mg/Kg) seguido de un periodo de abstinencia de 7 días, bajo este protocolo de administración, la expresión de la proteína Fos aumentaba significativamente, ahora no solo en el caudado-putamen sino que también en el NAc. Lo cual sugiere que en ratas que tenían experiencia previa con cocaína, el NAc participa importantemente en la regulación del proceso de sensibilización locomotora. Además estos resultados proporcionan nuevamente evidencia de la utilidad de la expresión de la proteína Fos para determinar la participación de algunas áreas del cerebro en el desarrollo y consolidación de algunos de los procesos que conllevan a la adicción.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El consumo de cocaína es un problema de salud pública, diferentes fuentes de información señalan que el consumo de esta droga en México va en aumento y que ésta crece especialmente entre la población adolescente. La cocaína aumenta la liberación de dopamina en el sistema de recompensa, contribuyendo a los efectos reforzantes/placenteros que aumentan la búsqueda y el consumo de la misma. La activación de los receptores D1-like inducen la activación de vías de segundos mensajeros entre ellos los genes de expresión temprana como los genes de la familia Fos. Diferentes estudios han validado la cuantificación de la inmunoreactividad de la proteína Fos como marcador de actividad neuronal. Dado que esta proteína se localiza en el núcleo celular, su detección a través de un ensayo de histoquímica ha sido ampliamente usada para localizar los cuerpos neuronales activados por estímulos específicos.

Se ha reportado ampliamente que la administración continua de un psicoestimulante induce un incremento gradual en la actividad locomotora generando cambios permanentes en circuitos encargados de regular la respuesta motivacional a una droga adictiva. Lo cual involucra la activación de las células que componen a estos circuitos.

Sin embargo no existe a la fecha actual, un estudio formal que correlacione el aumento gradual en la actividad locomotora inducido por la administración continua de cocaína con un aumento en el número de células inmunoreactivas a la proteína Fos en diferentes áreas del sistema de recompensa.

HIPÓTESIS

Si la administración continua de cocaína induce un aumento gradual en la actividad locomotora del sujeto. Y esto implica el desarrollo de neuro-adaptaciones en los núcleos cerebrales que componen al sistema de recompensa. Entonces la administración diaria de cocaína va a inducir un aumento gradual en la expresión de la proteína Fos en diferentes regiones del sistema de recompensa de manera similar al aumento gradual observado en la actividad locomotora.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterización del perfil temporal de expresión de la proteína Fos inducida por la administración continúa de cocaína en diferentes áreas del Sistema Neuronal de Recompensa.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterización del patrón de expresión de la proteína Fos en áreas representativas del Sistema Neuronal de Recompensa inducida por una administración de cocaína (10 mg/kg).
- Caracterización del patrón de expresión de la proteína Fos en las diferentes áreas del circuito de Recompensa inducida por tres administraciones IP continuas de cocaína (10 mg/kg).

-
- Caracterización del patrón de expresión de la proteína Fos en áreas representativas del Sistema Neuronal de Recompensa inducida por cinco administraciones de cocaína (10 mg/kg).
 - Caracterización del patrón de expresión de la proteína Fos en áreas representativas del Sistema Neuronal de Recompensa inducida por siete administraciones de cocaína (10 mg/kg).
 - Caracterización del patrón de expresión de la proteína Fos en áreas representativas del Sistema Neuronal de Recompensa inducida por diez administraciones continuas de cocaína (10 mg/kg).

METODOLOGÍA

Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso al inicio del experimento de 250-300 g. Las ratas se colocaron en grupos de cuatro a seis sujetos en cajas de acrílico transparente (57 cm X 35 cm X 20 cm) en un cuarto con temperatura controlada ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$), en condiciones de 40 a 50% de humedad bajo un ciclo luz-oscuridad 12:12 hrs (el encendido de la luz ocurrió a las 7:00 AM). Los animales se mantuvieron en condiciones de alimento y agua ad libitum excepto durante las sesiones experimentales. Todos los experimentos fueron realizados durante la fase de luz del ciclo luz-oscuridad (entre las 9:00 AM y las 6:00 PM).

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el comité de ética y de cuidado de animales del Instituto Nacional de Psiquiatría.

Diseño Experimental

Experimento 1

Con el fin de describir el perfil temporal del aumento en la actividad locomotora inducido por la administración de cocaína (10 mg/kg). Se utilizaron 16 ratas macho, las cuales se dividieron en dos grupos experimentales ($n=8$), cada grupo recibió un tratamiento distinto. El experimento se dividió en tres etapas. El grupo salina (SAL) recibió la administración IP de solución salina estéril (NaCl 9%) durante las tres etapas del experimento. El grupo Cocaína (COC) recibió la administración de Cocaína (10mg/kg) durante la 1^a.

Experimento 2

Para los experimentos de expresión de la proteína FOS inducida por la administración de cocaína, se utilizaron 36 ratas macho divididas en 6 grupos experimentales ($n=6$). Al primer grupo se le administró solución salina (SAL), el segundo grupo recibió solo una administración de cocaína (COC-1d; 10 mg/kg),

(datos preliminares de la curva dosis respuesta sugieren que la concentración de 10 mg/kg es la adecuada para la realización del resto de los experimentos), el tercer grupo recibió una administración diaria de la droga por tres días continuos (COC-3d), el cuarto grupo recibió una administración diaria de cocaína por 5 días continuos (COC-5d), el quinto grupo recibió una administración diaria de cocaína por 7 días continuos (COC-7d) y por último, el sexto grupo recibió una administración diaria de la droga por 10 días continuos (COC-10d).

Drogas

La Cocaína Hidroclorada fue donada por la Procuraduría General de la República; esta fue disuelta en solución salina estéril (0.9% NaCl) en una concentración de 10 mg/kg.

Aparato

Los efectos de la cocaína sobre la actividad locomotora cada uno de los sujetos fue evaluado en una caja de acrílico transparente (50x50x30 cm) acoplada a una computadora PC. Cada cámara de actividad estaba rodeada de un arreglo de 16X16 fotoceldas localizadas a 3 cm de la superficie del piso con el fin de registrar la actividad locomotora (OMNIALVA, Instruments, México). Las interrupciones de estas fotoceldas por los movimientos del sujeto fueron cuantificadas automáticamente por un software OABiomed (1.1) y analizadas posteriormente. La actividad locomotora fue el número de interrupciones consecutivas a las fotoceldas.

Procedimiento de Sensibilización Locomotora

La sensibilización locomotora a la cocaína fue realizada de una manera similar a otros autores (Haile *et al.*, 2001). Brevemente, con el propósito de homogenizar la actividad locomotora entre los sujetos experimentales, todos los animales fueron habituados durante tres sesiones de 30 minutos en las cámaras de actividad antes de que cada procedimiento experimental iniciara. Posteriormente, cada rata fue asignada aleatoriamente a los diferentes grupos experimentales. En cada sesión experimental, antes de registrar la actividad locomotora, los animales de cada grupo

experimental recibieron la administración IP de un tratamiento específico. Después de aplicar cada tratamiento inmediatamente cada rata fue colocada dentro de la cámara de actividad. La actividad locomotora en respuesta al tratamiento fue registrado por 30 minutos. Al concluir cada sesión experimental las ratas fueron retiradas de las cámaras de prueba y fueron colocadas en sus cajas de estancia. Al finalizar cada registro de actividad locomotora de cada rata, las cajas fueron aseadas.

Preparación del tejido

60 minutos después de la última administración de cocaína los sujetos de los 6 grupos fueron sacrificados mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (0.5 mg/kg) y sometidos a procedimientos estándares de perfusión transcardiaca con solución salina seguida de paraformaldehído al 4%. Los cerebros fueron removidos, post-fijados por 1 hora en solución de paraformaldehído en PBS 0.1M pH 7.2, ya que de esta depende el que las diferentes estructuras celulares y tisulares muestren una configuración e interrelaciones lo más parecidas a las que existen *in vivo*, y se crio-protegieron en sacarosa al 30%.

Posteriormente los cerebros fueron congelados y cortados a -22°C en un criostato de congelación. Se obtuvieron secciones coronales de 40 μm . Las secciones fueron colectadas serialmente (1-4) y procesadas para la inmunohistoquímica contra c-fos. Se escogieron cortes representativos que contuvieran las regiones de interés: la Corteza Prefrontal Anterior (Corteza Infralímbica) (Bregma 2.70 mm), el área Vento-Tegmental (Bregma -5.30 mm), el Núcleo accumbens en su porción core y shell (Bregma 1.60 mm), la Amígdala Basolateral (Bregma -2.56) y el Caudado (Bregma 1.60 mm) (Paxinos, 1998).

Inmunohistoquímica de c-fos

Los cortes de tejido se incubaron por 15 minutos en una solución de peróxido de hidrógeno al 30% PBS 0.1M pH 7.2, (para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena). Posteriormente se realizaron tres lavados (cada uno de 10 minutos) con una solución de PBS 0.1M pH 7.2. Los cortes, posteriormente se incubaron durante 48 horas a 4 $^{\circ}\text{C}$ con el anticuerpo primario contra la proteína Fos (Hecho en conejo

anti-fos; Santa Cruz) en una dilución 1:1000 en PBSGT (PBS/0.2% tritón X-100/5% suero normal de cabra).

Después de las 48 horas de incubación con el anticuerpo primario, los cortes se lavaron tres veces, por 10 min/cada lavado, con PBS 0.1M y posteriormente fueron incubados por 2 horas a temperatura ambiente con anticuerpo secundario biotinilado (Cabra anti-conejo; Jackson Immunoresearch) diluido 1:200 en PBSGT. Después de esta incubación, el exceso de anticuerpo se removió del tejido mediante tres lavados de 10 min cada uno con una solución de PBS 0.1M. Subsiguientemente el tejido fue incubado por 2 horas a temperatura ambiente con el complejo Avidina-Biotina-peroxidasa (0.9% Avidina y 0.9% de Biotina; ABC, Vector Laboratories) en PBSGT.

Finalmente los cortes se lavaron tres veces con PBS 0.1M (cada lavado de 10 minutos) y se marcaron las células incubando reacciono al tejido con una solución de 25 mg DAB/25 ml Trizma Buffer 7.2 conteniendo 0.004 % de peróxido de hidrógeno. Después de 10 min de incubación en esta solución, los tejidos se transfirieron a agua destilada para detener el desarrollo de la reacción. Los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados; se dejaron secar a temperatura ambiente para posteriormente ser cubiertos con cubreobjetos de vidrio del No. 1 con resina sintética (Entellan, Merck).

Conteo celular

Para cuantificar la expresión de la proteína Fos en núcleos que componen al sistema de recompensa (meso-límbico-cortical), se escogieron cuatro secciones representativas de acuerdo al atlas esteroetaxico de Paxinos y Watson. Una primera sección (200 mm) más anterior fueron seleccionada para cuantificar las neuronas inmunoreactivas a la proteína FOS en la corteza Infralímbica (Corteza Prefrontal anterior) (Bregma 2.70 mm), y en las porciones Core y shell del Núcleo accumbens (Bregma 1.60mm). Una segunda sección, un poco más posterior (200 mm) contuvo al Núcleo Caudado (Bregma 1.60mm). Una tercera sección (200 mm) contuvo a la Amígdala Basaloteral (Bregma -2.56mm) y la sección más posterior se utilizó para

muestrear al Área VentroTegmental (Bregma -5.30 mm) (Paxinos, 1998).

Imágenes de las áreas cerebrales de interés fueron obtenidas mediante un microscopio óptico (Leica, MPS 30) acoplado a un analizador de imágenes (Leica, Qwin versión 2.6.0). Cada imagen digitalizada representó solo una de las regiones de interés mencionadas anteriormente. Sobre cada una de las imágenes digitalizadas se colocó una red de 6 cuadrados de 200 μ por 200 μ (40000 μ^2) y solo las células inmunorreactivas a Fos que se encontraban dentro de uno de los cuadrados en el lado izquierdo de cada sección fueron manualmente contados a un aumento de 20X.

Para minimizar el número de falsos positivos en el conteo celular, se determinó el nivel de gris de fondo para cada imagen. Para esto se seleccionaron al azar 10 diferentes puntos dentro del cuadrado de análisis, en regiones en donde no se observa neuronas inmunoreactivas a Fos. Cuando el observador marca una célula inmunopositiva a Fos, el programa marcaba un valor de gris, y solo las células que tuviesen un valor dos veces por arriba del nivel de gris del fondo fueron consideradas como marcas positivas y fueron contadas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se representaron como promedios \pm error estándar. Estos valores se graficaron con el programa SIGMA PLOT v.10.0. La actividad locomotora fue cuantificada como el número total de veces que el sujeto cruzo las fotoceldas durante una sesión de 30 minutos. Los datos fueron analizados inicialmente mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías de medidas repetidas, iniciando en el día uno del tratamiento. Si la ANOVA encontraba diferencias significativas en la interacción sesión y tratamiento entonces se utilizaba la prueba Post Hoc de Tukey con el fin de detectar diferencias significativas entre cada uno de los factores en cada fase experimental.

Los promedios de la actividad locomotora inducida por los tratamientos en cada etapa del experimento fueron analizados mediante una ANOVA de una vía seguida por una prueba post hoc de comparaciones múltiples de Tukey. Las comparaciones en la actividad locomotora entre las diferentes etapas fueron analizadas mediante una ANOVA de dos vías (Tratamiento X Etapa) seguida de una prueba post hoc de Tukey. El nivel de significancia se ajustó a $p < 0.05$.

Con el fin de determinar diferencias en el número de neuronas inmunoreactivas a la proteína Fos entre las diferentes áreas cerebrales analizadas, se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía seguido por una prueba post hoc Tukey (ajustada a una $p < 0.001$). Todas las pruebas estadísticas se realizaron mediante el programa STATISTICA v.3.1 (StatSoft, 1993).

RESULTADOS

Actividad Locomotora

Con el fin de describir el perfil temporal de las alteraciones inducidas por la administración de cocaína (10 mg/kg) sobre la actividad locomotora, a los sujetos del grupo COC se les administró cocaína diariamente.

Durante la primera etapa del protocolo experimental, los animales mostraron un incremento gradual de la actividad locomotora (Figura 5). La ANOVA de dos vías de muestras repetidas reveló diferencias significativas en la interacción Grupo X Sesión (Tratamiento X Sesión $F = (9,126) 8.11 p < 0.0001$). La prueba post hoc encontró diferencias significativas a partir de la segunda sesión (Tukey Test- $p < 0.0001$).

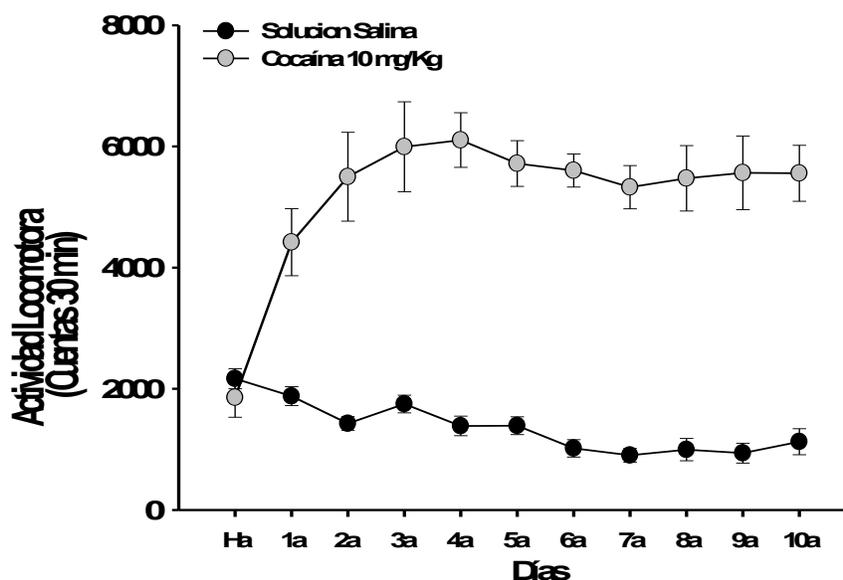


Figura 5: Puntuaciones de la actividad locomotora para los grupos experimentales que recibieron diariamente Cocaína (10 mg/kg) y solución salina.

Histología

La administración de solución salina 9% a los sujetos del grupo control indujo una expresión muy escasa de la proteína Fos en las diferentes regiones evaluadas. El número promedio de neuronas inmunoreactivas a la proteína Fos en el VTA fue de 3.75 ± 0.40 (Fig. 8), de 9.25 ± 0.83 para el NAc shell (Fig. 9), de 9.16 ± 0.54 para el NAc core (Fig. 10), de 7.00 ± 0.72 para la IL (Fig. 11), de 7.16 ± 1.17 para la ABL (Fig. 12) y de 11.00 ± 0.88 para el CP (Figura 13). El número de neuronas inmunoreactivas a la proteína Fos mostrado en cada región anatómica bajo esta condición refleja la activación basal generada bajo nuestras condiciones de trabajo sobre el sistema de recompensa.

Se ha reportado anteriormente (Hope BT, 1992) que el consumo de un psicoestimulante no solo induce un aumento en la actividad locomotora, también genera un aumento significativo en la expresión de la proteína Fos en distintos núcleos del SNC. Sin embargo, no se ha reportado si el aumento gradual en la actividad motora refleja un aumento gradual en el número de células que son activadas por la administración del psicoestimulante. De tal forma que, con el fin de caracterizar el perfil de expresión de la proteína Fos, en los sujetos del grupo FC se les administró cocaína en una dosis de 10 mg/kg durante 1, 3, 5, 7 y 10 sesiones continuas, justo los puntos temporales en los cuales se observa el aumento y estabilización de la actividad motora inducida por la administración continua de cocaína.

Con respecto al **VTA**, se observó un aumento significativo en el número de neuronas inmunoreactivas a la proteína Fos durante la administración 1^a, 3^a y 5^a continua de la droga. A partir de la 7^a y 10^a administración de la droga, el número de neuronas inmunoreactivas a la proteína Fos aumentó abrupta y significativamente (ANOVA de una vía Grupos $F = (5,44) 799.50$, $p < 0.0001$). La prueba post hoc encontró diferencias significativas en el número de neuronas inmunoreactivas a la proteína Fos entre el grupo salina y los grupos COC-1d (3.75 ± 0.40 Vs. $21.22 \pm$

0.77; Tukey Test $p < 0.0001$), COC-3d (3.75 ± 0.40 Vs. 23.67 ± 0.85 ; Tukey Test $p < 0.0001$), COC-5d (3.75 ± 0.40 Vs. 27.00 ± 0.76 ; Tukey Test $p < 0.0001$), COC-7d (3.75 ± 0.40 Vs. 61.33 ± 0.72 ; Tukey Test $p < 0.0001$) y COC-10d (3.75 ± 0.40 Vs. 85.67 ± 0.70 ; Tukey Test $p < 0.0001$). Adicionalmente, la misma prueba reveló diferencias significativas entre el número de neuronas positivas a la proteína Fos mostradas por los sujetos del grupo COC-1d con respecto al número de neuronas inmunoreactivas a la proteína Fos mostradas por los grupos COC-5d (21.22 ± 0.77 Vs. 27.00 ± 0.76 ; Tukey $p < 0.0001$), COC-7d (21.22 ± 0.77 Vs. 61.33 ± 0.72 ; Tukey $p < 0.0001$) y COC-10d (21.22 ± 0.77 Vs. 85.67 ± 0.70 ; Tukey $p < 0.0001$). Sin embargo, la prueba post hoc no encontró diferencias significativas entre los grupos COC-1d y COC-3d (21.22 ± 0.77 Vs. 23.67 ± 0.85 ; Tukey $p = \text{NS}$) y entre los grupos COC-3d y COC-5d (23.67 ± 0.85 Vs. 27.00 ± 0.76 ; Tukey $p = \text{NS}$). La misma prueba encontró diferencias significativas en el número de neuronas inmunoreactivas a c-Fos entre los grupos COC-5d y COC-7d-10d (27.00 ± 0.76 Vs. 61.33 ± 0.72 ; Tukey $p < 0.001$; 27.00 ± 0.76 Vs. 85.67 ± 0.70 ; Tukey $p < 0.0001$). Finalmente, también encontró diferencias significativas entre los grupos COC-7d y COC-10d (61.33 ± 0.72 Vs. 85.67 ± 0.70 ; Tukey $p < 0.0001$). Lo cual sugiere que durante las tres primeras sesiones de administración continua de cocaína las células del VTA, va provocando cambios adaptativos y el posterior incremento rápido e intenso del número de neuronas cada vez que se consume.

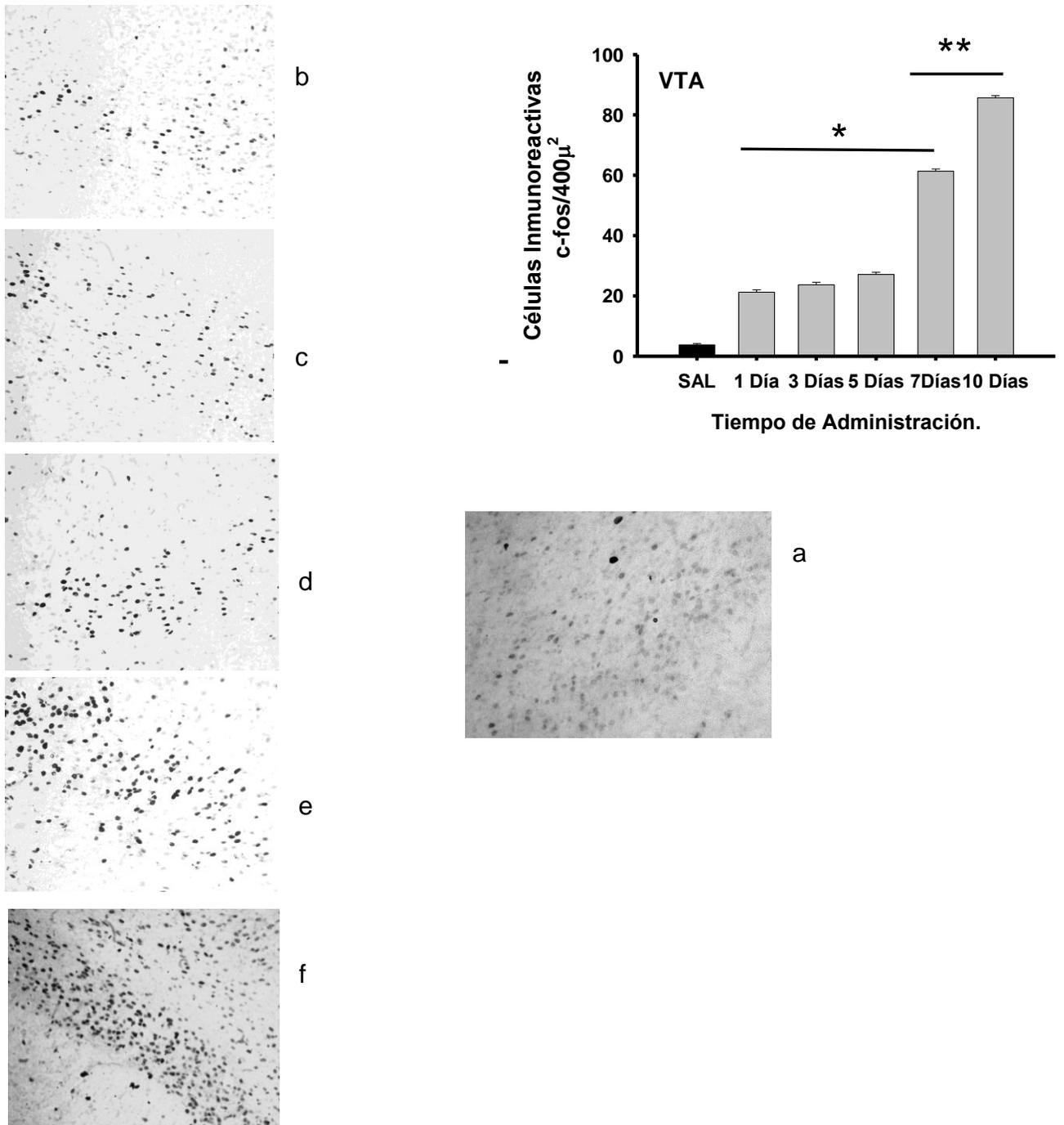


Figura 8 Número de células inmunoreactivas a la proteína Fos en la región VTA, a) salina b) 1 día c) 3 días d) 5 días e) 7 días y f) 10 días

La administración continua de cocaína indujo un aumento gradual en el número de neuronas inmunoreactivas a la proteína Fos en el NAc shell. La ANOVA de una vía encontró diferencias significativas entre los grupos experimentales ($F=(5,44) 1118.81 p<0.0001$). La prueba post hoc reveló diferencias significativas en el número de neuronas inmunoreactivas a la proteína Fos entre los grupos COC-1d (9.16 ± 0.54 Vs. 13.59 ± 0.39 ; Tukey Test $p<0.0001$), COC-3d (9.16 ± 0.54 Vs. 40.67 ± 0.97 ; Tukey Test $p>0.0001$), COC-5d (9.16 ± 0.54 Vs. 53.22 ± 0.74 ; Tukey Test $p>0.0001$), COC-7d (9.16 ± 0.54 Vs. 78.33 ± 0.60 ; Tukey Test $p<0.0001$) y COC-10d (9.16 ± 0.54 Vs. 102.33 ± 0.85 ; Tukey Test $p<0.0001$) con respecto al grupo salina en la porción **shell del núcleo accumbens**. Además, la prueba de Tukey encontró diferencias significativas en el número de neuronas positivas a Fos mostradas por el grupo COC-1d con respecto a los demás grupos experimentales (COC-3d-- 13.59 ± 0.39 Vs. 40.67 ± 0.97 ; Tukey $p<0.0001$; COC-5d-- 13.59 ± 0.39 Vs. 53.22 ± 0.74 ; Tukey $p<0.0001$; COC-7d-- 13.59 ± 0.39 Vs. 78.33 ± 0.60 ; Tukey $p<0.0001$ y COC-10d-- 13.59 ± 0.39 Vs. 102.33 ± 0.85 ; Tukey $p<0.0001$).

Adicionalmente, la prueba post hoc reveló diferencias significativas en el número de neuronas inmunopositivas a FOS entre los grupos COC-3d y COC-5d, 7d y 10d (COC-5d-- 40.67 ± 0.97 Vs. 53.22 ± 0.74 ; Tukey $p<0.0001$; COC-7d-- 40.67 ± 0.97 Vs. 78.33 ± 0.60 ; Tukey $p<0.0001$ y COC-10d-- 40.67 ± 0.97 Vs. 102.33 ± 0.85 ; Tukey $p<0.0001$), así como entre los grupos 5d y 7d-10d (COC-7d-- 53.22 ± 0.74 Vs. 78.33 ± 0.60 ; Tukey $p<0.0001$; COC-10d-- 53.22 ± 0.74 Vs. 102.33 ± 0.85 ; Tukey $p<0.0001$). Finalmente también encontró diferencias significativas entre los grupos 7d y 10d (COC-10d-- 78.33 ± 0.60 Vs. 102.33 ± 0.85 ; Tukey $p<0.0001$). Lo cual refleja un aumento gradual por la repetición del consumo de cocaína.

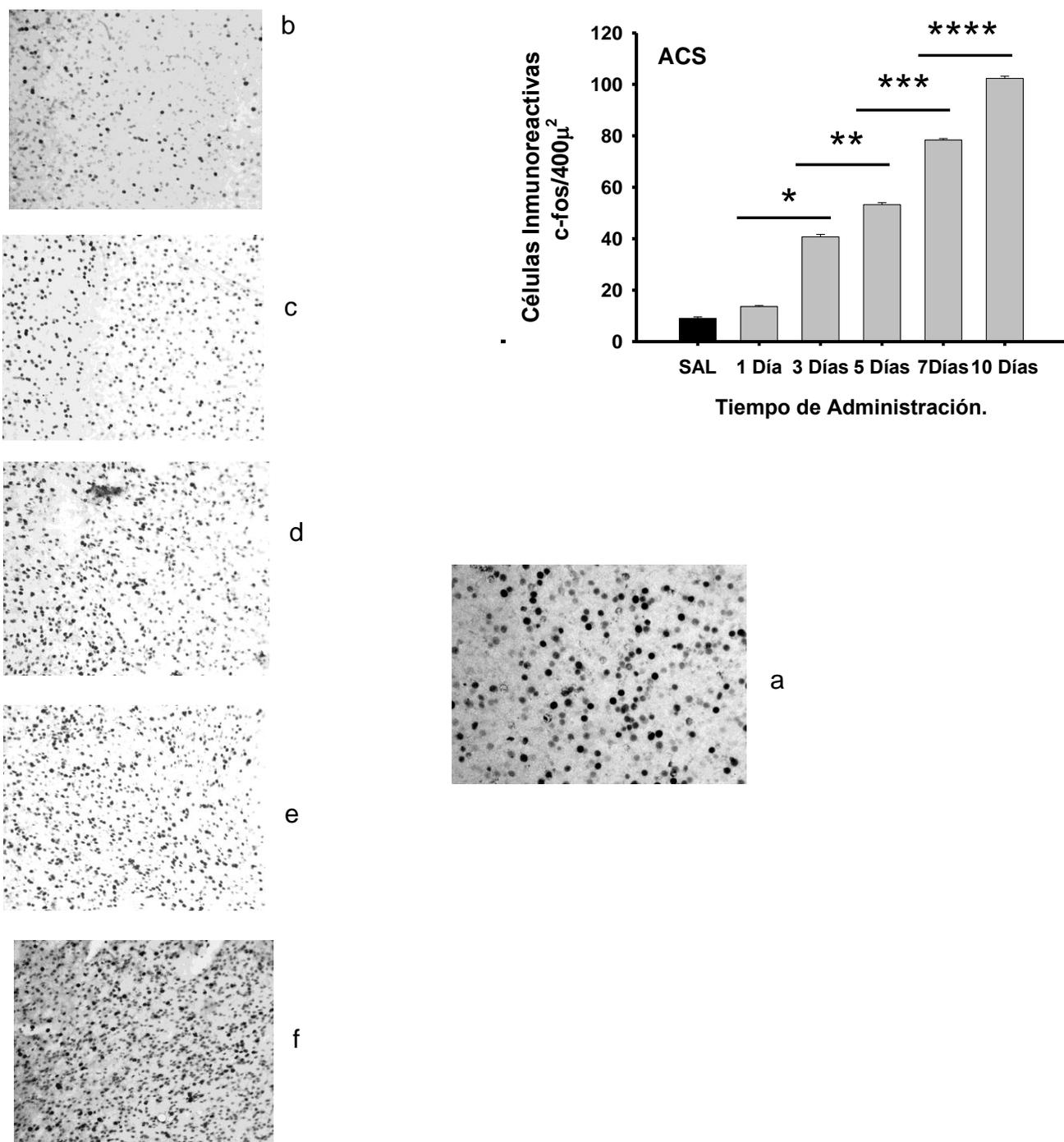


Figura 9 Número de células inmunoreactivas a la proteína Fos en la región NAc shell, a) salina, b) 1 día, c) 3 días, d) 5 días, e) 7 días y f) 10 días.

Con lo que respecta al **NAcc**, se observa que una sola administración de cocaína no induce un aumento significativo en el número de neuronas inmunoreactivas a la proteína Fos. A partir de la tercera administración continua de cocaína se observa un aumento en la expresión de Fos, siendo muy similar entre la tercera y quinta sesión y posteriormente se observa otro aumento en la expresión de la proteína Fos entre la séptima y décima sesión continua de administración de la droga adictiva. La ANOVA de una vía encontró diferencias significativas entre los Grupos ($F = (5,44) 663.32, p < 0.00001$).

La prueba de Tukey no reveló diferencias significativas (Tukey NS $p = 1$) en el número de neuronas inmunopositivas a Fos entre los grupos control salina y COC-1d (9.25 ± 0.76 Vs. 9.00 ± 0.24). En cambio, encontró diferencias significativas entre el número de neuronas inmunoreactivas a Fos mostradas por los grupos COC-3d (9.25 ± 0.76 Vs. 47.44 ± 0.91 ; Tukey Test $p < 0.0001$), COC-5d (9.25 ± 0.76 Vs. 47.89 ± 0.68 ; Tukey Test $p < 0.0001$), COC-7d (9.25 ± 0.76 Vs. 59.50 ± 0.29 ; Tukey Test $p < 0.0001$) y COC-10d (9.25 ± 0.76 Vs. 62.50 ± 0.22 ; Tukey Test $p < 0.0001$) con respecto al grupo salina.

Además la prueba post hoc encontró diferencias significativas entre el grupo COC-1d y los grupos COC-3d (9.00 ± 0.24 Vs. 47.44 ± 0.91 ; Tukey $p < 0.0001$), COC-5d (9.00 ± 0.24 Vs. 47.89 ± 0.68 ; Tukey $p < 0.0001$), COC-7d (9.00 ± 0.24 Vs. 59.50 ± 0.29 ; Tukey $p < 0.0001$) y COC-10d (9.00 ± 0.24 Vs. 62.50 ± 0.22 ; Tukey $p < 0.0001$); pero no encontró diferencias significativas entre los grupos COC-3d y COC-5d (Tukey NS $p = 1$; 47.44 ± 0.91 Vs. 47.89 ± 0.68).

Adicionalmente, encontró diferencias significativas entre los grupos COC-3d y COC-7d-10d (47.44 ± 0.91 Vs. 59.50 ± 0.29 ; Tukey $p < 0.0001$; 47.44 ± 0.91 Vs. 62.50 ± 0.22 ; Tukey $p < 0.0001$). El grupo COC-5d mostró diferencias en el número de neuronas que expresan FOS con respecto al grupo FC-.7d (47.89 ± 0.68 Vs. 59.50 ± 0.29 ; Tukey $p < 0.0001$) y COC-10d (47.89 ± 0.68 Vs. 62.50 ± 0.22 ; Tukey $p < 0.0001$).

Al igual que sucedió en otros puntos temporales, la prueba Tukey no encontró diferencias significativas entre los grupos COC-7d y COC-10d (Tukey NS $p=1$). Lo cual refleja que a medida de la repetición del consumo, se va incrementando una cierta actividad motora, pero en este núcleo no refleja el efecto reforzante que median otros núcleos.

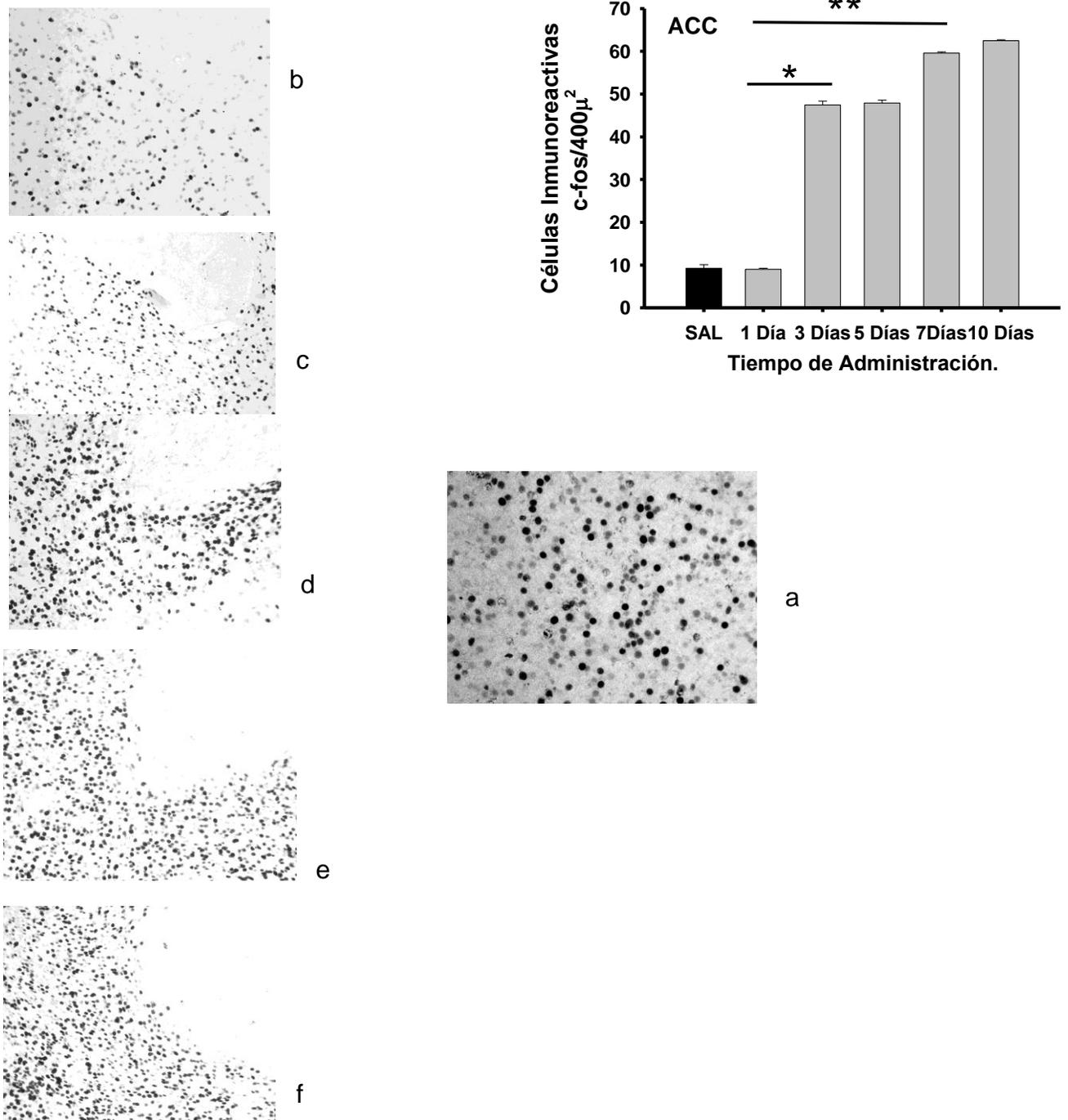
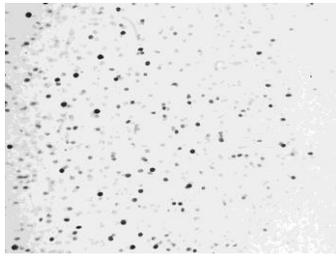
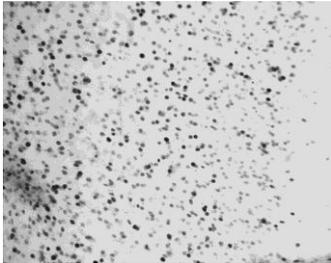


Figura 10 Número de células inmunoreactivas a la proteína Fos en la región NAc core, a) salina, b) 1 día, c) 3 días, d) 5 días, e) 7 días y f) 10 días.

Con respecto a la IL, se observó que el número de neuronas inmunoreactivas a fos mostro un aumento gradual estableciéndose a partir de la séptima administración. La ANOVA de una vía reveló diferencias significativas entre los tratamientos(Grupos F= (5,44) 281.17, $p < 0.0001$). La prueba post hoc encontró diferencias significativas en el número de neuronas inmunopositivas a la proteína Fos entre los grupos de salina y COC-1d (6.50 ± 0.67 Vs. 18.56 ± 0.81 ; Tukey Test $p < 0.0001$), COC-3d (6.50 ± 0.67 Vs. 49.56 ± 0.44 ; Tukey Test $p < 0.0001$), COC-5d (6.50 ± 0.67 Vs. 60.56 ± 1.39 ; Tukey Test $p < 0.0001$), COC-7d (6.50 ± 0.67 Vs. 74.33 ± 1.29 ; Tukey Test $p < 0.0001$) y COC-10d (6.50 ± 0.67 Vs. 75.44 ± 1.39 ; Tukey Test $p < 0.0001$). Además la prueba post hoc reveló diferencias significativas entre el número de neuronas positivas a la proteína Fos mostradas por los sujetos del grupo COC-1d con respecto al mostrado por los grupos COC-3d (18.56 ± 0.81 Vs. 49.56 ± 0.44 ; Tukey $p < 0.0002$), COC-5d (18.56 ± 0.81 Vs. 60.56 ± 1.39 ; Tukey $p > 0.0001$), COC-7d (18.56 ± 0.81 Vs. 74.33 ± 1.29 ; Tukey $p > 0.0001$) y COC-10d (18.56 ± 0.81 Vs. 75.44 ± 1.39 ; Tukey $p < 0.0001$). Adicionalmente la prueba de Tukey encontró diferencias significativas en el número de neuronas inmunoreactivas a C-Fos entre el grupo COC-3d con respecto a los grupos COC-5d (49.56 ± 0.44 Vs. 60.56 ± 1.39 ; Tukey $p < 0.0001$), COC-7d (49.56 ± 0.44 Vs. 74.33 ± 1.29 ; Tukey $p < 0.0001$) y COC-10d (49.56 ± 0.44 Vs. 75.44 ± 1.39 ; Tukey $p < 0.0001$), Además, se encontraron diferencias significativas entre los grupos COC-5d y COC-7d (60.56 ± 1.39 Vs. 74.33 ± 1.29)---COC-10d (60.56 ± 1.39 Vs. 75.44 ± 1.39). Sin embargo no encontró la prueba de Tukey diferencias entre los grupos COC-7d y COC-10d (74.33 ± 1.29 Vs. 75.44 ± 1.39) justo cuando se establece el máximo número de neuronas inmunmoreactivas a FOS en esta área. Lo cual sugiere se van alterando los mecanismos de regulación de las conductas, motivando al sujeto al impulso para realizar una determinada acción.



b



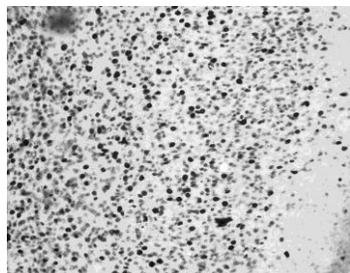
c



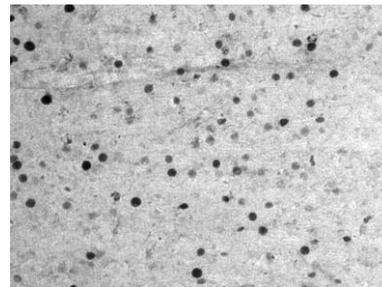
d



e



f



a

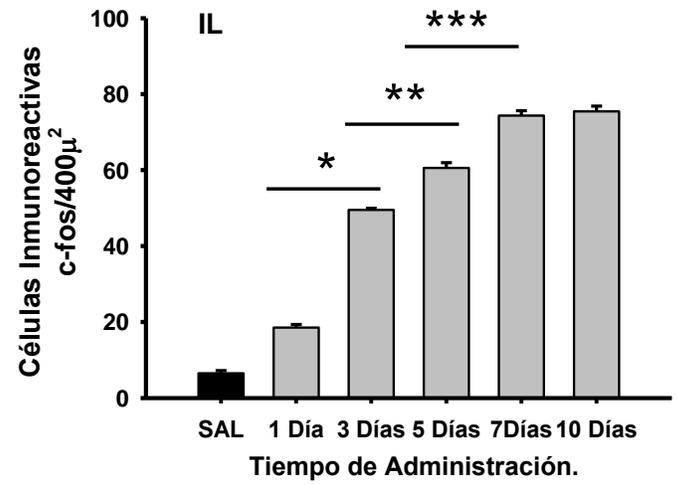
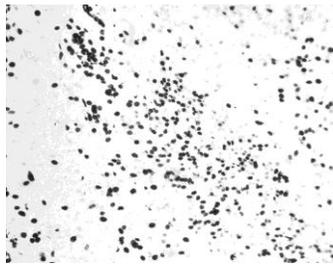
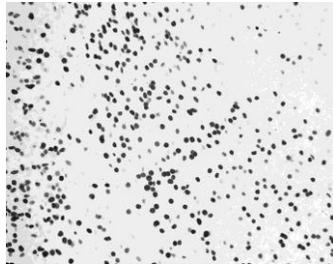


Figura 11 Número de células inmunoreactivas a la proteína Fos en la región IL, a) salina, b) 1 día, c) 3 días, d) 5 días, e) 7 días y f) 10 días.

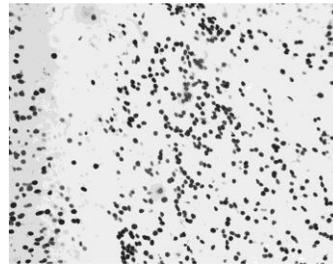
Con respecto a la ABL, la administración continua de cocaína induce un aumento gradual en el número de neuronas inmunoreactivas a la proteína Fos, en el caso de esta área neural no se observa un establecimiento de la respuesta a la droga. La ANOVA de una vía encontró diferencias significativas entre los Grupos ($F=(5,44) 300.81, p< 0.0001$). La prueba de Tukey reveló diferencias significativas en el número de neuronas inmunoreactivas a la proteína FOS entre los grupos COC-1d (7.00 ± 0.19 Vs. 22.56 ± 0.58 ; Tukey Test $p<0.0001$), COC-3d (7.00 ± 0.19 Vs. 44.73 ± 0.78 ; Tukey Test $p<0.0001$), COC-5d (7.00 ± 0.19 Vs. 51.44 ± 0.88 ; Tukey Test $p<0.0001$), COC-7d (7.00 ± 0.19 Vs. 59.67 ± 0.91 ; Tukey Test $p<0.0001$) y COC-10d (7.00 ± 0.19 Vs. 65.33 ± 0.88 ; Tukey Test $p<0.0001$) con respecto al grupo salina. También la prueba post hoc reveló diferencias significativas entre el grupo COC-1d y los grupos COC-3d (22.56 ± 0.58 Vs. 44.73 ± 0.78 ; Tukey $p< 0.001$), COC-5d (22.56 ± 0.58 Vs. 51.44 ± 0.88 ; Tukey $p<0.001$); COC-7d (22.56 ± 0.58 Vs. 59.67 ± 0.91 ; Tukey $p< 0.001$) y COC-10d (22.56 ± 0.58 Vs. 65.33 ± 0.88 ; Tukey $p< 0.001$). Además la prueba post hoc reveló diferencias significativas entre el número de neuronas inmunopositivas a c-Fos entre el grupo COC-3d y los grupos COC-5d (44.73 ± 0.78 Vs. 51.44 ± 0.88 ; Tukey $p< 0.001$), COC-7d (44.73 ± 0.78 Vs. 59.67 ± 0.91 ; Tukey $p< 0.001$) y COC-10d (44.73 ± 0.78 Vs. 65.33 ± 0.88 ; Tukey $p> 0.001$). Adicionalmente se encontraron diferencias entre el grupo COC-5d y los grupos COC-7d (51.44 ± 0.88 Vs. 59.67 ± 0.91 ; Tukey $p> 0.001$) y COC-10d (51.44 ± 0.88 Vs. 65.33 ± 0.88 ; Tukey $p< 0.001$). Finalmente también se observaron diferencias significativas entre el número de neuronas inmunoreactivas a FOS entre los grupos COC-7d y COC-10d (59.67 ± 0.91 Vs. 65.33 ± 0.88 ; Tukey $p< 0.001$). Lo cual sugiere que con el paso de cada sesión de administración las señales externas relacionadas a la droga adictiva son cada día más fuertes.



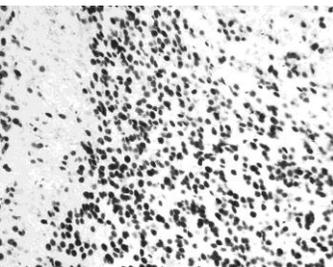
b



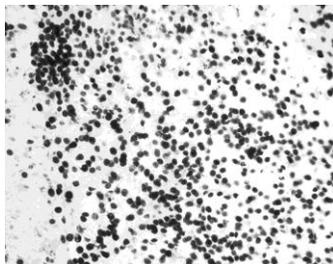
c



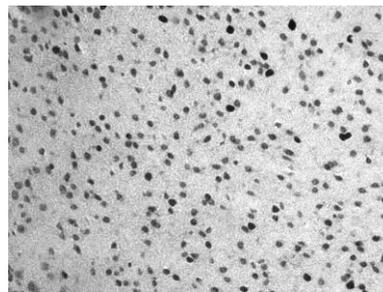
d



e



f



a

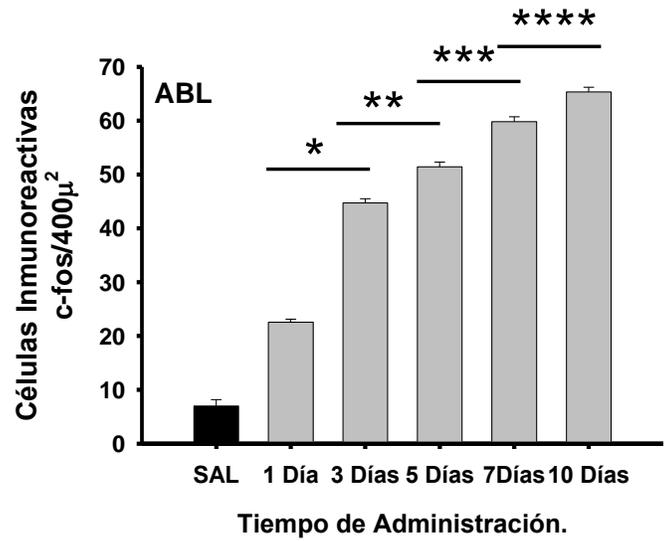


Figura 12 Número de células inmunoreactivas a la proteína Fos en la región ABL, a) salina, b) 1 día, c) 3 días, d) 5 días, e) 7 días y f) 10 días.

Finalmente, el Caudado–Putamen, es una estructura relacionada con diversos aspectos del control motor, de tal forma que si la administración de un psicoestimulante aumenta la actividad locomotora entonces es plausible pensar que bajo las mismas condiciones, las neuronas que se localizan en el CP muestren un aumento en la expresión de la proteína Fos en respuesta a la administración del psicoestimulante. Con respecto a la expresión de la proteína Fos se observó que la administración de cocaína indujo un aumento gradual en el número de neuronas inmunoreactivas a la proteína Fos, estableciéndose a partir de la séptima administración de la droga.

La ANOVA de una vía reveló diferencias significativas entre los grupos experimentales ($F = (5,44) 639.68$ $p < 0.00004$). La prueba de Tukey reveló diferencias significativas en el número de neuronas inmunopositivas a Fos entre los grupos COC-1d (10.75 ± 0.81 Vs. 17.67 ± 0.62 ; Tukey Test $p < 0.0001$), COC-3d (10.75 ± 0.81 Vs. 55.44 ± 0.73 ; Tukey Test $p < 0.0001$), COC-5d (10.75 ± 0.81 Vs. 65.56 ± 0.86 ; Tukey Test $p < 0.0001$), COC-7d (10.75 ± 0.81 Vs. 82.50 ± 0.71 ; Tukey Test $p < 0.0001$) y COC-10d (10.75 ± 0.81 Vs. 76.00 ± 0.85 ; Tukey Test $p < 0.0001$), con respecto al grupo salina. Además la prueba post hoc encontró diferencias significativas entre el grupo COC-1d y los grupos COC-3d (17.67 ± 0.62 Vs. 55.44 ± 0.73 ; Tukey $p < 0.0001$), COC-5d (17.67 ± 0.62 Vs. 65.56 ± 0.86 ; Tukey $p < 0.0001$), COC-7d (17.67 ± 0.62 Vs. 82.50 ± 0.71 ; Tukey $p < 0.0001$) y COC-10d (17.67 ± 0.62 Vs. 76.00 ± 0.85 ; Tukey $p < 0.0001$). También encontró diferencias entre el número de neuronas inmunopositivas a FOS expresadas por el grupo COC-3d con respecto a las mostradas por los grupos COC-5d (55.44 ± 0.73 Vs. 65.56 ± 0.86 ; Tukey $p < 0.0001$), COC-7d (55.44 ± 0.73 Vs. 82.50 ± 0.71 ; Tukey $p < 0.0001$) y COC-10d (55.44 ± 0.73 Vs. 76.00 ± 0.85 ; Tukey $p < 0.0001$). Adicionalmente se encontraron diferencias entre los grupos COC-5d y los grupos COC-7d (65.56 ± 0.86 Vs. 82.50 ± 0.71 ; Tukey $p < 0.0001$) y COC-10d (65.56 ± 0.86 Vs. 76.00 ± 0.85 ; Tukey $p < 0.0001$). Finalmente, se encontraron diferencias entre los grupos COC-7d y COC-10d (82.50 ± 0.71 Vs. 76.00 ± 0.85 ; Tukey $p < 0.0001$). Lo sugiere que se va desarrollando un aumento en la conducta motora.

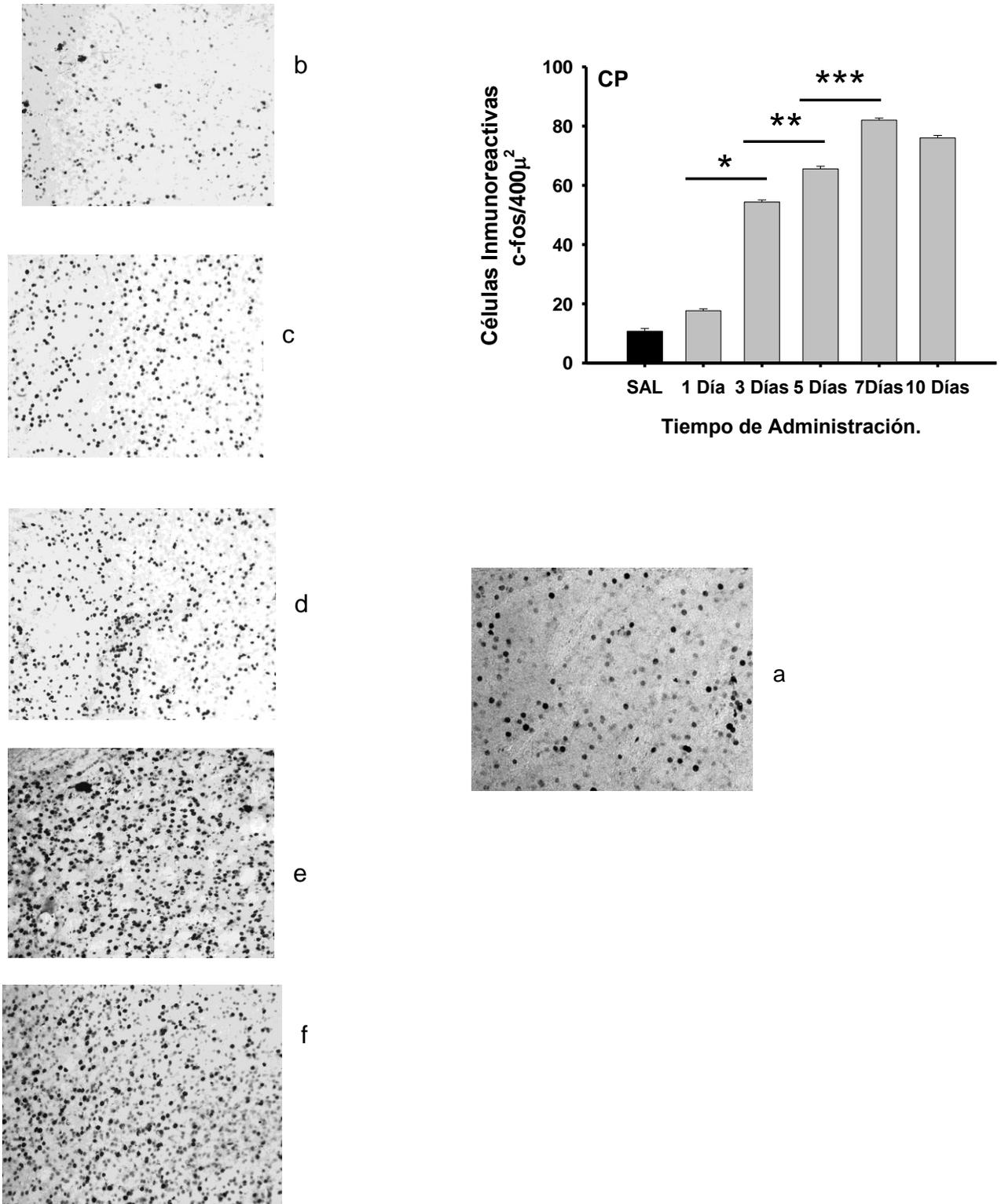


Figura 13 Número de células inmunoreactivas a la proteína Fos en la región CP, a) salina, b) 1 día, c) 3 días, d) 5 días, e) 7 días y f) 10 días.

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio revelan que la administración continua de cocaína induce un aumento gradual en el número de neuronas inmunoreactivas a c-Fos en distintas áreas del sistema meso-límbico-cortical. Adicionalmente se encontró que el aumento en la expresión de la proteína Fos correlaciona con el aumento gradual en la actividad locomotora.

La exposición repetida a una droga de abuso como la cocaína o la nicotina, resulta en un progresivo y permanente aumento de los efectos estimulantes psicomotores en animales de laboratorio y humanos, incluso después de varios períodos de abstinencia (Samaha *et al.*, 2002). Este fenómeno se conoce como sensibilización conductual (Robinson *et al.*, 1993, Robinson & Berridge 2000 y Vanderschuren & Pirce 2010). La sensibilización locomotora se asocia con el desarrollo de alteraciones a nivel morfológico, neuroquímico y molecular a largo plazo en el sistema mesolímbico-cortical, las cuales resultan en el aumento en los efectos estimulantes de la cocaína (Vanderchuren y Kalivas 2000).

Se ha reportado que existen dos etapas principales de la sensibilización locomotora son la inducción y de expresión (Robinson *et al.*, 1998 y Todtenkopf *et al.*, 2002). En la fase de inducción se llevan a cabo la secuencia de eventos conductuales y fisiológicos generados por la administración repetida de psicoestimulantes que inducen las alteraciones a nivel neuroquímico, morfológico y molecular a largo plazo en el sistema mesolímbico-cortical. La fase de expresión se caracteriza por el establecimiento a largo plazo de los cambios neuronales que son el resultado de la inducción y son responsables de la mediación de la respuesta posterior de sensibilización (Robinson *et al.*, 1993, Pirce *et al.*, 1997 y White *et al.*, 1998).

También se ha postulado que la sensibilización conductual juega un papel importante en el establecimiento de algunas de las características persistentes del abuso a una droga, tales como el aumento en la apetencia o deseo por la droga

(*craving*) y en el desarrollo de las conductas de búsqueda y consumo compulsivo de una droga de abuso (Robinson *et al.*, 1993 y Robinson *et al.*, 2001). Además también se ha reportado que la administración repetida de una droga de abuso induce un aumento en la relevancia de la droga y en las señales contextuales asociadas al consumo de la droga, lo que genera un mantenimiento a largo plazo de la vulnerabilidad de la recaída en el abuso a un psicoestimulante (Koob *et al.*, 2001 y Robinson *et al.*, 2001).

Como se mencionó anteriormente, diversos estudios sobre la sensibilización conductual se han caracterizado a diferentes niveles, sin embargo a la fecha no se ha reportado un estudio que caracterice a nivel celular como responden las neuronas de las diferentes áreas del sistema de recompensa a la administración repetida de cocaína.

El sistema de recompensa está conformado por distintos núcleos cerebrales. El área Vento-Tegmental (VTA) desempeña un papel importante en el desarrollo de la adicción, ya que es el área encargada de traducir el efecto estimulante inducido por la administración de una droga (Old y Milner, 1954). El VTA está conformado por neuronas dopaminérgicas de proyección larga, las cuales principalmente tienen su campo terminal en el núcleo acumbens (NAc), (Koob *et al.*, 2010). El NAc a su vez, se divide en dos regiones, shell y core. En el NAc shell se lleva a cabo la integración de la información correspondiente al valor de reforzamiento de una droga de abuso (Di Chiara, 2002). Se ha reportado ampliamente, en trabajos de microdialisis, que la administración de cualquier droga de abuso induce un aumento en la liberación de dopamina.

La cantidad de dopamina liberada, en el NAc shell, es la señalización neuroquímica que va a determinar si el estímulo fue reforzante o no lo fue. Adicionalmente el NAc shell recibe proyecciones glutamatérgicas provenientes de la ABL, las cuales terminan en neuronas dopaminérgicas (Yukihiko *et al.*, 2006). Estas proyecciones desempeñan un papel esencial en asociar el consumo de una droga a los estímulos ambientales de contexto (relacionados en tiempo y espacio con los efectos de la droga), las cuales van a reforzar el estímulo primario proveniente del

VTA (Roger, 2007). Adicionalmente, el NAc shell recibe proyecciones glutamatérgicas provenientes de la corteza prefrontal (PFC) que están implicadas en el control ejecutivo. Estas proyecciones, a su vez, estimulan a neuronas dopaminérgicas localizadas dentro del NAc shell, resultando en el aumento en la liberación de DA en esta región del Nac aumentando significativamente el valor de reforzamiento de la droga. (Volkow *et al.*, 1993). Finalmente el NAc shell proyecta al NAc core y al caudado putamen, dos estructuras de características motoras. La estimulación de estas dos estructuras neurales va a resultar primeramente en el aumento en la actividad motora de los sujetos y posteriormente va a resultar en un aumento en la conducta de búsqueda de la droga.

Una vez que la cocaína, a través de su mecanismo de acción, induce un aumento en la liberación de dopamina; las moléculas de dopamina van a activar a los receptores dopaminérgicos D1 y D2 like, induciendo a su vez, la activación de vías de segundos mensajeros y posteriormente la activación de distintos genes. Entre ellos se encuentran genes estructurales encargados de remodelar la estructura de la neurona, genes relacionados a la síntesis y movimiento de los receptores DA, GLU y 5-HT (Mateo *et al.*, 1993), y genes que son factores de transcripción como son los de la familia Fos (a través de CREB) que se unen a miembros de la familia Jun para formar proteínas activadoras -1 (AP-1), que regulan la expresión genética. Entre estos factores destaca c-Fos, este aumenta de modo transitorio tras el consumo de la droga (Nestler, 2001). Se ha reportado previamente que la administración de cocaína induce un aumento en la expresión del RNAm y de la proteína Fos en el cuerpo estriado y estructuras límbicas. La capacidad de la cocaína para inducir la expresión de la proteína Fos en el cuerpo estriado depende de la capacidad de la cocaína de aumentar la neurotransmisión dopaminérgica en el cuerpo estriado, como lo demuestran distintos estudios de microdialisis. Adicionalmente, se ha demostrado que la activación del receptor dopaminérgico D1 es un evento celular importante. El bloqueo de los receptores dopaminérgicos D1 o D2 atenúa la capacidad de los psicoestimulantes a inducir la expresión de c-fos en el cuerpo estriado (Samaha *et al.*, 2004 y Samaha *et al.*, 2005).

Como se mencionó anteriormente, la expresión del gene c-fos puede ser utilizado como un indicador de la activación neuronal mediada por estímulos farmacológicos o fisiológicos. De tal forma la inmunocitoquímica para Fos y la hibridación in situ para detectar los niveles de RNAm para c-fos son dos técnicas muy utilizadas para determinar los tipos de neuronas en los que subyacen el proceso de sensibilización y aquellas regiones del cerebro que median la sensibilización conductual (Ostrander *et al.*, 2003; Hope *et al.*, 2006 y Mattson *et al.*, 2007). Sin embargo, a pesar de que existen varios reportes al respecto los resultados son inconsistentes, por lo que se requiere un estudio sistemático que caracterice la respuesta celular de cada una de las regiones cerebrales que componen el sistema de recompensa.

Varias regiones del cerebro funcionan en concierto para mediar el desarrollo y consolidación del proceso de sensibilización conductual; las regiones más importantes son el núcleo acumbens, el área ventro-tegmental, la corteza prefrontal (PFC), el caudado-putamen (CP), y la amígdala (Pierce *et al.*, 1997 y Vanderschuren *et al.*, 2010). Se ha reportado que la administración aguda de cocaína induce un aumento transitorio en la expresión del gen c-fos, mientras que la administración crónica de cocaína induce una expresión de la proteína Fos en el estriado y en el NAcc. (Graybiel *et al.*, 1990; Young *et al.*, 1991 y Hope *et al.*, 1992).

En este estudio, nosotros encontramos que una sola administración de cocaína induce un ligero aumento en la actividad de las neuronas de las distintas áreas estudiadas. Es importante mencionar que el número de neuronas que se activan en el circuito VTA-NAc y VTA-PFC-NAcshell son muy pocas lo cual sugiere que una sola administración solo induce una ligera activación de las neuronas del sistema de recompensa. Este resultado está de acuerdo a lo previamente reportado por Hope y colaboradores en el 2002, en donde una sola administración de cocaína induce la expresión de la proteína Fos solo en el estriado y en el NAc. Adicionalmente, también se ha reportado que la actividad locomotora inducida por una sola administración de cocaína es mínima.

En este estudio encontramos que estructuras relacionadas con el control motor, como el NAc core y el caudado putamen la expresión de la proteína FOS es mínimo. Estos resultados correlacionan con la actividad motora observada en este punto temporal, en el cual se observa un mínimo aumento en la actividad en respuesta a la administración de la droga. Esto sugiere que una sola administración de la droga genera a nivel límbico y motor un ligero efecto de reforzamiento visto como un aumento mínimo en el número de neuronas inmunoreactivas a c-fos. Interesante se observa un aumento significativo en la actividad neuronal de la Amígdala basolateral, lo cual nos indica que la asociación de la administración de la droga (reforzamiento) con las señales del medio (contextuales) se lleva a cabo de manera separada y establece rápidamente al procesamiento de la información motora (Ledford y Fuchs, 2003).

En respuesta a la exposición repetida por administración de la droga, el número de neuronas inmunoreactivas a Fos va aumentando de forma gradual en el NAcshell sin que se observe una estabilización en la respuesta. Es importante mencionar que en el NAc shell se lleva a cabo la integración de la información proveniente de distintas regiones del cerebro encargadas de traducir los distintos aspectos de un estímulo denominado droga adictiva. Esta integración va a resultar al final en el establecimiento por parte del NAc shell del valor de reforzamiento o en la relevancia que la droga va a tener para el sujeto, que a su vez va a generar que este, busque y consuma una droga de abuso.

Previamente, se ha reportado que la administración por 5-7 días aumenta la expresión de la proteína Fos en el NAc, los resultados de este estudio están de acuerdo con estos reportes. El aumento gradual en el número de neuronas inmunoreactivas a la proteína Fos en el NAc shell estaría reflejando, por un lado, el aumento gradual en el valor reforzante y/o el aumento en la importancia que la droga tendría para el sujeto tras la administración continúa de la droga, lo cual probablemente sea el resultado de las alteraciones a nivel estructural, neuroquímico y molecular inducidas por la administración de la droga.

Se ha reportado que el NAcshell desempeña un papel crítico en los cambios adaptativos al consumo crónico de droga que lleva a la adicción, se ha reportado que una de las regiones del cerebro que sufre alteraciones morfológicas inmediatas es el NAc, dada la importancia de esta región en la integración de la información acerca de la droga, el aumento en el número de neuronas inmunoreactivas a Fos estaría reflejando, por un lado un aumento en la liberación de dopamina y por otro, que cada administración la droga estaría generando un estado de reforzamiento mayor, lo cual induciría un aumento progresivo de la actividad motora en la búsqueda y del consumo de la droga (sensibilización conductual) (Robinson *et al.*, 1993 y Nestler *et al.*, 1997).

Adicionalmente, se ha reportado que después de una serie de administraciones continuas de cocaína, las señales contextuales asociadas al consumo de la misma toman mucha relevancia. La amígdala basolateral es parte del complejo amigdalino, el cual una de sus funciones es traducir la información relacionada al ambiente de contexto en el cual una droga es administrada (Robbins y Everitt, 1999). En este estudio, la ABL muestra un patrón de inmunoreactividad a la proteína Fos similar al NAc shell. Otros autores han reportado previamente, que la administración continua de cocaína o anfetaminas induce un aumento gradual en el número de células inmunoreactivas a la proteína Fos en la amígdala central y basolateral. Nuestros resultados están en relación con estos. El patrón de expresión de la proteína Fos mostrado por la ABL sugiere que las señales contextuales asociadas al consumo de la droga cada vez son más relevantes para el desarrollo de la sensibilización conductual.

Este aumento gradual, a su vez, participa en el patrón de expresión de la proteína Fos en el NAc shell, lo cual resulta en el aumento en el valor de reforzamiento de la droga. Es probable que la activación gradual de las células de la amígdala sean el resultado de la activación de las células del VTA, sin embargo se ha reportado que el aumento de dopamina en la corteza prefrontal facilita la actividad de las neuronas de la amígdala, por lo tanto en el estado sensibilizado se pierde la acción inhibitoria de la corteza pre-frontal sobre la ABL (por probable hipoactividad

dopaminérgica en la corteza prefrontal), además de aumentar la actividad glutamatérgica desde la ABL sobre el núcleo accumbens, lo que reforzarían la sensibilización.

Es importante mencionar, que este aumento gradual mostrado por el NAc shell y la ABL, dos estructuras límbicas, solo estaría representando el efecto de la cocaína desde el punto de vista de reforzamiento, que ciertamente aumentaría la motivación del sujeto a buscar y consumir la droga o bien a aumentar la actividad locomotora. Sin embargo, no necesariamente este aumento induciría un aumento gradual en la actividad locomotora. Como se puede observar en la figura 5 del perfil de sensibilización locomotora, la actividad no aumenta gradualmente en respuesta a cada administración de la droga, a partir de la 3-4 administración la actividad se mantiene constante. Por lo que la expresión gradual en la proteína Fos en el NAc y la ABL podrían verse reflejada en otros patrones conductuales como el de búsqueda y consumo de la droga visto en el paradigma farmacológico de autoadministración intravenosa de cocaína (Robinson et al., 1993, Hall et al., 2001, Everitt *et al.*, 1999, Tran-Nguyen *et al.*, 1998).

Interesantemente, la expresión de la proteína Fos en el VTA muestra un patrón de expresión muy diferente al mostrado por la ABL y el NAc shell. La administración de la 1a a la 5ta administración continua de cocaína indujo un ligero pero significativo aumento en la expresión de la proteína Fos. A partir de la 7a administración el número de neuronas inmunoreactivas a la proteína Fos aumento súbitamente observándose un aumento en el número de neuronas inmunoreactivas mayor a la décima administración.

Es importante mencionar que pocos estudios han analizado la activación celular en respuesta a la administración de cocaína. Debemos de recordar que las neuronas dopaminérgicas del VTA proyectan directamente a neuronas dopaminérgicas y GABAérgicas del NAc *shell*. Las neuronas GABAérgicas a su vez proyectan al VTA, modulando la actividad de las neuronas del VTA. El ligero aumento en el número de neuronas inmunoreactivas a la proteína Fos estaría reflejando en parte esta actividad moduladora por parte de las neuronas

GABAérgicas del NAc. Sin embargo, dentro de las alteraciones morfológicas que se llevan a cabo en respuesta a la administración de la droga se encuentra la disminución de los receptores dopaminérgicos D2 localizados en las neuronas GABAérgicas, lo cual después de un consumo continuo ya no establecen su actividad moduladora sobre las neuronas dopaminérgicas del VTA, y se vería reflejado en el aumento súbito en el número de neuronas inmunoreactivas a la proteína Fos a partir de la séptima administración.

Adicionalmente, es probable que fibras procedentes del tegmento latero dorsal, que a su vez son excitadas por fibras glutamatérgicas provenientes de la corteza prefrontal también estén participando. Debemos recordar que el VTA envía proyecciones dopaminérgicas a la IL la cual, a su vez, envía proyecciones glutamatérgicas al VTA las cuales inducen la liberación de GABA provenientes de IL con el fin de modular la respuesta del VTA a una droga (Carr *et al.*, 2000). Sin embargo, al igual que lo que sucede en el NAc, justo cuando se observa un aumento en el número de neuronas en la IL, se observa el aumento en el número de neuronas inmunoreactivas a c-fos en el VTA, lo cual sugiere que a partir de la séptima administración, el sistema GABAérgico pierde relevancia (Kalivas *et al.*, 1991) y se observa el incremento en la actividad dopaminérgica en el VTA tras el estímulo droga, lo cual ocasiona una mayor liberación local de glutamato, lo que a su vez estimula aún más las neuronas de dopamina del VTA (Henry *et al.*, 1998, Kalivas, 1996), visto como un aumento súbito en el número de neuronas inmunoreactivas a Fos. Es probable que este aumento súbito en la actividad de las neuronas en el VTA esté relacionado con la estabilización en la actividad locomotora o bien en el establecimiento de la sensibilización locomotora.

Es importante mencionar que una de las funciones de la IL (corteza prefrontal) es establecer el juicio y la toma de decisiones acerca de la repetición de una cierta conducta y que la pérdida de control inhibitorio provisto por la corteza prefrontal dará lugar a conductas con un carácter compulsivo. La transición del consumo controlado de una droga hasta el hábito compulsivo se debe a la pérdida del control inhibitorio por parte de la corteza prefrontal sobre el accumbens shell (Volkow *et al.*, 2000 y

Goldstein *et al.*, 2001). Se ha visto que en animales de laboratorio la destrucción de la corteza prefrontal facilita el establecimiento de la conducta compulsiva de búsqueda y consumo de la droga (Weisenborn *et al.*, 1997). Se ha reportado previamente la expresión de la proteína Fos en respuesta a la administración de un psicoestimulante, sin embargo siempre han sido en tiempos cortos. Nuestros resultados son congruentes con los reportados, sin embargo nosotros mostramos la activación de las neuronas del VTA por más puntos temporales. La administración de cocaína indujo un aumento gradual en el número de neuronas inmunoreactivas a c-fos a partir de la 1a a la 5ta administración.

Como se mencionó anteriormente la función de la corteza prefrontal es mantener un control inhibitorio de la actividad del NAc y del VTA, mediante la activación de neuronas GABAérgicas. Es probable que el aumento en el número de neuronas inmunoreactivas a la proteína Fos observado en respuesta a estos puntos temporales sea el responsable del ligero aumento en la expresión de la proteína Fos observado en el VTA y adicionalmente, este modulando la actividad de las neuronas del NAc shell. Además al igual que el NAc shell, la IL es una de las regiones del cerebro que rápidamente desarrolla las alteraciones morfológicas inducidas por el consumo de una droga. De tal manera que en la mayoría de las regiones cerebrales analizadas, a partir de la séptima administración muestran un aumento significativo en el número de neuronas inmunoreactivas a la proteína Fos. De tal forma, el aumento en la actividad celular mostrado por la IL resulta por un lado en el aumento en la actividad de las células del VTA y por otro refleje la consolidación de la característica compulsiva que caracteriza a un patrón de consumo adictivo (Robbins y Everitt, 1999). Nuevamente, este aumento en la actividad celular refleja el establecimiento de la sensibilización locomotora.

En relación a las estructuras relacionadas al control motor como son el NAc core y el Caudado putamen, las cuales son las estructuras efectoras del sistema de recompensa, la expresión de la proteína Fos muestra dos etapas, en la primera de ellas, se observa un aumento gradual en el número de neuronas inmunopositivas a c-fos. La activación celular en estas dos regiones cerebrales refleja lo que sucede en

las otras aéreas del sistema de recompensa, el aumento en la expresión de la proteína Fos se debe al aumento en la actividad en el NAc shell y en la ABL, no tanto a la actividad mostrada en el VTA y IL ya que estas regiones están tratando de modular la actividad dopaminérgica en el NAc shell. El aumento en la liberación de dopamina en el NAcshell inducido en menor grado por el VTA y la IL y mayoritariamente por la ABL induce un aumento en el valor de reforzamiento de la droga y en la motivación por buscar nuevamente a la misma. Esto se vería reflejado en la respuesta motora inducida por la cocaína.

La administración continua de cocaína induce un aumento gradual, no súbito, en la actividad locomotora (Ito *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2000; Robinson *et al.*, 1993; Hall *et al.*, 2001; Everitt *et al.*, 1999 y Tran-Nguyen *et al.*, 1998). En la segunda el NAc shell proyecta primeramente al NAc core el cual proyecta al CP y recibe proyecciones de la IL, las cuales van a modular la actividad celular en el NAc core induciendo una atenuación en la respuesta motora inducida por la cocaína. Una vez que la modulación de estas áreas (IL-NAc shell-VTA) se pierde (Ikemoto, 2007) entonces observamos un aumento significativo en el número de neuronas inmunoreactivas a c-fos justo entre la séptima y décima administración continua de cocaína. Lo cual se vería reflejado en el establecimiento de la sensibilización conductual (Volkow *et al.*, 2000 y Cardinal *et al.*, 2002).

Es importante mencionar que el efecto motivacional-reforzante inducido por una droga subyace en ciertas regiones del cerebro. Y que el efecto motor está localizado en otras regiones. Las primeras van a afectar a las segundas en algún momento confiriéndole ciertas características a la respuesta motora, como la compulsividad, pero la respuesta motivacional-reforzante podría ir aumentando gradualmente en respuesta al consumo continuo de una droga, de tal forma un sujeto adicto o dependiente a la cocaína siempre va a estar buscando tener el mayor efecto hedónico placentero, el cual probablemente nunca lo va a encontrar, ya que la activación celular en estas aéreas podría ir aumentando gradualmente.

En conjunto, estos resultados sugieren que existen dos posibilidades; la primera, se refiere a que en las diferentes áreas del cerebro del circuito

mesocorticolímbico la administración de cocaína induce la activación de un grupo inicial de neuronas las cuales son las responsables de las respuestas a las primeras administraciones estableciendo cambios bioquímicos que fundamentan la sensibilización y facilitan el aprendizaje adictivo (Ben-Shahar *et al.*, 2002). Como se ha reportado la administración de cocaína induce adaptaciones a nivel morfológico en respuesta a la activación de los receptores D1/D2 like. Es probable que después de algunas administraciones estas células que inicialmente respondieron a la droga sufran de alteraciones morfológicas las cuales realicen contacto sináptico con otras neuronas, lo cual se vea reflejado como un aumento gradual en el número de neuronas inmunoreactivas a c-fos (Volkow *et al.*, 1993). Y segundo, conductualmente se expresa un aumento en la actividad motora y en la aparición de otro tipo de conductas patológicas consolidadas, como un aumento en el valor de reforzamiento, generando el hábito adictivo. Es probable que en algunas áreas el número de neuronas se estabilice y en otras relacionadas a los efectos límbicos hedónicos (Volkow *et al.*, 1997), de la droga sigan en aumento, lo cual demuestra que el efecto de reforzamiento en el cerebro va aumentando.

CONCLUSIÓN

La adicción es un proceso neurobiológico complejo que implica un gran número de estructuras cerebrales relacionadas con la actividad del sistema dopaminérgico. El consumo crónico de drogas de abuso como la cocaína, provoca cambios neuroadaptativos en los receptores dopaminérgicos del sistema mesocorticolímbico, induciendo el desarrollo del proceso de sensibilización, que puede significar el inicio del proceso adictivo.

En este estudio, nosotros encontramos que una sola administración de cocaína induce un ligero aumento en la expresión de la proteína Fos en el circuito VTA-NAc y VTA-PFC-NAc shell y en las estructuras NAc core y Caudado Putamen; que están relacionadas en el control motor. Estos resultados correlacionan con lo observado en la gráfica de actividad locomotora (figura 5), donde se ve un mínimo aumento en la actividad motora en respuesta a la administración de la cocaína. Algo muy interesante es que en la región de la Amígdala Basolateral, hay un aumento significativo en la actividad neuronal, lo cual nos indica que la relación de la administración de la droga con la señales del medio ambiente (contextuales) ocurre desde la primera administración. Las estructuras neuroanatómicas que rigen el comportamiento motivado y que se afectan con el uso de drogas, se agrupan en el denominado sistema límbico, una de ellas es el NAc shell, que en respuesta a la exposición repetida de la droga, el número de neuronas activadas va aumentando de forma gradual sin que se observe una estabilización en la respuesta, reflejando un aumento continuo en el valor de reforzamiento y en la relevancia que tiene la droga por el cerebro.

Adicionalmente otra estructura del sistema límbico es la ABL que también muestra un patrón de inmunoreactividad a fos, similar al NAc shell. Se ha descrito que el aumento de dopamina en la corteza prefrontal facilita la actividad de las neuronas de ésta, por lo tanto en el estado sensibilizado se pierde la acción inhibitoria de la corteza pre-frontal sobre la BLA (por probable hipoactividad dopaminérgica en la corteza prefrontal). El patrón de inmunoreactividad de expresión

de la proteína Fos mostrado por la ABL sugiere que las señales contextuales asociadas al consumo de la droga cada vez son más relevantes para el desarrollo de la sensibilización conductual. Es importante mencionar, que este aumento gradual mostrado por el NAc shell y la ABL, dos estructuras límbicas, solo estaría representando la motivación del sujeto a buscar y consumir la droga o bien a aumentar la actividad locomotora. Sin embargo, no necesariamente este aumento induciría un aumento gradual en la actividad locomotora.

Curiosamente el VTA no muestra un patrón similar, la respuesta se establece de la primera a la quinta administración y se observa un aumento súbito y significativo a partir de la 7 administración, pero observándose un aumento mayor en la décima administración, es probable que este aumento súbito en la actividad de las neuronas en el VTA esté relacionado con la estabilización en la actividad locomotora o bien en el establecimiento de la sensibilización locomotora. La administración de cocaína indujo un aumento gradual en el número de neuronas inmunoreactivas a c-fos, a partir de la 1a a la 5ta administración en la IL (corteza prefrontal). El hecho de que en la IL, a partir de la quinta administración muestran un aumento significativo en el número de neuronas inmunoreactivas a la proteína Fos, sugiere que puede representar el inicio y/o consolidación de la característica compulsiva que caracteriza a un patrón de consumo adictivo, estableciendo la sensibilización locomotora.

En relación a estructuras con características motoras como son el NAc core y el Caudado putamen se observan dos etapas, en la primera etapa, en las administraciones de la tercera a la quinta se observa un aumento en las neuronas inmunopositivas a Fos, esto refleja lo que sucede en las otras aéreas del sistema de recompensa, el aumento en la expresión de la proteína Fos se debe al aumento en la actividad en el NAc shell y en la ABL, la segunda etapa que corresponde de la 7 a la 10 administración reflejaría ya la característica de la conducta compulsiva de la búsqueda de la droga, dada por la pérdida de la modulación en las áreas (IL-NAc shell-VTA) dando como resultado el aumento en el número de neuronas inmunoreactivas a Fos, lo cual resultaría en el aumento en la actividad motora visto en la curva de sensibilización.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmed SH, Kenny PJ, Koob GF, Markou A. (2002): *Neurobiological evidence for hedonic allostasis associated with escalating cocaine use*. Nature Neuroscience. 5, 625-626
2. American Psychiatric. (1994): *Association Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 4th ed, American Psychiatric Press, Washinton DC
3. Bassareo V, Di Chiara G. (1999): *Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens shell/core compartments*. Neuroscience. 89:637-641.
4. Ben-Shahar O, Ahmed SH, Koob GF, Ettenberg A. (2004): *The transition from controlled to compulsive drug use is associated with a loss of sensitization*. Brain Res. 995:46-54.
5. Brailowsky S. (1995): *Las sustancias de los sueños*. Fondo de Cultura Económica. México.
6. Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J, Everitt BJ.(2002): *Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum and prefrontal cortex*. Neurosci Biobehav Rev. 26:321-52.
7. Carr DB, Sesack SR. (2000) *Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons*. J Neurosci. 20: 3864-73.

-
8. Cheng J, de Bruin P, Feenstra G. (2003): *Dopamine efflux in nucleus accumbens shell and core in response to appetitive classical conditioning*. Eur J Neurosci. 18(5):1306-1314.
 9. Di Chiara G. (2002): *Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction*. Behav Brain Res. 137(1-2):75-114.
 10. Di Ciano P, Cardinal R, Cowell R, Little S, Everitt B. (2001): *Differential Involvement of NMDA, AMPA/Kainate, and Dopamine Receptors in the Nucleus Accumbens Core in the Acquisition and Performance of Pavlovian Approach Behavior*. The Journal of Neuroscience. 21(23):9471-9477.
 11. Eddy NB, Halbach H, Isabell H, Seevers MH. (1965): *Drug dependence: its significance and characteristic*. Bulletin of the World Health Organization. 32, 721-733.
 12. Everitt B, Cardinal R, Parkinson J, Robbins T. (2003): *Appetitive behavior: impact of amygdala-dependent mechanisms of emotional learning*. Ann NY Acad Sci. 985:233-250.
 13. Everitt BJ, Parkinson JA, Olmstead MC, Arroyo M, Robledo P, Robbins TW. (1999): *Associative processes in addiction and reward the role of amygdala-ventral strial subsystems*. Ann NY Acad Sci. 877:412-38.
 14. Fiorino F, Coury A, Phillips AG. (1997): *Dynamic changes in nucleus accumbens dopamine efflux during the Coolidge effect in male rats*. J Neurosci. 17: 4849-4855.
 15. Fischman M, Schuster C, Rajfer S. (1983): *A comparison of the subjective and cardiovascular effects of cocaine and procaine in humans*. Pharmacol Biochem Behav. 18: 711-716.

-
16. Folti RW, Fischman MW. (1991): *Smoked and intravenous cocaine in humans, acute tolerance, cardiovascular and subjective effects*. J Pharmacol Exp Ther. 257 (1): 247-261.
 17. Foltin JF, Fischman M, Predoso J, Pearson G. (1988): *Repeated intranasal cocaine administration: Lack of tolerance to pressor affects*. Drugs and Alcohol Dependence. 22: 169-177.
 18. Goldstein RZ, Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Rajaram S. (2001): *Addiction changes orbitofrontal gyrus function: involvement in response inhibition*. Neuroreport. 12:2595-9.
 19. Gonzalez C, Montminy M. (1989): *Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133*. Cell. 59:675-680.
 20. Graybiel AM, Moratalla R, Robertson HA. (1990): *Amphetamine and cocaine induced drug- specific activation of the c-fos gene in striosome – matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum*. Proc Acad Sci USA. 87:6912-6916.
 21. Gross J. (1985): *New purified form of cocaine cause alarm abuse increases*. New York, Times. 29:1
 22. Haile CN, Hiroi N, Nestler EJ, Kosten TA. (2001): *Differential behavioral responses to cocaine are associated with dynamics of mesolimbic dopamine proteins in Lewis and Fischer 344 rats*. Synapse. 41 (3):179-90.

-
23. Haile NC, GrandPre T, Kosten TA. (2001): Chronic unpredictable stress, but not chronic predictable stress, enhances the sensitivity to the behavioral effects of cocaine rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 154 (2):213-20.
24. Hall J, Parkinson JA, Connor TM, Dickinson A, Everitt BJ.(2001): *Involvement of the central nucleus of the amygdala and nucleus accumbens accumbens core in mediating Pavlovian influences an instrumental behavior.* *Eur J Neurosci.* 13:1984-92.
25. Harvey J, Kosofsky B. (1998): *Cocaine: Effects on the Developing Brain.* *Annals of the New York Academy of Sciences.* Vol. 846.
26. Hautant A. (1910): *Über den chronischen kokainismus mit nasaler.* *Anwedug Int Zentralbl Laryngol Rhinol.* 25: 138.
27. Henry DJ, Xu XT, White FJ. (1998): *Adaptations in the mesoaccumbens dopamine system resulting from repeated administration of dopamine D1 and D2 receptor-selective agonists: reliance to cocaine sensitization.* *Psychopharmacology.* 140:233-42.
28. Hope BT, Kosofsky B, Hyman SE, Nestler EJ. (1992): *Regulation of immediate early gene expression an AP-1 binding chronic cocaine.* *Proc Acad Sci USA.* 89:5764-5768.
29. Hope BT, Simmons DE, Mitchell TB, Kreuter JD, Mattson BJ. (2006): *Cocaine – induced locomotor activity and Fos expression in nucleus accumbens are sensitized for 6 months after repeated cocaine administration outside the home cage.* *Eur J Neurosci.* 24:867-875.

-
30. Hutcheson D, Everitt B. (2003): *The effects of selective orbitofrontal cortex lesions on the acquisition and performance of cue – controlled cocaine seeking in rats*. Ann NY Acad Sci. 1003:410-1.
31. Ikemoto S. (2007): Dopamine reward circuitry: two projections systems from the ventral mid brain to the nucleus accumbens olfactory tubercle. Brain Res Rev. 56 (1): 27-78.
32. Ito R, Dalley JW, Howes SR, Robbins TW, Everitt BJ. (2000): Dissociation in conditioned dopamine release in the nucleus accumbens core and shell in response to cocaine cues and during cocaine-seeking behavior in rats. J Neurosci. 20: 7489-95.
33. Ito R, Dalley JW, Robbins TW, Everitt BJ. (2002): *Dopamine release in the dorsal striatum during cocaine-seeking behavior under the control of a drug-associated cue*. J Neurosci. 22:6247-53.
34. Ito R, Dalley W, Howes R, Robbins W, Everitt J. (2000): *Dissociation in conditioned dopamine release in the nucleus accumbens core and shell in response to cocaine cues and during cocaine – seeking behavior in rats*. J. Neurosci. 20: 7489- 7495.
35. Javaid J, Fischman M, Schuster C. (1978): *Cocaine plasma concentrations: Relation to physiological and subjective effects in humans*. Science. 202: 227-228.
36. Javaid J, Musa M, Fischman M, Schuster C, Davis J. (1983): *Kinetics of cocaine in humans after intravenous and intranasal administration*. Biopharm. Drugs Dispos. 4: 9-18.

-
37. Jeffcoat A, Perez RM, Hill J. (1989): *Cocaine disposition in humans after intravenous injection, nasal insufflations (snorting) or smoking*. Drug Metab. Dispos. 17 (2): 153-159.
38. Jekel J, Allen D, Podlewski H. (1986): *Epidemic freebase cocaine abuse: case study from the Bahamas*. Lacet, 1: 459-462.
39. Kalivas Pw, Stewart J. (1991): *Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress- induced sensitization of motor activity*. Brain Res Rev. 16:223-44.
40. Kalivas PW. (1996): *Repeated intraventral tegmental area administration of SKT-38393 induces behavioral and neurochemical sensitization to a subsequent cocaine challenge*. J Pharmacol Exp Ther. 278:384-92.
41. Kelley E. (2004): *Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward- related learning*. Neurosci Biobehav Rev. 27:765-776.
42. Koob GF and Le Moal M. (2001): *Drug addiction, dysregulation of reward and allostasis*. Neuropsychopharmacology. 24:97-129.
43. Koob GF, Volkow ND. (2010): *Neurocircuitry of addiction*. Neuropsychopharmacology. 35: 217-238.
44. Koob GF. (2006): *The neurobiology of addiction: a neuroadaptational view relevant for diagnosis*. Addiction, 101: 23–30.
45. Krutchkoff D, Eisenberg E, O'Brien J, Pozillo J. (1990): *Cocaine – induced dental erosions*. Nengl J Med. 322 (6): 408.

-
-
46. Lanahan A, Worley P. (1998): *Immediate-early genes and synaptic function*. Neurobiol Learn Mem. 70(1-2):37-43.
47. Ledford CC and Fuchs RA. (2003): *Potentiated reinstatement of cocaine – seeking behavior following D- amphetamine infusion into the basolateral amygdala*. Neuropsychopharmacology. 28: 1721-9.
48. Maier H. (1926): *Der kokainismus*. Addiction Research Foundation. Toronto
49. Maloney B, Barbato L, Ihm B. (1994): *The qualitative determination of trace amounts of cocaine obtained through casual contact*. Microgram. 27 (6): 185-187.
50. Martel P, Fantino M. (1996): *Mesolimbic Dopaminergic System Activity as a function of food reward: A microdialysis study*. Pharmacol Biochem Behav. 53: 221-226.
51. Mateo Y, Budygin EA, John CE, Jones SR. (2004): *Role of serotonin in cocaine effects in mice with reduced dopamine transporter function*. Proc Natl Acad Sci. 101:372-377.
52. Mattson BJ, Crombag HS, Mitchell T, Simmons DE, Kreuter JD, Morales M, Hope BT. (2007): *Repeated amphetamine administration outside the home cage enhances drug- induced Fos expression in rat nucleus accumbens*. Behav Brain Res. 185:88-98.
53. Mc Clure M, Daw D, Montague R. (2003): *A computational substrate for incentive salience*. Trends Neurosci. 26: 423-428.

-
54. Medina MaE, Rojas GE. (2003): *La demanda de drogas: México en la perspectiva internacional*. Salud Mental. Vol. 26 (2):1-11.
55. Morgan JI, Curran T. (1991): *Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun*. Annu Rev Neurosci. 14:421-51
56. Nelson JE, Pearson HW, Sayers M, Glynn TJ. (1982): *Guide to Drug Abuse Research Terminology*. National Institute on Drug Abuse. Rockville MD.
57. Nestler EJ, Aghajanian GK. (1997): *Molecular and cellular basis of addiction*. Science. 278:58-63.
58. Nestler EJ. (2000): *Genes and addiction*. Nat Genet. 26(3): 277-81.
59. Nestler EJ. (2001): *Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction*. Nat Rev Neurosci. 2:119-28.
60. Nestler EJ. (2005): *The neurobiology of cocaine addiction*. Sci Pract Perspect. 3(1):4-10.
61. Old J and Milner P. (1954): *Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain*. J Comp physical Psychol. 47: 419-427.
62. Oropeza TR, Loyola BP, Vázquez PF, Martínez RL. (2005): *Tratamiento breve para usuarios de cocaína: un modelo cognitivo conductual, principios de aplicación*. CONADIC. México. 1: 7-10.

-
-
63. Ostrander MM, Badiani A, Day HE, Norton CS, Watson SJ, Akil H, Robinson TE. (2003): Environmental context and drug history modulate amphetamine – induced c-fos mRNA expression in the basal ganglia, central extended amygdala and associated limbic fore brain. *Neuroscience*. 120:192-216.
64. Paly D, Jatlow P, VanDyke C. (1982): *Plasma cocaine concentration during cocaine pasta smoking*. *Lifesci*. 30:731-738.
65. Paxinos G, Watson C. (1998): *The Rat Brain Stereotaxic Coordinate*. San Diego: Academic Press.
66. Pérez R. (1999): *Yerba, goma y opio*. Era. México.
67. Perez RM, Guiseppi S, Ondrusek G. (1982): *Frebase cocaine smoking*. *Clin Pharmacol Ther*. 32: 459-465.
68. Pierce RC, Kalivas PW. (1997): *A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine like psychostimulants*. *Brain Res Rev*. 25:192-216.
69. Redda KK, Walker AC, Barnet G. (1990): *Cocaine, marijuana, desinner drugs: chemistry, pharmacology, and behavior*. CRC Press. Boca Raton, Fla. 32-49.
70. Robbins TW and Everitt BJ. (1999): *Drug addiction: bad habits add up*. *Nature*. 398:567-70.
71. Robinson E, Berridge C. (1993): *The natural basis of drug craving: an incentive – sensitization theory of addiction*. *Brain Res Rev*. 18: 247-241.

-
72. Robinson TE and Berridge KC. (2000): *The psychology and neurobiology of addiction: an incentive – sensitization view*. *Addiction*. 95: S91-S117.
73. Robinson TE and Berridge KC. (2001): *Incentive – sensitization and addiction*. *Addiction*. 96, 103-114.
74. Robinson TE and Berridge KC. (2001): *Review. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 363(1507):3137-46.
75. Robinson TE, Browman KE, Crombag HS, Badiani A. (1998): *Modulation of the induction or expression of psychostimulant sensitization by the circumstances surrounding drug administration*. *Neurosci Biobehav Rev*. 22(2):347-54.
76. Roger DW, Steven MM, Roxanne LB. (1994). *Cocaine: the current cocaine epidemic American Psychiatric press*. Washington, DC. 5-9.
77. Roger JL. (2007): *Selective inactivation of the ventral hippocampus attenuates cue-induced and cocaine-primed reinstatement of drug-seeking in rats*. *Neurobiol Learn Mem*. 87:688-692.
78. Samaha An and Robinson TE. (2005): *Why does the rapid delivery of drugs to the brain promote addiction?*. *Trends Pharmacos Sci*. 26:82-87.
79. Samaha AN, Li Y, Robinson TE. (2002): *The rate of intravenous cocaine administration determines susceptibility to sensitization*. *J Neurosci*. 22:3244-3250.

-
80. Samaha AN, Mallet N, Ferguson SM, Gonon F, Robinson TE. (2004): *The rate of cocaine administration alters gene regulation and behavioral plasticity implications for addiction.* J Neurosci. 24; 24: 6362-6370.
81. Schultz W. (2001): *Reward signaling by dopamine neurons,* Neuroscientist. 7:293-302.
82. Secretaria de Salud, Subsecretaria de Prevención y Control de Enfermedades, Instituto Mexicano de Psiquiatría; dirección general de epidemiología, Consejo nacional contra las adicciones, Encuesta Nacional de Adicciones México, 2008.
83. Sheng M, Greenberg M. (1990): *The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system.* Neuron. 4: 477-485.
84. Tischmeyer W, Grimm R. (1999): *Activation of immediate early genes and memory formation.* Cell Mol Life Sci. 55(4):564-74.
85. Todtenkopf MS, Mihalakopoulos A, Stellar JR. (2002): *Withdrawal duration differentially affects c-fos expressions in the medial prefrontal cortex and discrete subregions of the nucleus accumbens in cocaine – sensitized rats.* Neuroscience. 114, 1061-1069.
86. Tran-Nguyen LT, Fuchs RA, Coffey GF, Baker DA, O'Dell LE, Neisewander JL. (1998): *Time-dependent changes in cocaine-seeking behavior and extracellular dopamine levels in the amygdala during cocaine withdrawal.* Neuropsychopharmacology. 19:48-59.

-
87. Vanderchuren LJM and Kalivas PW. (2000): *Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies.* Psychopharmacology (Berl). 151:99-120.
88. Vanderschuren L JMJ and Pierce RC. (2010): *Sensitization processes in drug addiction. Current topics in behavioral neurosciences.* 3:179-95.
89. Volkow ND, Fowier JS, Wang GJ, Hitzemann R, Logan J, Schlyer DJ. (1993): *Decreased dopamine D2 receptor availability is associated with reduced frontal metabolism in cocaine abusers.* Synapse. 14:169-177.
90. Volkow ND, Fowler JS. (2000): *Addiction a disease of compulsion and drive: involvement of the prefrontal cortex.* Cereb Cortex . 10: 318-25.
91. Volkow ND, Wang GJ, Fischman MW, Folti RW, Fowler JS, Abumrad NN, et al. (1997): *Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy.* Nature. 386:827-830.
92. Weinswig MH. (1974). *Consecuencia del uso y abuso de las drogas: Estimulantes.* Cinco siglos. México. 69-73.
93. Weisenborn R, Robbins TW, Everitt BJ. (1997): *Effects of medial prefrontal or anterior cingulate cortex lesion on responding for cocaine under fixed ratio and second order schedules of reinforcement in rats.* Psychopharmacology. 134:242-57.
94. White FJ and Kalivas PW. (1998): *Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction.* Drug Alcohol Depend. 51,141-153.

-
95. Wilkinson P, VanDyke C, Jatlow P. (1980): *Intranasal and oral cocaine. Kinetics Clin Pharmacol Ter.* 27: 386-394.
96. Young ST, Porrino LJ, Iadorola MJ. (1991): *Cocaine induces strial c-fos immunoreactive proteins via dopaminergic D1 receptors.* Proc Acad Sci USA. 88:1291-1295.
97. Yuferov V, Krosiak T, Laforge SK, Zhou Y, Ho A, Kreek MJ. (2003): *Differential gene expression in the rat caudate putamen after "binge" cocaine administration: Advantage of triplicate microarray analysis.* Synapse. 48 (4): 157-69.
98. Yukihiro S. and Shigemitsu C. (2006): *Neurochemistry of the Nucleus Accumbens and its Relevance to Depression and Antidepressant Action in Rodents.* Current Neuropharmacology. 4, 277-29.
99. Zombeck A, Chen T, Johnson V, Rosenberg M, Craig B. (2008): *Neuroanatomical specificity of conditioned responses to cocaine versus food in mice.* Physiology Behave. 93: 637- 650.