



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

“ACTIVIDAD DE LA CORTEZA INSULAR
DURANTE LA EVOCACIÓN DEL
CONDICIONAMIENTO DE PREFERENCIA
DE LUGAR”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN PSICOLOGÍA
P R E S E N T A:
A N D R É S A G O I T I A P O L O

DIRECTOR: DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI
REVISOR: DR. ANTONIO PAULINO ZAINOS ROSALES
SINODALES: DR. GUSTAVO BACHÁ MÉNDEZ
DRA. MARTHA LILIA ESCOBAR RODRÍGUEZ
M. en C. ALEJANDRA AGUAYO DEL CASTILLO

Proyecto apoyado por PAPIIT IN208616 y CONACyT CB250870

Ciudad Universitaria, Ciudad de México

Febrero 2017





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



Reconocimientos

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria, perteneciente a la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección conjunta de la Dra. Israela Balderas Moreno y el Dr. Federico Bermúdez Rattoni.

Con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CB250870) y del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (IN208616).

Agradezco el valioso apoyo de la Biol. Inés Gutiérrez Jaber, del LIBB. Rodrigo Pérez Ortega, y de la Dra. Perla Moreno Castilla, así como del personal de la Unidad de Cómputo y del Bioterio del IFC por la asistencia técnica proporcionada durante la realización de este proyecto.

Agradecimientos

A mis padres, Juan Carlos y Norma, por haberme dado una educación que me permitiera aspirar a perseguir una formación académica en la universidad más importante del país, además de haber creído en las bases de un proyecto científico en México.

A mi familia, especialmente a mis abuelos Juan y Lilia, por haber demostrado su interés sobre mi trabajo en el laboratorio y por brindarme, en todo momento, su amor y apoyo incondicional.

Al Dr. David N. Velázquez, por abrirme las puertas de la investigación científica básica y haberme permitido integrar al laboratorio de Farmacología Conductual de la Facultad de Psicología, donde tuve la fortuna de aprender, enseñar, crecer, viajar y compartir todo tipo de experiencias con un equipo único de psicólogos y amigos. Mis primeros compañeros: Esmeralda, Alejandra, Oriana, Yeni, Asaí, Gaby, Perla y Wendy. ¡Gracias!

A la próxima Dra. Esmeralda Fonseca y a la recién M. en C. Alejandra Aguayo, por haber guiado mis primeros pasos y tropiezos en el laboratorio y por haber dejado una valiosa y profunda huella en mi formación académica y científica al motivarme no solo a mí, sino a varias generaciones de psicólogos a superarse constantemente. Ustedes enarbolan los 3 ejes rectores de la Universidad. Su total entrega, dedicación y respeto a la ciencia las ha convertido en mi modelo profesional a seguir. ¡Gracias por creer en mí!

Al Dr. Federico Bermúdez Rattoni, por haberme permitido integrar al laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria y otorgarme la libertad de estudiar un tema que me apasiona, así como la oportunidad de seguir aprendiendo de y colaborando con algunos de los próximos grandes científicos del país, en quienes he encontrado buenos compañeros e invaluable amigos: Israela, Perla, Kioko, Daniel, Lorelei, Carlos, Anali, Inés, Rodrigo, Lucy, Óscar, Elvi, Gerardo, Antonio, Cintia y Eduardo.

A los Dres. Gustavo Bachá, Hugo Sánchez y Marina Menez, cuya excelente labor docente despertó mi curiosidad por el estudio científico de los sustratos biológicos que subyacen a la conducta y me motivó a buscar respuestas más allá de los salones de clase.

A mis compañeros de carrera, con quienes compartí un sinnúmero de aventuras que hicieron de aquellos años, algo inolvidable: Juan Carlos, Sarah, Katia, Ingrid, Daniela, Pilar, Valeria, Alexia, Canela, Yaely, Maricruz, Erika, Manuel, Talía y Marisol.

A mis compañeros de vida, porque han estado conmigo a cada paso, en cada instante de duda, así como en cada momento de gozo: Juan Carlos, Noé Pablo, Enrique, César, Daniela, Gabriela, Cecilia, Ángel, la hermosa familia García Euroza y los caballeros de LesChats.

A Fernanda, por todo tu amor, apoyo y comprensión, y porque contigo cada día es una aventura.

A la Universidad, por ser el proyecto de educación superior más importante de México y por brindarnos la oportunidad y los medios para realizar investigación científica de calidad.

A los roedores, porque les debemos más de lo que, a veces, nos imaginamos.

Para Isra,
Gracias por todo.

Hasta siempre.

Murdoch, S. L. (2015). *Nobody's Empire* [Recorded by Belle and Sebastian].
On Girls in Peacetime Want to Dance [CD]. Atlanta, GA: Matador.

“Early in a history of opiate use, the user experiences the *“rush”* (an intensely pleasurable feeling) directly after the opiate injection, followed by a period of less intense euphoria. Then, with further passage of time, the user suffers aversive, painful, and frightening somatic withdrawal symptoms, together with a feeling of craving. [...] After repeated dosages of opiates over several weeks, State A begins to weaken, and at the time State B begins to intensify and takes longer to return to baseline. [...] The craving aspect of State B’ is now extremely intense, aversive, and enduring. It is called *abstinence agony*. It can be months before B’ returns to baseline. Perhaps it never really does. It is a ghastly experience.”

“A boy and a girl *“fall in love”*. This State A is characterized by pleasurable excitement, frequent sexual feelings, a prevailing mood of ecstasy, happiness, and good feelings. When the lovers, whose multimodal mutual stimulation will cause State A, are separated from each other, they will feel lonely, sad, and depressed (State B). [...] After several years of repeated mutual stimulation, the qualitative and quantitative changes in A and B are a matter of public lore. State A’ is characterized (if all has gone well) as contentment, normalcy, and comfort. But State B’ is now potentially of high intensity and long duration. [...] The partners have become addicted to each other, and when separated they experience withdrawal symptoms.”

Solomon, R. L., Corbit, J. D., (1974). An Opponent-Process Theory of Motivation: I. Temporal Dynamics of Affect. *Psychological Review*. 81(2). 119-145. DOI: 10.1037/h0036128

Índice

Abreviaturas	I
Resumen	II
1. Introducción	1
1.1. Diagnóstico Clínico	2
1.2. Panorama Epidemiológico	4
1.2.1. Datos Internacionales	5
1.2.2. Datos Nacionales	13
2. Marco Teórico	18
2.1. Condicionamiento Clásico	18
2.2. Condicionamiento de Preferencia de Lugar	19
2.3. Neurobiología de la Motivación y Sustancias de Abuso	21
2.4. Propiedades Farmacológicas de la Anfetamina	24
3. Antecedentes	26
4. Justificación	31
5. Objetivos	32
6. Hipótesis	32
7. Método	32
7.1. Animales	32
7.2. Materiales	33
7.3. Procedimiento	34
7.3.1. Condicionamiento de Preferencia de Lugar	34
7.3.2. Histología	35
7.3.3. Inmunohistoquímica	35
7.3.4. Cuantificación de c-Fos	35
7.4. Análisis de Datos	36
8. Resultados	38
9. Discusión	43
10. Conclusiones	50
11. Referencias Bibliográficas	51

Abreviaturas

AMPc: Adenosín Monofosfato Cíclico

BLA: Núcleo Basolateral de la Amígdala

CApc: Consumo de Alcohol per Cápita

CeA: Núcleo Central de la Amígdala

CI: Corteza Insular

CPA: Condicionamiento de Aversión al Lugar (por sus siglas en inglés)

CPP: Condicionamiento de Preferencia de Lugar (por sus siglas en inglés)

DARPP-32: Fosfoproteína de 32 kDa regulada por dopamina y AMPc (por sus siglas en inglés)

EC: Estímulo Condicionado

EI: Estímulo Incondicionado

ENA 2011: Encuesta Nacional de Adicciones 2011

fMRI: Resonancia Magnética Funcional (por sus siglas en inglés)

GABA: Ácido γ -amino-butírico (por sus siglas en inglés)

HL: Hipotálamo Lateral

ICD-10: 10^a Revisión de la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados a la Salud (por sus siglas en inglés)

MRI: Resonancia Magnética (por sus siglas en inglés)

NAC: Núcleo Accumbens

NMDA: N-metil-D-aspartato

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCA: Patrón de Consumo tipo Atracón

PET: Tomografía por Emisión de Positrones (por sus siglas en inglés)

PKA: Proteína Quinasa A (por sus siglas en inglés)

RC: Respuesta Condicionada

RI: Respuesta Incondicionada

SSI: Solución Salina Isotónica

VIH/SIDA: Virus de Inmunodeficiencia Humana / Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

VTA: Área Tegmental Ventral (por sus siglas en inglés)

Resumen

El abuso en el consumo de sustancias, tanto legales como ilegales, constituye un importante problema de salud pública que continúa creciendo, no solo en México sino también a nivel internacional. Bajo ciertas condiciones, el consumo crónico de sustancias de abuso conduce al desarrollo de los llamados *trastornos por consumo de sustancias*. Dichos trastornos se caracterizan, conductualmente, por una pérdida progresiva en el control del consumo y por la incapacidad de disminuir o cesar el mismo, a pesar de realizar esfuerzos constantes para ello. Entre las principales causas de reincidencia se encuentra la exposición a contextos relacionados al consumo. Esta exposición desencadena un intenso deseo o ansia de consumo que favorece la aparición de recaídas.

Estudios de imagenología cerebral, realizados en consumidores asiduos de distintas sustancias de abuso, han identificado una correlación positiva entre la experimentación subjetiva del ansia de consumo y la actividad de ciertas regiones cerebrales, entre las que se encuentra la ínsula; una región cortical previamente implicada en el procesamiento de la memoria gustativa. Un destacado estudio clínico, realizado en pacientes con tabaquismo severo, señaló que la lesión de la corteza insular favoreció el cese súbito de consumo y previno la reincidencia, al mismo tiempo que se reportó la atenuación del ansia de consumo. Resultados similares han sido reportados mediante manipulaciones farmacológicas de la ínsula de roedores expuestos a sustancias de abuso.

Estudios han señalado que al incrementarse el periodo de abstinencia, se desarrollan o “incuban” cambios en los procesos que subyacen a la búsqueda del consumo, por ejemplo; el ansia de consumo. Estos hallazgos sugieren que la ínsula ejerce un papel clave en el mantenimiento de las adicciones. No obstante, se desconoce el impacto que tiene la abstinencia sobre la actividad de la corteza insular, durante la exposición a contextos relacionados al consumo.

Mediante el condicionamiento de preferencia de lugar inducido por la administración crónica de anfetamina, se determinó el efecto de dos periodos diferenciales de abstinencia (1 y 10 días) sobre el patrón conductual y de activación de la corteza insular, durante la evocación de la memoria, desencadenada por claves contextuales condicionadas. Mientras no se observaron diferencias sobre la preferencia de lugar condicionada después de ambos periodos de abstinencia, se encontró un aumento estadísticamente significativo en la expresión de la proteína c-Fos en la corteza insular de los roedores expuestos a 10 días de abstinencia. Dicha expresión se interpretó como un marcador de la actividad neuronal vinculada a la evocación del condicionamiento. Los resultados de este estudio sugieren que el sometimiento a periodos prolongados de abstinencia influye sobre la actividad de la ínsula en respuesta a claves contextuales asociadas al consumo.

Palabras Clave: *Ínsula, Abstinencia, Condicionamiento de Preferencia de Lugar.*

1. Introducción

Bajo ciertas condiciones, el consumo crónico de sustancias de abuso conduce al desarrollo de los llamados *trastornos por consumo de sustancias*. Dichos trastornos están compuestos por un cúmulo de síntomas cognitivos, conductuales y fisiológicos que evidencian el uso recurrente y desmedido de sustancias de abuso, a pesar de las consecuencias negativas que esto le ocasiona al usuario (American Psychiatric Association, 2013).

De manera convencional, en diversos escenarios se ha utilizado el término “*adicciones*” para hacer referencia a este tipo de padecimientos. Cabe recalcar que éste no es un término de diagnóstico actual y que ha caído en desuso, en el ámbito de la clínica, por razones de estigmatización social. No obstante, dicho término ha permeado en los discursos relacionados al consumo de sustancias de abuso a tal grado que continúa siendo empleado por distintos personajes, figuras e instituciones para referirse a los casos más severos de los trastornos por consumo de sustancias (American Psychiatric Association, 2013).

La característica principal de esta serie de padecimientos recae en la pérdida progresiva de control sobre el consumo de sustancias y en la experimentación crónica de episodios de reincidencia, a pesar de llevar a cabo esfuerzos constantes, pero infructuosos, para disminuir o cesar el consumo (American Psychiatric Association, 2013).

Las sustancias de abuso ejercen sus efectos a través de diferentes mecanismos de acción farmacológicos. Sin embargo, la experiencia placentera del consumo resulta de la interacción de dichas sustancias, a nivel de sistema nervioso central, con el circuito neurobiológico de recompensa, ya sea de manera directa o indirecta. Esto implica que las propiedades hedónicas experimentadas por el consumo de dichas sustancias emanan de las mismas estructuras cerebrales que son activadas normalmente por estímulos recompensantes convencionales tales como agua, alimento, sexo, entre otros (Carlson, 2013; Kuhar, 2012; World Health Organization, 2004).

El establecimiento de una adicción conlleva el desarrollo de profundas alteraciones en los circuitos cerebrales de motivación y recompensa que persisten aún después de un periodo prolongado de desintoxicación. El correlato conductual de este establecimiento se observa a partir de persistentes recaídas, favorecidas por la experimentación subjetiva de un intenso deseo o ansia de consumo. Esta ansia puede ocurrir de manera espontánea o ser desencadenada por la abstinencia, la exposición a estímulos contextuales asociados al consumo e inclusive a estímulos estresantes no asociados al consumo (American Psychiatric Association, 2013).

Estos elementos constituyen un marco a partir del cual se puede entender mejor la enorme dificultad que le puede representar a un individuo el conseguir regular su consumo cuando ya ha desarrollado una adicción, puesto que, frecuentemente, el cese del consumo conlleva la experimentación de episodios intensos de estrés, a medida que se intensifican los síntomas de abstinencia. Además, el individuo puede estar expuesto, de manera intermitente, a contextos en los cuales previamente ocurrió el consumo. Es en estos últimos donde, por medio de procesos de aprendizaje asociativo, se crean relaciones entre los estímulos contextuales y los efectos hedónicos de las sustancias de abuso, que posteriormente favorecen la reincidencia, al desencadenar el ansia de consumo.

1.1 Diagnóstico Clínico

El diagnóstico clínico de los trastornos por consumo de sustancias está basado en la presentación de un patrón patológico de comportamiento alrededor del consumo de las siguientes sustancias de abuso, entre muchas otras:

- *Alcohol*
- *Tabaco*
- *Cannabis* (Marihuana, hashish)
- *Estimulantes* (Cocaína, anfetaminas)
- *Sedantes* (Barbitúricos, benzodiacepinas, carbamatos)
- *Opioides* (Morfina, heroína, oxicodona, fentanilo)
- *Alucinógenos* (Fenciclidina, ketamina, MDMA, DMT, LSD, psilocibina)
- *Inhalantes* (Tolueno e hidrocarburos volátiles)

Anteriormente, existía una clasificación específica para el “*abuso de sustancias*” y otra para la “*farmacodependencia*” (American Psychiatric Association, 1994). No obstante, en la edición actual del *Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales* se han reestructurado ambos conceptos para dar lugar a los *trastornos por consumo de sustancias* cuyo rango de severidad se clasifica en *leve, moderado y severo*.

Cada categoría corresponde a la presentación simultánea de un número específico de los siguientes criterios: la presencia de dos a tres sugiere un trastorno leve; de cuatro a cinco un trastorno moderado, y severo si se presentan más de seis.

- *Criterios sobre la Pérdida de Control en el Consumo*
 1. Consumo por tiempo o cantidad mayor al inicialmente planeado.
 2. Esfuerzos persistentes e infructuosos por disminuir o cesar el consumo.
 3. Exceso de tiempo invertido en la obtención, consumo o recuperación de los efectos de la sustancia de abuso.
 4. Experimentación de un intenso deseo o ansia de consumo que ocurre espontáneamente o por la exposición a contextos relacionados al consumo.

- *Criterios de Disfunción Social*
 5. Consumo recurrente conduce a problemas para cumplir con actividades laborales, escolares o en casa.
 6. Mantenimiento del consumo a pesar experimentar problemas sociales o interpersonales persistentes, ocasionados por el mismo.
 7. Interrupción o abandono de actividades sociales, ocupacionales o recreacionales importantes por el consumo.

- *Criterios de Consumo Riesgoso*
 8. Consumo recurrente en situaciones donde existe peligro físico.
 9. Mantenimiento del consumo a pesar de saber que el mismo ha ocasionado o exacerbado la persistencia de un problema físico o psicológico.

- Criterios Farmacológicos

10. Tolerancia; Incremento en la dosis de la sustancia de abuso para experimentar los efectos correspondientes a la dosis original.

11. Síndrome de Abstinencia; Aparición de síntomas de dependencia al observarse una disminución de la sustancia de abuso en los niveles sanguíneos.

La exposición crónica a ciertas sustancias de abuso provoca el desarrollo de un fuerte desequilibrio homeostático que induce la activación, a nivel celular, de mecanismos compensatorios cuya función consiste en amortiguar el impacto que producen estas sustancias en el cuerpo y que puede desembocar en un estado de “*dependencia física o fisiológica*”, caracterizado por la aparición de síntomas asociados a los fenómenos de tolerancia y el síndrome de abstinencia (Brunton, Chabner, & Knollmann, 2011; Carlson, 2013).

Cabe destacar que la sola aparición de síntomas de tolerancia o de abstinencia no es condición necesaria ni suficiente para el diagnóstico de un trastorno por consumo de sustancias, puesto que se ha observado en algunos individuos, un patrón compulsivo de consumo sin la presentación de tales síntomas. Por otro lado, también hay síntomas de dependencia fisiológica ocasionados por un tratamiento médico llevado correctamente, que no se acompañan de un patrón de consumo compulsivo (American Psychiatric Association, 2013).

1.2. Panorama Epidemiológico

El abuso en el consumo de sustancias tanto legales como ilegales constituye un problema de salud pública de enorme relevancia no sólo en México, sino también a nivel internacional.

Para abordar el tema y enriquecer el trasfondo de las siguientes aseveraciones epidemiológicas, es pertinente hacer énfasis en que el término *sustancias de abuso* no se refiere exclusivamente a las drogas ilícitas, sino que también abarca a productos

legales como las distintas presentaciones de alcohol, tabaco y ciertas sustancias inhalables, así como una variedad de medicamentos con potencial de abuso.

Comúnmente se habla de las “*drogas*” a partir de esquemas de clasificación legales que no necesariamente corresponden a una clasificación estrictamente científica que dé prioridad a las propiedades farmacológicas y los efectos cognitivos y conductuales correspondientes a cada caso (*Controlled Substance Act*, 1970). Esto ha favorecido un entendimiento superficial acerca de qué son las sustancias de abuso y en qué consiste el abuso en su consumo, además de enfocar el problema de las adicciones principalmente sobre las drogas de mayor exposición mediática, como es el caso de la marihuana, cocaína y heroína.

Es necesario replantear el empleo y el matiz que ha adquirido el término *drogas* en los discursos informativos, de divulgación y de prevención de las adicciones, o inclusive sustituirlo por el de *sustancias de abuso* –un término que incorpora al alcohol, tabaco y medicamentos con potencial de abuso– con el fin de estructurar un lenguaje más preciso que contribuya a una mejor apreciación del problema de las adicciones.

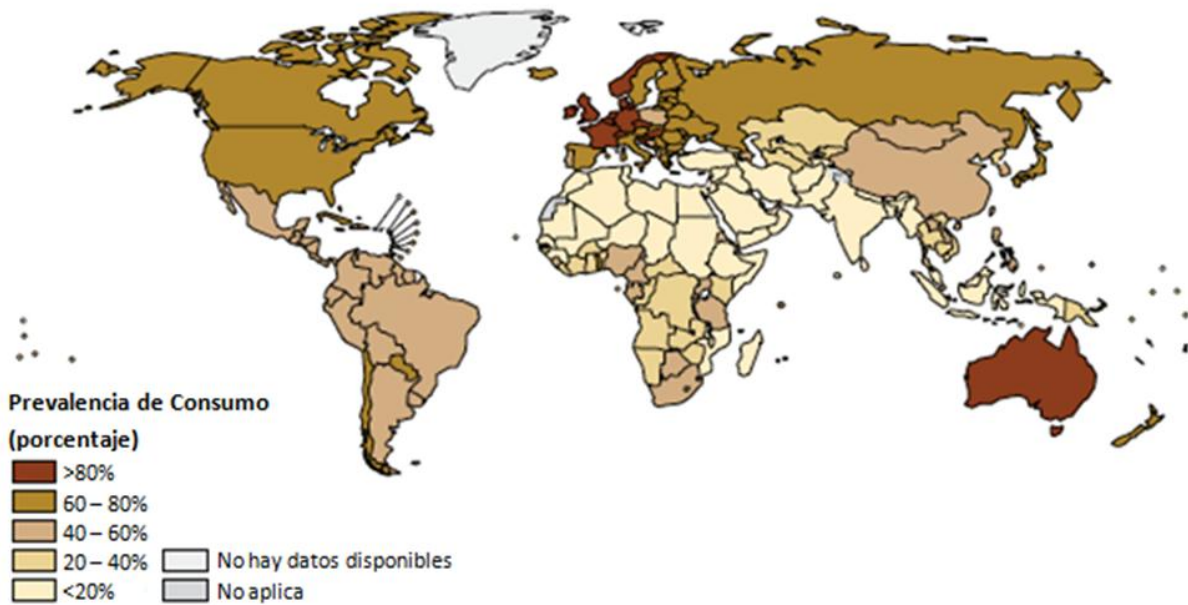
1.2.1 Datos Internacionales

Recientemente, a través del *Sistema Global de Información sobre el Alcohol y la Salud*, la *Organización Mundial de la Salud* estimó que en el año 2010, 38.3 % de la población mundial¹ consumió algún tipo de bebida alcohólica, cifra aún mayor en los continentes americano y europeo, donde el aproximado ascendió hasta el 61.5 % y 66.4 %, respectivamente (Figura 1; World Health Organization, 2014). En el caso de México, la estimación fue del 56.9 %², situando al país cerca de la media continental, pero muy por encima de la media global. Esta última cifra indica que el consumo de alcohol es una práctica bastante común en la población mexicana actual.

¹ Esta estimación solo contempla a la población mundial por encima de los 15 años de edad (World Health Organization, 2014).

² Esta estimación solo contempla a la población mexicana por encima de los 15 años de edad (World Health Organization, 2014).

Panel A | Mapa mundial de prevalencia de consumo de alcohol durante 2010



Panel B | Porcentaje de consumidores de alcohol, ex consumidores y abstemios vitalicios durante 2010

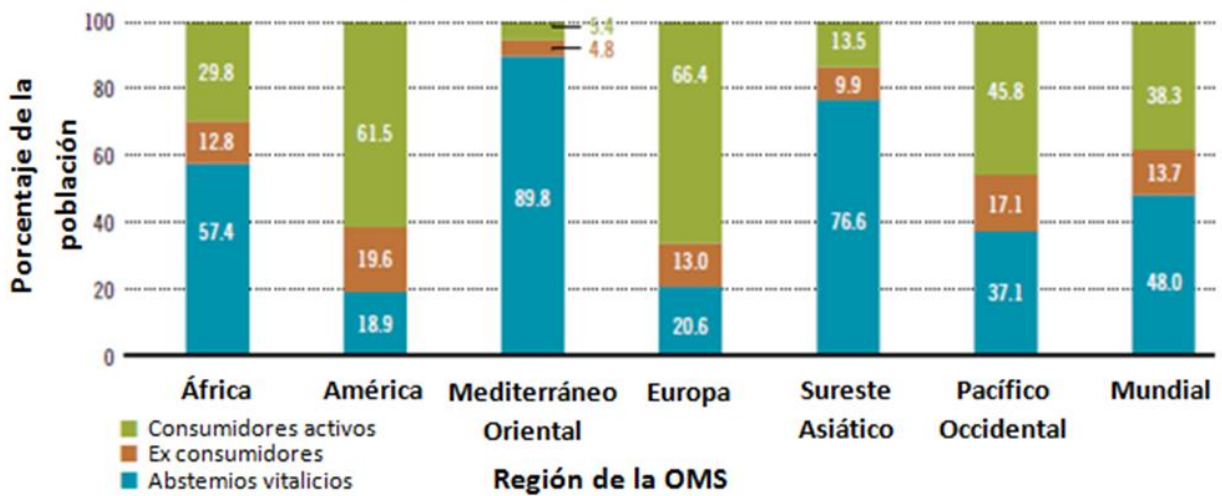


Figura 1. *Panel A:* Mapa mundial de prevalencia de consumo de alcohol durante el año 2010. *Panel B:* Porcentaje mundial y por región de la OMS de consumidores de alcohol, ex consumidores y abstemios vitalicios, en el mismo periodo (modificada de World Health Organization, 2014).

En cuanto a la cantidad ingerida, se calculó que el consumo de alcohol per cápita (CApc) mundial fue de 6.2 litros de alcohol puro al año. Los niveles más altos de consumo de alcohol nuevamente se encontraron en los continentes americano y europeo, con 8.4 y 10.9 litros al año, respectivamente.

No obstante, al realizar este cálculo exclusivamente en relación al número de consumidores activos en ese periodo, los datos revelan que en realidad el CApc promedio mundial fue de 17.2 litros y que regiones como África y el Sureste Asiático alcanzaron consumos de 19.5 y 23.1 litros, superando a los consumos de 13.6 y 16.8 litros de alcohol puro, registrados en América y Europa (Figura 2). En México, el CApc de toda la población fue de 7.2 litros, aumentando hasta 12.7 litros al considerar solo a los consumidores.

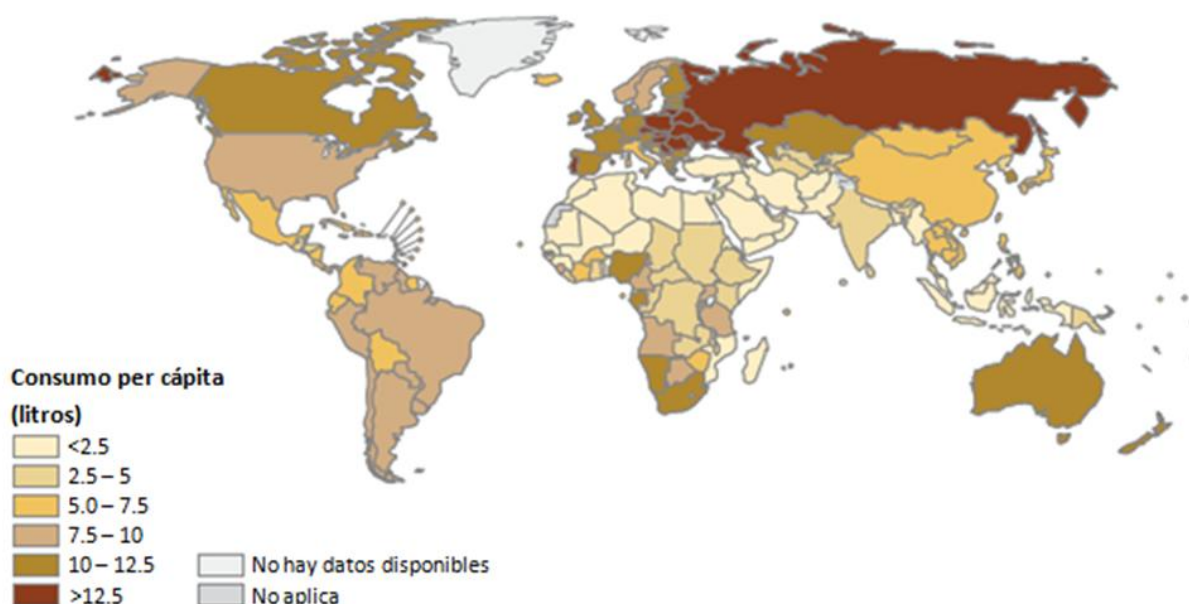
Se considera que el abuso en el consumo de alcohol constituye un grave problema para la salud debido a que, mientras que el consumo de alcohol en bajas cantidades posee algunas cualidades benéficas³, el consumo en altas cantidades resulta particularmente dañino y desvanece cualquier beneficio que hubiera podido ofrecer de otra forma (World Health Organization, 2014). Adicionalmente, se ha identificado un patrón específico de consumo tipo atracón (PCA) donde ocurre la ingesta de grandes cantidades de alcohol en lapsos cortos de tiempo⁴.

La prevalencia de este patrón fue estimada en el 7.5 % de la población, correspondiente al 16% de los consumidores a nivel mundial, donde destacaron nuevamente los continentes americano y europeo, con prevalencias del 13.7 % y 16.5 % de sus poblaciones, que correspondieron al 22 % y 22.9 % de los consumidores locales (Figura 2). En México se estimó una prevalencia de PCA en 12.1 % de la población, cifra que representó al 21.2 % de los consumidores, es decir, que 1 de cada 5 consumidores beben de esta manera.

³ Se ha reportado que el consumo de alcohol en bajas cantidades posee efectos benéficos ante la *diabetes mellitus* y protectores ante ciertas enfermedades cardiovasculares (World Health Organization, 2014).

⁴ Este patrón se caracteriza por el consumo de al menos 60g de alcohol puro en una sola exhibición, en los últimos 30 días (World Health Organization, 2014).

Panel A | Mapa mundial de consumo de alcohol per cápita durante 2010



Panel B | Consumo de alcohol per cápita promedio y prevalencia del patrón de consumo tipo atracón durante 2010

Región de la OMS	Población Total		Consumidores Activos	
	CApc (litros)	Prevalencia de PCA (porcentaje)	CApc (litros)	Prevalencia de PCA (porcentaje)
África	6.0	5.7	19.5	16.4
América	8.4	13.7	13.6	22.0
Mediterráneo Oriental	0.7	0.1	11.3	1.6
Europa	10.9	16.5	16.8	22.9
Sureste Asiático	3.4	1.6	23.1	12.4
Pacífico Occidental	6.8	7.7	15.0	16.4
Mundial	6.2	7.5	17.2	16.0

Figura 2. *Panel A:* Mapa mundial de consumo de alcohol per cápita durante el año 2010. *Panel B:* Consumo de alcohol per cápita promedio y prevalencia del patrón de consumo tipo atracón, mundial y por región de la OMS, en el mismo periodo. Los estimados comprenden a la población mayor de 15 años de edad. CApc: consumo de alcohol per cápita; PCA: patrón de consumo tipo atracón (modificada de World Health Organization, 2014).

En este mismo informe, se estimó una prevalencia de trastornos por consumo de alcohol en 4.1 % de la población mundial, siendo nuevamente aún mayor en los continentes americano y europeo, con 6.0 % y 7.5 % respectivamente (Figura 3). No se reportó esta cifra en relación al número de consumidores activos ni en relación al PCA. No obstante, considerando los datos disponibles, la prevalencia de trastornos podría afectar al 10.7 % de los consumidores en todo el mundo y ser aún mayor en aquellos individuos con PCA.

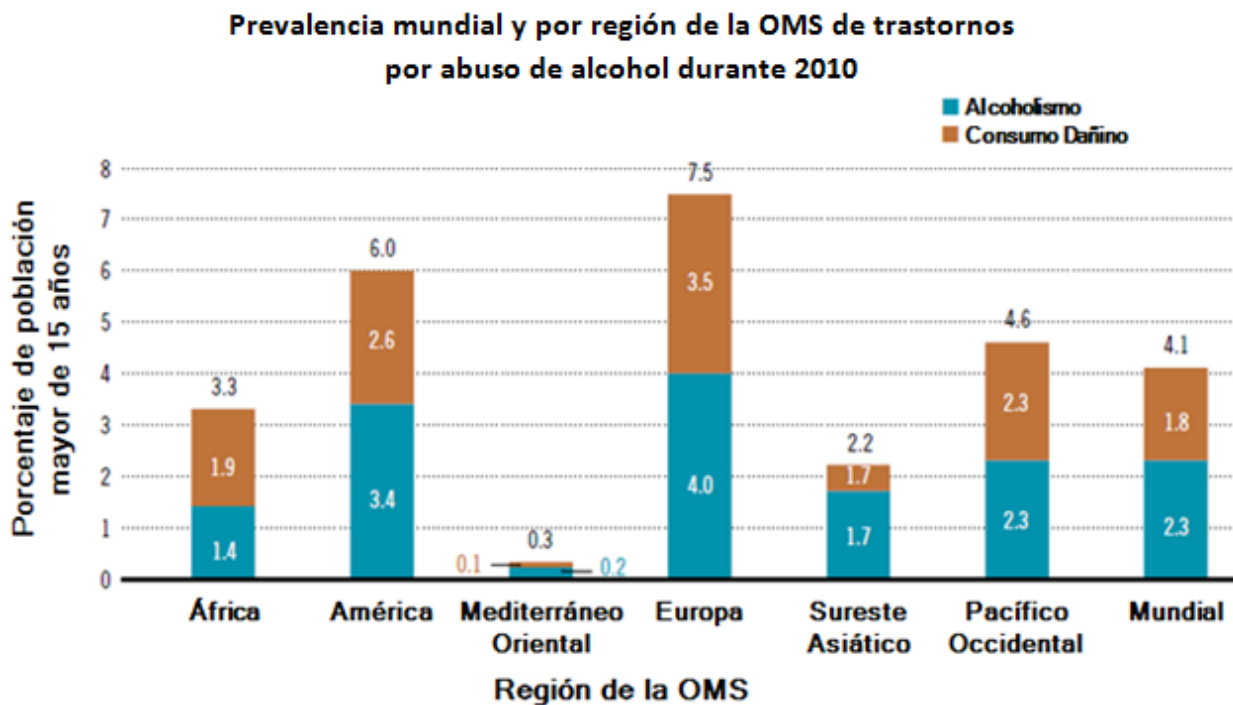


Figura 3. Prevalencia mundial y por región de la OMS de trastornos por abuso de alcohol durante el año 2010. La prevalencia de estos trastornos resulta de la suma de la prevalencia del consumo dañino⁵ y prevalencia de alcoholismo según los criterios del ICD-10 (modificada de World Health Organization, 2014).

Además, se señaló que el abuso en el consumo de alcohol fue responsable de al menos 3.3 millones de muertes en el año 2012, equivalente al 5.9 % de la tasa de mortalidad de ese año, en todo el mundo. Este dato superó la proporción, en conjunto,

⁵ El consumo dañino se refiere a aquel patrón de consumo de alcohol que desemboque en algún daño físico (cirrosis hepática) o mental (episodios depresivos) en el consumidor.

de todas las muertes ocasionadas por VIH/SIDA (2.8 %), violencia (0.9 %) o tuberculosis (1.7 %) en ese mismo periodo.

En el caso del tabaco, de acuerdo con información del *Sistema de Vigilancia Mundial de Tabaco*, se estima que el número de consumidores de tabaco⁶ asciende a 879 millones (721 millones de hombres y 158 millones de mujeres), cifra que equivale al 30 % de la población adulta de los 22 países donde se ha implementado este sistema (Asma et al., 2015). Sin embargo, datos de la OMS señalan que el número de consumidores asciende hasta 1100 millones de personas (World Health Organization, 2016).

La OMS estimó que durante el año 2004, más de 5 millones de personas⁷ perdieron la vida por causas derivadas del consumo y exposición al humo de tabaco al que se le atribuye una fracción de las muertes ocasionadas por distintos tipos de cáncer, tuberculosis y una serie de enfermedades tanto respiratorias como cardiovasculares (Tabla 1; World Health Organization, 2012). En este mismo reporte, se indicó que alrededor del 12 % del total de muertes de ese año se atribuyeron al tabaco, cifra que alcanzó el 16 % en los continentes americano y europeo, y el 7 % en el caso de México.

En el marco del actual *Informe Mundial sobre las Drogas* –que redacta la *Oficina contra las Drogas y el Delito de la Organización de las Naciones Unidas*– se estima que alrededor de 247 millones de personas, correspondientes al 5.2 % de la población mundial⁸, consumieron alguna droga⁹ durante el año 2014 y que cerca de 12 % de ellos –29.5 millones de individuos– padecieron de trastornos por consumo de éstas sustancias (Figura 4; United Nations Office on Drugs and Crime, 2016). Esto significa que 1 de cada 20 personas en todo el mundo consumió alguna droga durante ese lapso y que aproximadamente 1 de cada 8 usuarios sufrieron problemas derivados de su consumo.

⁶ Esta estimación solo contempla a la población por encima de los 15 años de edad de los 22 países que participan en el Sistema de Vigilancia Mundial de Tabaco (Asma et al., 2015).

⁷ Esta estimación solo contempla a la población por encima de los 30 años de edad (World Health Organization, 2012).

⁸ Esta estimación solo contempla a la población mundial en el rango de los 15 a 64 años de edad (United Nations Office on Drugs and Crime, 2016).

⁹ En este reporte, el término *droga* se refiere exclusivamente a las sustancias reguladas por las convenciones internacionales de control de drogas. No se incluye al alcohol ni al tabaco.

Causa de Muerte		Mundial (%)	América (%)	México (%)
Cáncer	Todo tipo	22	26	11
	Pulmón, tráquea y bronquios	71	84	60
Tuberculosis		7	6	4
Enfermedades Respiratorias	Todo tipo	36	51	40
	EPOC	42	71	54
	Infecciones Respiratorias	12	19	10
Enfermedades Cardiovasculares	Todo tipo	10	15	4
	Cardiopatía Isquémica	12	16	5
	Evento Cerebrovascular	7	11	4
Total		12	16	7

Tabla 1. Porcentaje de muertes atribuidas al consumo de tabaco, durante el año 2004. Estimadas a partir de datos de la población por encima de los 30 años de edad. EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica (integrada de World Health Organization, 2012).

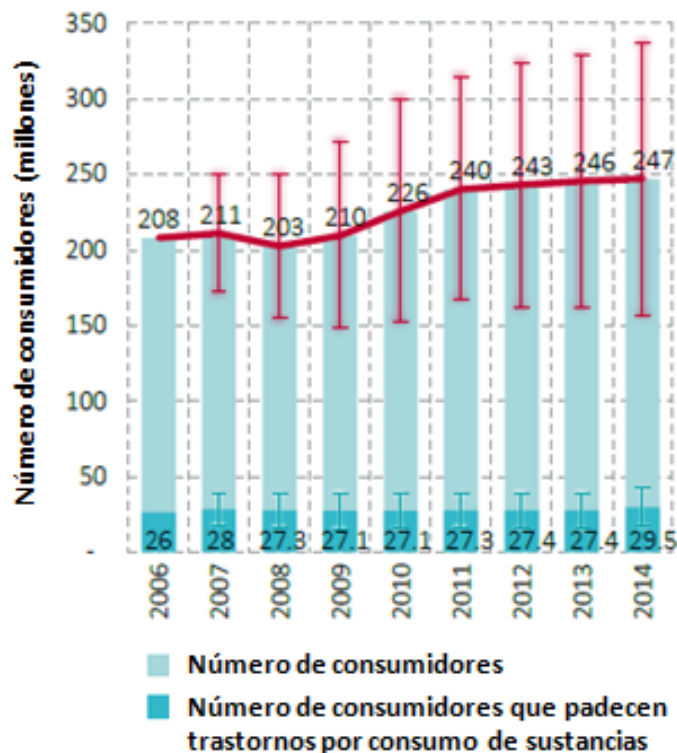
A pesar de que la tendencia promedio de consumo mundial de sustancias se ha estabilizado recientemente, el número absoluto de consumidores y dependientes ha continuado aumentando a la par del crecimiento demográfico.

En el mismo reporte se señaló que las sustancias de mayor consumo a nivel mundial fueron, en primer lugar la cannabis –con 183 millones de consumidores– y en segundo lugar las anfetaminas. No obstante, esta jerarquía no necesariamente se cumple al realizar un análisis por regiones geográficas específicas.

Una de las regiones con mayores índices al respecto es América del Norte¹⁰, de donde se calcula que proviene casi una cuarta parte de las muertes asociadas al consumo de sustancias ilícitas y la cual presenta la mayor tasa de mortalidad por millón de habitantes, por la misma razón (Tabla 2; United Nations Office on Drugs and Crime, 2016).

¹⁰ Aunque culturalmente México pertenece a Latinoamérica, geográficamente y para fines de la ONU, las cifras mexicanas se incluyen en la región de América del Norte (United Nations Office on Drugs and Crime, 2016).

Panel A Cantidad estimada de consumidores de drogas entre 2006 y 2014



Panel B Prevalencia estimada de consumo de drogas entre 2006 y 2014

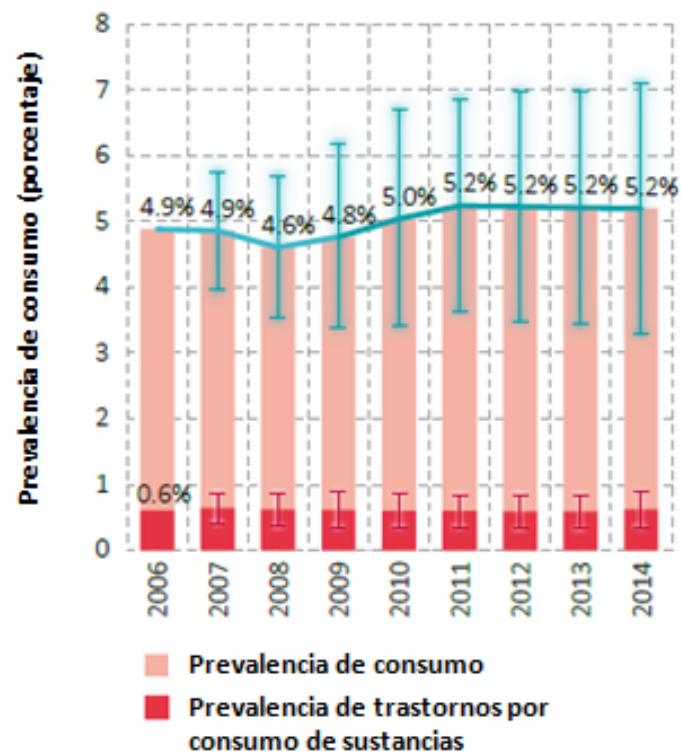


Figura 4. *Panel A:* Cantidad estimada de consumidores de drogas de 2006 a 2014. *Panel B:* Prevalencia estimada de consumo de drogas en el mismo periodo. Ambos estimados comprenden a la población mundial entre los 15 y 64 años de edad (modificada de United Nations Office on Drugs and Crime, 2016).

Tasas de mortalidad y número estimado de muertes relacionadas al consumo de drogas, por región geográfica, durante 2014

	Tasa de mortalidad asociada a drogas por millón de habitantes	Número estimado de muertes asociadas a drogas
África	61.9	39,200
América del Norte	164.5	52,500
Latinoamérica y el Caribe	15.6	5,200
Asia	29.6	85,900
Europa Central y Occidental	28.9	9,200
Europa Oriental y Sudoriental	55.9	12,700
Oceanía	101.5	2,500

Tabla 2. Tasas de mortalidad y número estimado de muertes relacionadas al consumo de drogas, por región geográfica, durante el año 2014. Las tasas de mortalidad fueron estimadas a partir de datos de la población comprendida entre los 15 y 64 años de edad (modificada de United Nations Office on Drugs and Crime, 2016).

1.2.2. Datos Nacionales

En México también se han llevado a cabo estudios al respecto. Los resultados de la *Encuesta Nacional de Adicciones 2011* (ENA 2011) señalaron que en ese año 55.7 % de la población mexicana¹¹ consumió algún tipo de bebida alcohólica y que 36.5 % mantuvo un patrón alto de consumo¹² (Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Instituto Nacional de Salud Pública, & Secretaría de Salud, 2012a).

¹¹ Este estimado corresponde al segmento de población entre los 18 y 65 años de edad (Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz et al., 2012a).

¹² Este indicador consiste en el consumo de al menos 4 copas de alcohol por exhibición, en el caso de las mujeres y 5 copas en el caso de los hombres, en los últimos 12 meses (Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz et al., 2012a).

Adicionalmente, este estudio reportó un aumento sostenido de los índices de dependencia que han llegado hasta el 6.6 %, cifra que corresponde a más de 4.3 millones de mexicanos.

Estos resultados fueron reportados en relación a la población mexicana adulta total, independientemente del número real de consumidores, por lo que se desconoce hasta donde llegó realmente la prevalencia del patrón de consumo alto entre los consumidores de ese periodo.

Se deben de tomar con cautela las interpretaciones comparativas entre la prevalencia del patrón de consumo tipo atracón descrito en el informe de la OMS (2014) y el patrón de consumo alto de la ENA 2011, ya que ambos indicadores carecen de compatibilidad debido a que el primero está calculado a partir del último mes previo al estudio, mientras que el segundo está calculado desde 1 año antes de la entrevista y por ende tendería a ser mayor. No obstante, los indicadores de dependencia análogos resultan más próximos y su comparación revela que los datos recabados por la ENA 2011 denotan mayores índices de alcoholismo de los estimados previamente por la OMS (Figura 5).

Datos de encuestas anteriores sostienen que las tendencias de consumo y dependencia al alcohol han aumentado significativamente en la última década. Dichos aumentos se han observado en los distintos niveles de consumo (alguna vez en la vida, en el último año, en el último mes) tanto en hombres como en mujeres, independientemente de si son adultos o adolescentes (Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz et al., 2012a).

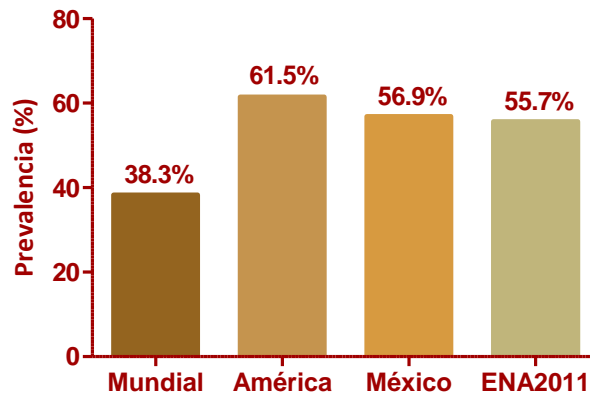
En el caso del tabaco, se estimó que 23.6 % de la población adulta¹³, correspondiente a 15.6 millones de mexicanos, fueron fumadores activos¹⁴ y 10.3 % se clasificaron como fumadores diarios (6.8 millones). Se reportó que 11.8 % del total de fumadores activos (1.8 millones) padecieron un alto nivel de tabaquismo (Instituto Nacional de Psiquiatría

¹³ Este estimado comprende a la población mexicana entre los 18 y 65 años de edad (Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz et al., 2012c).

¹⁴ Consumidor que refirió haber fumado tabaco en al menos una ocasión durante el último año (Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz et al., 2012c).

Ramón de la Fuente Muñiz, Instituto Nacional de Salud Pública, & Secretaría de Salud, 2012c). Datos de encuestas anteriores señalan que las prevalencias de consumo y dependencia se han mantenido constantes entre 2008 y 2011.

Panel A | Prevalencia de Consumo de Alcohol en la Población Adulta



Panel B | Prevalencia de Consumo tipo Atracón y Dependencia en Consumidores de Alcohol

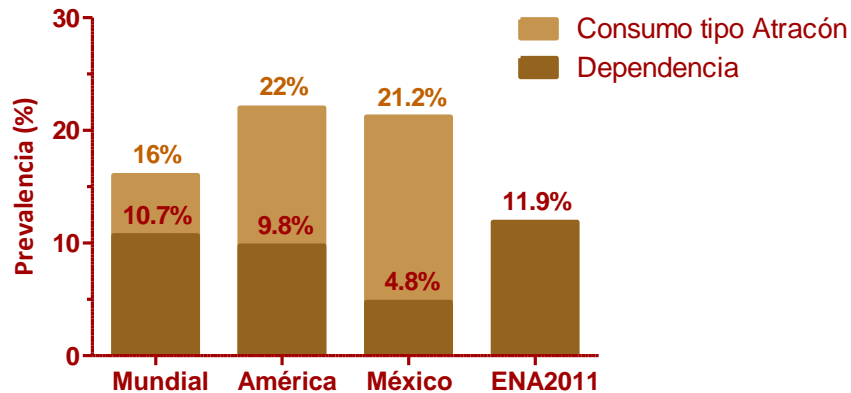


Figura 5. *Panel A:* Prevalencia de consumo de alcohol en la población adulta. *Panel B:* Prevalencia de consumo tipo atracón y dependencia en consumidores de alcohol. Ambos estimados comprenden a la población mundial mayor de 15 años de edad, en el caso de las primeras 3 columnas que corresponden a datos de la OMS. En el caso de la última columna, los estimados comprenden a la población mexicana entre los 18 y 65 años de edad y corresponden a datos de la ENA 2011. (integrada de Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz et al., 2012a; World Health Organization, 2014).

Con respecto a las drogas¹⁵, se reportó una prevalencia de consumo en el 2.8 % de la población adulta¹⁶ y se identificó que las sustancias de mayor consumo fueron marihuana y cocaína (Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Instituto Nacional de Salud Pública, & Secretaría de Salud, 2012b). Se estimó dependencia en 0.7 % de la población total¹⁷, que corresponde a un aproximado de 550 mil mexicanos. Destaca el aumento sostenido en las tendencias de consumo en la región norte del país, desde 2002 a 2011, donde los índices de dependencia también han aumentado significativamente.

Atendiendo a la población estudiantil mexicana de nivel medio y medio superior, la *Encuesta Nacional de Consumo de Drogas en Estudiantes* más reciente estimó que la prevalencia de consumo de cualquier sustancia de abuso se duplica (y en algunos casos específicos, se triplica) al pasar de secundaria a bachillerato, situándose en 25.1 % con respecto a los estudiantes que refirieron haber consumido en al menos alguna ocasión, 17.7 % en el último año y 9 % en el último mes (Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Comisión Nacional Contra las Adicciones, & Secretaría de Salud, 2015). Esto significa que 1 de cada 4 estudiantes de nivel bachillerato ha consumido alguna sustancia de abuso y 1 de cada 10 la ha consumido en el último mes.

En esta misma categoría, las sustancias de mayor consumo resultan ser, en primer lugar, la marihuana y, en segundo lugar, los inhalables. Los estados del país donde se registran mayores índices de consumo son el Estado de México, el Distrito Federal, Quintana Roo, Jalisco y Chihuahua.

Estos resultados son de especial importancia, debido a que los estimados son mucho mayores (prevalencia de consumo del 12.2 % en el último año) a los reportados en la ENA más reciente (prevalencia de consumo del 1.6 %), sobre el mismo segmento de población adolescente (12 a 17 años). Además de que su análisis permite anticipar

¹⁵ Esta categoría engloba a las sustancias ilícitas y a los medicamentos con potencial de abuso cuyo consumo se realiza fuera de prescripción o por mayor tiempo o cantidad indicada por el médico.

¹⁶ Este estimado comprende a la población mexicana entre los 18 y 65 años de edad (Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz et al., 2012b).

¹⁷ Este estimado comprende a la población mexicana entre los 12 y los 65 años de edad (Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz et al., 2012b).

fenómenos alrededor del consumo de sustancias de abuso que posteriormente podrían hacerse evidentes en la población general.

En materia económica, tan sólo en el último sexenio, se realizó una inversión monetaria estimada en más de 6 mil 600 millones de pesos destinados a la prevención y tratamiento de las adicciones. Sin embargo, el costo real es mucho mayor, debido a que el abuso en el consumo de alcohol, tabaco y sustancias ilícitas, especialmente aquellas que se administran mediante una inyección, incrementa el riesgo de comorbilidad del desarrollo de enfermedades cardiovasculares, cáncer, hepatitis B y C, cirrosis hepática, VIH/SIDA, trastornos psiquiátricos, pancreatitis, entre otros (Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz et al., 2012b).

Con base en lo anteriormente expuesto, se considera de suma importancia la inversión de mayores esfuerzos dedicados a la investigación acerca de las condiciones dentro de las cuales ocurre el desarrollo y se favorece el mantenimiento de las adicciones, así como al estudio científico de los cambios neurobiológicos, cognitivos y conductuales asociados a dicho fenómeno. El propósito consiste en enriquecer el abordaje conceptual y mejorar los mecanismos de prevención y tratamiento de las adicciones, así como disminuir el costo económico y de salud que éstas suponen a la sociedad.

2. Marco Teórico

En el campo de la investigación científica se recurre a modelos animales como herramientas de aproximación a los factores que están implicados en ciertos fenómenos de interés. El desarrollo y el mantenimiento de las adicciones no son la excepción.

Aunque ningún modelo engloba completamente todas las características que se observan en un fenómeno, sí reflejan distintas variables que pueden ser objetos de estudio y experimentación (Koob, Arends, & Le Moal, 2014).

En el siguiente apartado se realizará una breve descripción de los principios teóricos que sustentan al modelo que se utilizó en esta investigación.

2.1. Condicionamiento Clásico

El paradigma de condicionamiento clásico o pavloviano se apoya en la capacidad que poseen los organismos para detectar regularidades en el ambiente, relacionadas a eventos importantes (Staddon, 1983). La estructura de esta forma de aprendizaje asociativo se vale de dos tipos de estímulos que se definen de la siguiente forma: en primer lugar, un estímulo con propiedades motivacionales relevantes que se denomina estímulo incondicionado (EI) y cuya reacción se denomina respuesta incondicionada (RI) y en segundo lugar, un estímulo con propiedades motivacionales menores o nulas que se denomina estímulo neutro (EN).

En un procedimiento estándar, la presentación de un EN antecede a la de un EI de manera tal que, después de una serie de repeticiones y si esto ocurre de manera regular, el EN adquirirá valor predictivo y fungirá como señal que anuncia al EI. Al haberse establecido el condicionamiento, la presentación del EN –ahora llamado estímulo condicionado (EC)– bastará para desencadenar una respuesta condicionada (RC) que consiste en una reacción similar o anticipatoria a la que originalmente ocasionaba el EI (Domjan, 2014; Mazur, 2012; Staddon, 1983).

Existen varios modelos experimentales que se basan en este tipo de aprendizaje, entre los que se encuentran el condicionamiento al miedo, el condicionamiento de aversión al sabor, el condicionamiento de preferencia o aversión al lugar. Para fines de esta investigación, se hará énfasis exclusivamente en el condicionamiento de preferencia de lugar.

2.2. Condicionamiento de Preferencia de Lugar

La técnica de condicionamiento de preferencia de lugar (o CPP por sus siglas en inglés) es un ejemplo de condicionamiento clásico donde el EN consiste en la combinación de una serie de características contextuales específicas, presentes en un espacio físico determinado, mientras que el EI consta de la presentación de algún estímulo con ciertas propiedades motivacionales como, por ejemplo: la administración sistémica de algún fármaco psicoactivo, el acceso a agua o alimento a animales que han sido privados de ello, la presentación de objetos novedosos e incluso el acceso a una pareja receptiva, de forma tal que la RI radica en una manifestación conductual específica, que depende del estímulo con el cual llevó a cabo el condicionamiento (Cunningham, Gremel, & Groblewski, 2006; Tzschentke, 2007).

En roedores, habitualmente se utilizan aparatos compuestos por dos compartimentos separados por una compuerta de acceso o un tercer compartimento intermedio de menor dimensión. Cada uno de estos compartimentos se distingue por características visuales, auditivas, táctiles u olfativas específicas (Domjan, 2014; Koob & Le Moal, 2006; Tzschentke, 2007).

En este procedimiento, inicialmente se cuantifica el tiempo que el roedor pasa en cada compartimento, en una sesión de libre acceso a todas las áreas. Posteriormente, se asigna la presentación del EI en uno de los compartimentos y en el otro se aplica un tratamiento control. Durante el transcurso de la fase de adquisición del condicionamiento, el acceso es restringido a un solo compartimento por sesión. Finalmente, en una segunda sesión de libre acceso, se evalúa el lapso de tiempo que los roedores permanecen en cada compartimento, como expresión conductual de la RC.

Este lapso se considera como un indicador del valor hedónico del EI, de manera que si el tiempo que permanece en el compartimento asociado a la presentación del EI ahora es mayor, se determina que el EI es recompensante, mientras que si resulta menor, se determina que es aversivo (Buccafusco, 2000; Cunningham et al., 2006; Koob & Le Moal, 2006).

Esta herramienta ha sido de gran utilidad para evaluar los efectos de la exposición crónica a distintos tipos de fármacos y determinar si poseen o no potencial de abuso en su consumo (Figura 6). Por ejemplo, se ha reportado en roedores, que la administración de un psicoestimulante como la cocaína induce una fuerte preferencia por el compartimento donde el tratamiento fue aplicado. Dicha RC se interpreta como la conducta de búsqueda de la experiencia placentera que produce el fármaco en el organismo. Este mismo resultado se ha observado con la administración de otras sustancias de abuso como etanol, nicotina, anfetamina, opioides, entre otras (Buccafusco, 2000; Tzschentke, 2007).

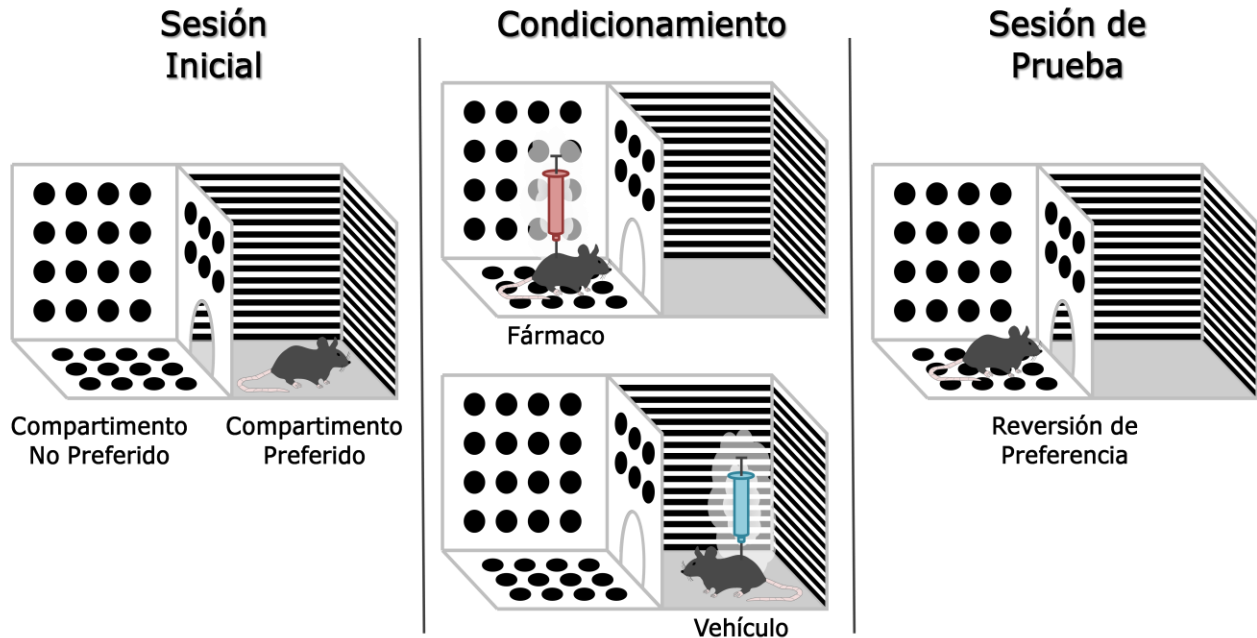


Figura 6. Esquema representativo del procedimiento estándar de CPP.

El CPP ofrece ventajas frente a otros procedimientos experimentales, entre las que destacan: su simplicidad metodológica, ya que no requiere equipo especializado que implique una inversión económica considerable y que un protocolo estándar permite obtener resultados en un corto lapso de tiempo (Cunningham et al., 2006).

El formato del modelo permite evaluar y diferenciar manipulaciones que afecten la adquisición del condicionamiento de aquellas que afecten la evocación y expresión de las respuestas condicionadas. Inclusive, la tarea permite detectar, durante la fase de adquisición, cambios en el desempeño conductual derivados de posibles alteraciones sensoriales o motoras ocasionados por la exposición, tanto aguda como crónica. Mientras que, en la fase de evocación permite evaluar las propiedades motivacionales condicionadas (recompensa o aversión) en ausencia de la exposición directa al fármaco, lo que hace posible separar el efecto de dichas alteraciones (Cunningham et al., 2006).

En la siguiente sección se mencionarán algunas de las vías y estructuras neurobiológicas relevantes, implicadas en la experiencia recompensante que se observa en este modelo.

2.3. Neurobiología de la Motivación y Sustancias de Abuso

A mediados del siglo XX, se reportó que primates no-humanos sometidos previamente a un tratamiento crónico de morfina para desarrollar dependencia física, estaban dispuestos a emitir una serie de conductas que resultarían en la administración de una nueva dosis de morfina, demostrando que la ocurrencia de este fenómeno no era exclusiva de los humanos (Spragg, 1940). A partir de ese reporte, otros grupos de investigación sentarían las bases técnicas y teóricas de los modelos de autoadministración modernos, al publicar los primeros estudios que demostraban que la autoadministración sistémica de morfina también provocaba el reforzamiento positivo de respuestas condicionadas en roedores con e inclusive sin dependencia física inducida (Headlee, Coppock, & Nichols, 1955; Kumar, Steinberg, & Stolerman, 1968; Weeks, 1962).

A la par de la línea de investigación anterior, se descubrió que la estimulación eléctrica de ciertas regiones del cerebro de ratas, a través de la implantación estereotáxica de electrodos, producía un aumento en las respuestas condicionadas (Olds & Milner, 1954). Dichos hallazgos plantearon la existencia de un sistema de estructuras neuronales interconectadas, vinculadas al fenómeno de recompensa que subyace al reforzamiento positivo. Este nuevo paradigma fue conocido como autoestimulación intracraneal y fue piedra angular de los primeros estudios sobre la neurobiología de la motivación (Carlezon & Chartoff, 2007).

Una serie de regiones cerebrales involucradas en el fenómeno de recompensa por medio de estimulación eléctrica –como es el caso del hipotálamo lateral (HL)–, corren a lo largo de un tracto denominado haz prosencefálico medial, que inerva a las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (o VTA por sus siglas en inglés) (Kandel, Schwartz, Jessell, Siegelbaum, & Hudspeth, 2013).

El VTA es el origen de los sistemas mesolímbico y mesocortical dopaminérgicos cuyas eferencias conducen, en el primer caso, a estructuras del sistema límbico, entre las que destaca el núcleo accumbens (NAc), y en el segundo caso, a regiones corticales como la corteza prefrontal (Figura 7; Carlson, 2013; Kandel et al., 2013).

Esta evidencia anatómica, sumada al hecho de que animales condicionados están dispuestos a trabajar más por la autoadministración intracraneal al estar bajo los efectos de una sustancia de abuso, establece un vínculo entre el reforzamiento positivo observado a través de la autoestimulación intracraneal y el reforzamiento positivo derivado de la autoadministración de drogas (Kandel et al., 2013).

Las sustancias de abuso poseen diferentes mecanismos de acción farmacológicos a través de los cuales ejercen sus efectos en el usuario (Tabla 3). Sin embargo, de manera común, coinciden en interactuar con el sistema mesolímbico dopaminérgico, ya sea de manera directa o indirecta (Kandel et al., 2013; Kuhar, 2012).

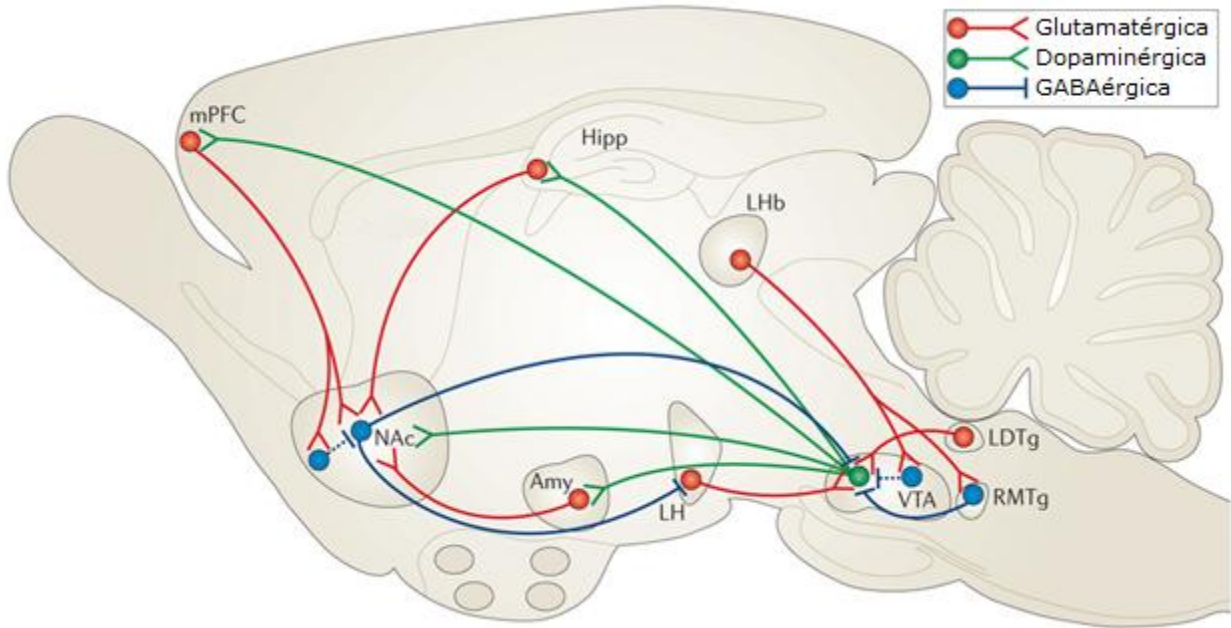


Figura 7. Esquema simplificado de la comunicación dopaminérgica, glutamatérgica y GABAérgica entre el VTA y el núcleo accumbens, en un corte sagital de cerebro de roedor (modificado de Russo & Nestler, 2013). mPFC; corteza prefrontal medial, Hipp; hipocampo, LHb; habénula lateral, NAc; núcleo accumbens, Amy; amígdala, LH; hipotálamo lateral, VTA; área tegmental ventral, LDTg; tegmentum lateral dorsal, RMTg; tegmentum rostral medial.

Las propiedades reforzantes de estas sustancias han sido asociadas a su capacidad para incrementar la liberación de dopamina en el estriado ventral, específicamente en el núcleo accumbens (Brunton et al., 2011; Carlson, 2013). Se argumenta que la actividad farmacológica de dichas sustancias “secuestra” las mismas vías y estructuras cerebrales de recompensa sobre las cuales opera la estimulación intracraneal y los reforzadores convencionales tales como el agua, el alimento y el sexo (Carlson, 2013; Kuhar, 2012; World Health Organization, 2004).

Por último, se ahondará sobre las características farmacológicas de la amfetamina, ya que es una sustancia de abuso capaz de inducir CPP (Tzschentke, 2007), y fue utilizada en la presente investigación.

Clasificación	Sustancias de Abuso	Blanco Molecular en el SNC
Opiáceos	Morfina / Heroína Oxicodona	Receptor μ -opioide
Psicoestimulantes	Nicotina	Receptor Nicotínico
	Cocaína Anfetamina	Transportador de Dopamina
Sedantes / Hipnóticos	Etanol	Receptor GABA _A Receptor NMDA
	Barbitúricos Benzodiazepinas	Receptor GABA _A
Canabinoides	Δ^9 -THC	Receptor CB ₁
Psicodélicos / Alucinógenos	Fenciclidina Ketamina	Receptor NMDA
	LSD MDMA DMT Mescalina Psilocibina	Receptor 5-HT ₂
Inhalantes	Tolueno	Inespecífico

Tabla 3. Clasificación de sustancias de abuso (integrada de Brunton et al., 2011; Kandel et al., 2013; Koob et al., 2014). GABA; ácido γ -aminobutírico, NMDA; N-metil-D-aspartato, Δ^9 -THC; Δ^9 -tetrahydrocannabinol, LSD; dietilamida de ácido lisérgico, MDMA; metilenedioximetanfetamina, DMT; dimetiltriptamina, 5-HT; 5-hidroxitriptamina.

2.4. Propiedades Farmacológicas de la Anfetamina

La α -metilfeniletilamina, mejor conocida como anfetamina, fue sintetizada por primera vez en el año de 1887 en la Universidad de Berlín, por el célebre químico rumano Lazăr Edeleanu, mejor conocido por haber inventado el método moderno de refinación de petróleo, que lleva su nombre. Sin embargo, no fue hasta 1927 que se describieron sus propiedades estimulantes, cuando el químico estadounidense Gordon Alles, la sintetizó de manera independiente, con el fin de desarrollar descongestionantes más eficaces (Fleckenstein, Volz, Riddle, Gibb, & Hanson, 2007; Sulzer, Sonders, Poulsen, & Galli, 2005).

Por milenios, la humanidad ha utilizado fuentes naturales de compuestos químicos similares a la anfetamina, como lo son la efedrina, la catinona y la mescalina, que se encuentran, respectivamente, en especies de plantas de los géneros *Ephedra* y *Acacia*, el arbusto *Catha edulis* y la cactácea endémica de México *Lophophora williamsii*, mejor conocida como peyote (Sulzer et al., 2005). Actualmente, la anfetamina y algunos de sus derivados continúan siendo recetados como tratamientos farmacológicos para atender una variedad de condiciones entre las que se encuentran el trastorno por déficit de atención, la narcolepsia y la obesidad (Berman, Kuczenski, McCracken, & London, 2009; Sulzer et al., 2005).

La feniletilamina es la molécula base de la anfetamina, cuya estructura química consiste en un anillo aromático de benceno y una cadena de etilaminas (Brunton et al., 2011). La anfetamina se ha descrito como un agente simpatomimético de acción indirecta, lo que significa que sus efectos emulan la activación del sistema nervioso simpático, a través de la liberación periférica de noradrenalina (Berman et al., 2009; Koob et al., 2014).

Debido a que presenta una similitud estructural con las monoaminas, entra a las neuronas a través del sistema de recaptura de monoaminas. Su mecanismo de acción principal consiste en estimular la liberación de monoaminas a través de la reversión de la acción de los transportadores de monoaminas y la inhibición de la recaptura, aunque existe evidencia que incorpora un segundo mecanismo que actúa a través de la liberación vesicular (Fleckenstein et al., 2007; Sulzer et al., 2005). Ambos mecanismos favorecen la liberación de neurotransmisores e inhiben su recaptura conforme a la siguiente jerarquía: noradrenalina \geq dopamina $>$ serotonina (Koob et al., 2014). Adicionalmente, actúa como inhibidor competitivo de las monoaminoxidasas (MAOs) y la presencia del grupo metilo en el carbono α le confiere resistencia ante la degradación enzimática por lo que su acción es prolongada (Berman et al., 2009; Brunton et al., 2011).

La anfetamina es metabolizada por vía hepática donde es deaminizada y convertida en fenilacetona, posteriormente oxidada a ácido benzoico y finalmente excretada en forma de glucoronida o conjugados de glicina (Koob & Le Moal, 2006).

3. Antecedentes

Descrita por primera vez hace más de 2 siglos, por Johann Christian Reil, padre de la psiquiatría alemana (Binder, Schaller, & Clusmann, 2007; Fusar-Poli, Howes, & Borgwardt, 2009), la corteza insular (CI) o ínsula se encuentra hendida por debajo del opérculo en lo profundo de la cisura lateral y está dividida en las siguientes subregiones clasificadas con base en su arquitectura celular y localización: ventral agranular, medial disgranular y dorsal granular (Figura 8; Standring, 2008). Esta región ha sido previamente implicada en el procesamiento de la memoria gustativa y de reconocimiento (Bermúdez-Rattoni, 2014).

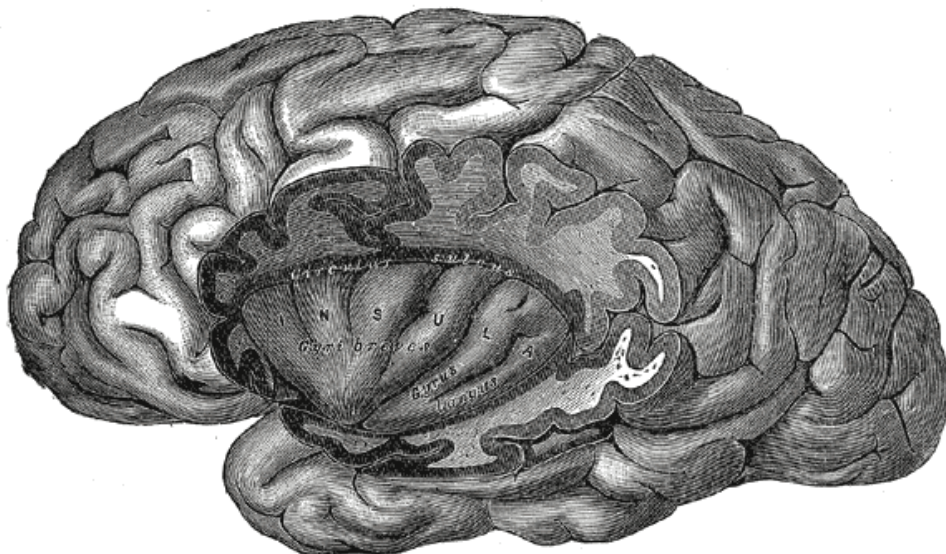


Figura 8. Esquema de la localización anatómica de la ínsula en el cerebro humano (Gray, 1918).

Estudios realizados en consumidores asiduos de distintas sustancias de abuso, donde se han implementado distintas técnicas de imagenología cerebral, han identificado una serie de estructuras que sufren cambios en su actividad a partir de la exposición a diversos estímulos asociados al consumo de sustancias, entre las cuales se encuentra la ínsula (Bonson et al., 2002; Brody et al., 2002; Garavan et al., 2000; Kilts et al., 2001; McClernon, Hiott, Huettel, & Rose, 2005; Sell et al., 1999, 2000; G. J. Wang et al., 1999; Z. Wang et al., 2007). En varios de ellos, inclusive se ha observado una correlación positiva entre la actividad de la corteza insular y la experiencia subjetiva del intenso deseo o ansia de consumo referido anteriormente (Tabla 4).

Referencia	Técnica de Imagenología	Sujetos	Observaciones
(Sell et al., 1999, 2000)	MRI / PET	10 Consumidores de heroína	Activación de la ínsula izquierda al observar un video representativo de consumo de heroína. Correlación positiva entre tal actividad y el ansia experimentada, así como el pulso cardíaco.
(G. J. Wang et al., 1999)	PET	13 Consumidores de cocaína	Activación de la ínsula al describir condiciones de su propio consumo. Correlación positiva entre tal actividad y el ansia experimentada.
(Garavan et al., 2000)	fMRI	17 Consumidores de cocaína y 14 controles saludables	Activación de la ínsula derecha en consumidores, al observar un video representativo de consumo de crack.
(Kilts et al., 2001)	PET	8 Consumidores de cocaína	Activación de la ínsula izquierda al evocar una situación autobiográfica de consumo. Correlación positiva entre tal actividad y el ansia experimentada.
(Bonson et al., 2002)	PET	11 Consumidores de cocaína	Correlación positiva entre la actividad de la ínsula posterior izquierda y el ansia inducida por un video representativo y parafernalia.
(Brody et al., 2002)	MRI / PET	20 Fumadores de tabaco y 20 controles saludables	Correlación positiva entre la actividad bilateral de la ínsula anterior y el ansia inducida por un video representativo y parafernalia.
(McClernon et al., 2005)	fMRI	16 Fumadores de tabaco	Activación de la ínsula al observar imágenes de parafernalia y personas fumando.
(Z. Wang et al., 2007)	MRI	14 Fumadores de tabaco	Correlación positiva entre la actividad de la ínsula y el ansia inducida por abstinencia.

Tabla 4. Relación de estudios clínicos de imagenología y la exposición a claves asociadas al consumo de sustancias de abuso. MRI; resonancia magnética, fMRI; resonancia magnética funcional, PET; tomografía por emisión de positrones.

A mediados de la última década, los inesperados resultados de una investigación clínica señalaron el papel fundamental que ejerce la ínsula en el mantenimiento del tabaquismo. En este notorio estudio se observó que la lesión de la CI, debido a un evento cerebrovascular, favoreció el cese súbito de consumo y previno la reincidencia, al mismo tiempo que se reportó una atenuación del ansia de consumo inducida por la abstinencia, en comparación a lesiones en otras regiones del cerebro (Naqvi, Rudrauf, Damasio, & Bechara, 2007).

Uno de los pacientes del estudio, al ser entrevistado acerca de las razones que tuvo para haber dejado de fumar, explicó que no había olvidado su historial como fumador, sino que, en sus propias palabras; “*mi cuerpo olvidó la necesidad de fumar*”. Sin haberse planteado dejar de fumar antes ni después del evento cerebrovascular, perdió espontáneamente cualquier interés por seguir fumando, sin experimentar ningún deseo o ansia de consumo a partir de este evento (Naqvi et al., 2007).

En años recientes, estas observaciones han sido corroboradas por otros estudios que han seguido un esquema y análisis similar. Los resultados de estos reportes señalan que los fumadores que sufrieron lesiones en las inmediaciones de la ínsula tuvieron una mayor probabilidad de dejar de fumar después del evento y permanecer en abstinencia, al mismo tiempo que presentaron una menor probabilidad de recaer en el consumo, en comparación a aquellos que sufrieron lesiones en otras áreas del cerebro (Abdollahi et al., 2015; Hefzy, Silver, & Silver, 2011; Suñer-Soler et al., 2012). Así mismo, las evaluaciones sobre el ansia subjetiva inducida por la abstinencia indican que estos pacientes experimentaron un menor grado de ansia y reportaron una mayor facilidad para dejar el consumo.

Para investigar las implicaciones del estudio de Naqvi y colaboradores (2007) en un modelo experimental, un grupo de investigadores recurrió al condicionamiento de preferencia de lugar inducido por la administración crónica de anfetamina. Se observó un aumento en la expresión de la proteína c-Fos¹⁸ en la ínsula granular posterior

¹⁸ c-Fos es una proteína de 55kDa perteneciente a la familia Fos y es producto de la transcripción del proto-oncogen c-fos. Este gen forma parte de los llamados *genes de expresión temprana*, cuya transcripción inicia a los pocos minutos de una estimulación y que regulan la transcripción de otros *genes de expresión tardía*. Se ha

durante la evocación del CPP. Posteriormente, inactivaron farmacológicamente dicha área –por medio de la administración intracerebral de lidocaína– y reportaron la inhibición inmediata de la preferencia de lugar condicionada (Contreras, Ceric, & Torrealba, 2007). Estos resultados demuestran que ocurre un aumento significativo en la actividad de la ínsula granular posterior durante la exposición a claves contextuales asociadas al consumo, sin la cual no se lleva a cabo la evocación del CPP, lo que corrobora la evidencia de los estudios clínicos. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos neurobiológicos mediante los cuales ocurre éste fenómeno.

Acerca de dichos mecanismos, recientemente se reportó que el antagonismo no selectivo de receptores muscarínicos en la misma región de la ínsula, bloqueó la evocación del CPP inducido por morfina. Un análisis más a fondo demostró que este resultado se observa al administrar antagonistas selectivos a los receptores muscarínicos M_1 , mientras que al antagonizar los receptores M_4 se registró una expresión exacerbada del CPP. Se encontraron los efectos contrarios al administrar agonistas selectivos a cada uno de dichos receptores (Wu et al., 2014).

Desde una aproximación distinta, a través de un modelo de condicionamiento operante, se observó que el antagonismo de los receptores orexinérgicos OX_1 en la ínsula granular es suficiente para ocasionar una disminución, dosis dependiente, de la autoadministración sistémica de nicotina cuando está disponible (Hollander, Lu, Cameron, Kamenecka, & Kenny, 2008). Sin embargo, esto no ocurrió cuando el reforzador era alimento, lo que sugiere un rol específico para el circuito de neurotransmisión orexinérgico de la ínsula granular en el mantenimiento del consumo de nicotina, ya que el tratamiento no afectó indiscriminadamente otro tipo de conductas motivadas.

En un estudio similar, además de corroborar la evidencia anterior, se reportó que después de un periodo de extinción, el bloqueo similar de receptores OX_1 en la ínsula granular posterior impidió el restablecimiento de la búsqueda de nicotina inducida por

observado que ocurre un aumento en la expresión de la proteína c-Fos después de una despolarización, la entrada de Ca^{2+} o la exposición a factores de crecimiento, por lo que este aumento se interpreta como marcador indirecto de actividad neuronal reciente (Kovács, 1998; Sheng & Greenberg, 1990).

un priming de nicotina o por la exposición a claves contextuales asociadas al consumo (Forget, Pushparaj, & Le Foll, 2010).

Existe evidencia contradictoria acerca de la participación de la CI durante el consumo de sustancias, puesto que previamente se ha reportado que la inactivación de la ínsula agranular dorsal no produce una disminución de la autoadministración de cocaína en roedores (Di Pietro, Black, & Kantak, 2006). No obstante, en este mismo estudio se corroboró la disminución de la búsqueda de cocaína después de la inactivación de la ínsula, durante la exposición a claves contextuales asociadas al consumo. Esto sugiere la existencia de diferencias funcionales correspondientes a las distintas subregiones de la CI, sobre el mantenimiento del consumo cuando éste se lleva a cabo o cuando se presentan estímulos contextuales relacionados al mismo.

Estos hallazgos indican que la actividad de la ínsula ejerce un papel clave en el mantenimiento de las adicciones, puesto que se demuestra que su lesión e inhibición indiscriminada es suficiente para cesar el consumo, presuntamente a través de la atenuación del ansia, y que la manipulación selectiva de circuitos de neurotransmisión locales como el orexinérgico y el colinérgico también tiene efectos sobre la conducta de búsqueda que se observa en respuesta a la exposición a claves asociadas al consumo, tanto en modelos de condicionamiento clásico, como de condicionamiento operante.

En una línea de investigación distinta, mediante la exposición de claves asociadas a la administración sistémica de cocaína a ratas sometidas a distintos lapsos de abstinencia, se registró una correlación positiva entre el número de respuestas al operando y el lapso de abstinencia, durante las fases de extinción y de restablecimiento de un protocolo de autoadministración (Grimm, Hope, Wise, & Shaham, 2001). Esta observación sugiere que a la par del incremento en el periodo de abstinencia, se desarrollan o “incuban” cambios en los procesos que subyacen a la conducta de búsqueda de sustancias como reforzadores, por ejemplo; el ansia de consumo. Al integrar estos resultados, nos preguntamos si se observarían incrementos en la actividad de la corteza insular en respuesta a claves asociadas al consumo, en función del sometimiento a periodos diferenciales de abstinencia, y si se observarían diferencias simultáneas en el patrón conductual del CPP.

4. Justificación

El abuso en el consumo de sustancias tanto legales como ilegales constituye un importante problema de salud pública que continúa creciendo, no sólo en México (Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz et al., 2012a, 2012b, 2012c) sino también a nivel internacional (Asma et al., 2015; United Nations Office on Drugs and Crime, 2016; World Health Organization, 2014).

Se sabe que entre las principales causas de reincidencia se encuentra la exposición a contextos relacionados al consumo y que dicho evento desencadena un intenso deseo o ansia de consumo (American Psychiatric Association, 2013). Sin embargo, aún queda por dilucidar cuáles son los mecanismos que subyacen dicha experiencia.

Dado que se ha observado reiteradamente una correlación entre la experimentación subjetiva del ansia de consumo y la activación de la ínsula en respuesta a estímulos relacionados al consumo (Bonson et al., 2002; Brody et al., 2002; Kilts et al., 2001; Sell et al., 2000; G. J. Wang et al., 1999; Z. Wang et al., 2007), es importante indagar en dicha actividad como aproximación a los procesos que subyacen a la reincidencia, con el fin de sentar nuevas bases teóricas para el tratamiento de las adicciones.

El CPP inducido por la exposición a sustancias de abuso es un modelo experimental compuesto de una fase de adquisición prolongada (Cunningham et al., 2006). No obstante, la evocación de dicho condicionamiento resulta muy puntual, lo que brinda la oportunidad de evaluar cambios en la expresión de dichas asociaciones no solo a nivel conductual, sino también en cuanto a la actividad neuroquímica y electrofisiológica que ocurre en ese momento.

Con base en la evidencia empírica que señala que la actividad de la ínsula está implicada en el mantenimiento de las adicciones (Contreras et al., 2007; Di Pietro et al., 2006; Forget et al., 2010; Naqvi et al., 2007; Wu et al., 2014) y en el fenómeno de la incubación de la búsqueda del consumo (Grimm et al., 2001), se pretende evaluar los cambios que pudieran observarse en el patrón conductual y de activación de dicha estructura, frente a periodos diferenciales de abstinencia, durante la evocación por exposición a claves contextuales asociadas al CPP inducido por anfetamina.

5. Objetivos

General

Determinar cambios en la preferencia de lugar condicionada y en la activación de la corteza insular en función del intervalo de abstinencia, durante la evocación del CPP inducido por la administración crónica de anfetamina, a través de la cuantificación inmunohistoquímica de la expresión de la proteína c-Fos.

Particulares

1. Evaluar el patrón conductual y la activación de la corteza insular a través de la cuantificación de la expresión de la proteína c-Fos que tuvo lugar durante la evocación del CPP, 1 día después de la última administración del tratamiento.
2. Evaluar el patrón conductual y la activación de la corteza insular a través de la cuantificación de la expresión de la proteína c-Fos que tuvo lugar durante la evocación del CPP, 10 días después de la última administración del tratamiento.

6. Hipótesis

Se observará una mayor preferencia por el compartimento asociado a la administración de anfetamina en el grupo sometido a 10 días de abstinencia en comparación al grupo con solo 1 día de abstinencia. Simultáneamente, se observará una mayor activación de la corteza insular a medida que se incrementa el periodo de abstinencia.

7. Método

7.1. Animales

Se utilizaron 16 ratones macho adultos de la cepa C57BL/6 provenientes del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Los roedores se mantuvieron en cajas individuales con agua y alimento *ad libitum*, a una temperatura controlada y en un ciclo estándar de luz/obscuridad. Las pruebas conductuales se realizaron durante la fase de luz. Los experimentos y protocolos fueron llevados a cabo con estricto apego a los lineamientos de Prácticas Científicas Adecuadas del Código de Ética del IFC.

7.2. Materiales

Se utilizaron 2 cajas de vinil acrílico de 43 cm de largo, 21.5 cm de ancho y 40 cm de altura, divididas por una compuerta en 2 compartimentos con patrones visuales monocromáticos distintos; rayas horizontales blancas y negras, y círculos negros sobre un fondo blanco¹⁹ (Figura 9). El registro conductual del condicionamiento se realizó a través de una videocámara conectada a una computadora. La cuantificación del tiempo se realizó manualmente, con ayuda de cronómetros. Se utilizó una dosis de 3.0 mg/kg de sulfato de d-anfetamina²⁰ (Sigma-Aldrich) diluida en solución salina al 0.9 % como vehículo. La administración se realizó por vía intraperitoneal, a un volumen de 10.0 mL/kg.



Figura 9. Patrones contextuales correspondientes a los compartimentos.

¹⁹ Este protocolo de CPP fue estandarizado previamente en el laboratorio y adaptado a partir de la metodología reportada en (Thanos et al., 2010). Los patrones fueron escogidos debido a que fueron claramente discriminados por los roedores, sin que se observara una preferencia drástica por alguno de los compartimentos.

²⁰ La dosis de d-anfetamina fue determinada con base en lo reportado en (Thanos et al., 2010; Tzschentke, 2007).

7.3. Procedimiento

7.3.1. Condicionamiento de preferencia de lugar

Los roedores fueron habituados a la manipulación realizada por parte del investigador y se registró la línea base de su masa corporal durante 3 días. Después fueron asignados, de manera aleatoria, a uno de dos grupos que siguieron el siguiente tratamiento:

Grupo ABS1

El protocolo de CPP que se utilizó constó de 10 días en total (Figura 10). Primero se realizó una prueba conductual previa al condicionamiento (PRETEST) con una duración de 10 minutos de libre acceso a ambos compartimentos para determinar su preferencia inicial. Después se asignó la administración de vehículo en el compartimento en el cual se permaneció más tiempo y de anfetamina en el cual se permaneció menos. A partir del siguiente día, se llevó a cabo una sesión diaria de 30 minutos por 8 días consecutivos, alternando de manera contrabalanceda entre la administración de vehículo o anfetamina. Finalmente se realizó una segunda prueba (POSTEST) 1 día después de la última sesión de condicionamiento para evaluar el tiempo que ocuparon en cada compartimento después del condicionamiento.

Grupo ABS10

Se siguió el mismo tratamiento, con la única diferencia de que el POSTEST se realizó 10 días²¹ después de la última sesión de condicionamiento.

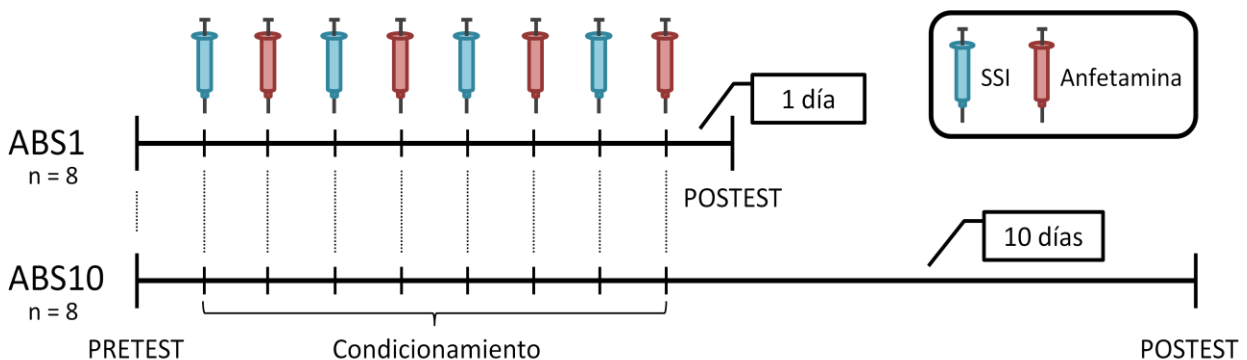


Figura 10. Esquema del experimento. SS/: solución salina isotónica

²¹ Se determinó realizar la prueba 10 días después de la última administración, siguiendo el protocolo de (Contreras et al., 2007).

A cada grupo se le asignó un total de 8 roedores. Los experimentos se llevaron a cabo en un cuarto cerrado, con temperatura e iluminación uniforme, así como ruido blanco constante. El equipo de condicionamiento se limpió y secó meticulosamente con una solución de etanol al 70 % entre cada ensayo, con el fin de eliminar cualquier rastro de olor.

7.3.2. Histología

Noventa minutos²² después de la prueba, se administró una dosis letal de pentobarbital sódico, seguida de una perfusión transcardial de 20 mL de solución salina al 0.9 % y 20 mL de formaldehído al 4 % en solución buffer de fosfatos 0.1 M y se extrajo el cerebro. Se fijó en formaldehído al 4 % durante una noche y se transfirió a una solución de sacarosa al 30% en PBS 0.1 M. Se utilizó un criostato para obtener rebanadas coronales de 40 µm de grosor que se mantuvieron en flotación en una disolución de azida de sodio al 0.02 % en solución buffer TBS 0.1 M hasta seleccionar los cortes deseados y someterlos a inmunohistoquímica.

7.3.3. Inmunohistoquímica

Las muestras en flotación se trataron con peróxido de hidrógeno al 0.6 % en TBS 0.1 M, después se bloquearon con suero de albúmina bovina al 2 % en TBS-T al 0.1 % y se incubaron con el anticuerpo primario rabbit anti-cFos (Santa Cruz Biotechnology, 1:500) durante 72 horas a una temperatura de 4 °C. A continuación se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado goat anti-rabbit (Vector Laboratories, 1:500) durante 2 horas. Posteriormente se utilizó el kit de detección VECTASTAIN Elite ABC (Vector Laboratories, 1:70) y se reveló mediante diaminobenzidina.

7.3.4. Cuantificación de c-Fos

Se obtuvieron fotografías digitales de la región de interés a través de una cámara digital *Nikon DXM1200F* acoplada a un microscopio óptico *Zeiss Axiostar plus* (Zeiss, Oberkochen, Alemania), con ayuda de una lente objetivo de 10x, 0.25 NA.

²² Se ha reportado que la proteína c-Fos tiene una vida media de aproximadamente 2 horas (Kovács, 1998).

La integración de fotografías se realizó a través de la aplicación *MosaicJ* del paquete *ImageJ* (Rasband, 2016) y la cuantificación de la inmunoseñal de c-Fos mediante la herramienta de análisis de partículas del mismo paquete.

Se estableció un umbral de intensidad uniforme para cada fotografía, con el objetivo de facilitar la detección de la inmunoseñal de c-Fos y amortiguar la presencia del fondo. La región de interés cuantificada corresponde a la porción posterior de la CI, ubicada a una distancia de 0.14 mm de bregma²³ en el eje antero-posterior (Figura 11; Franklin & Paxinos, 2007).

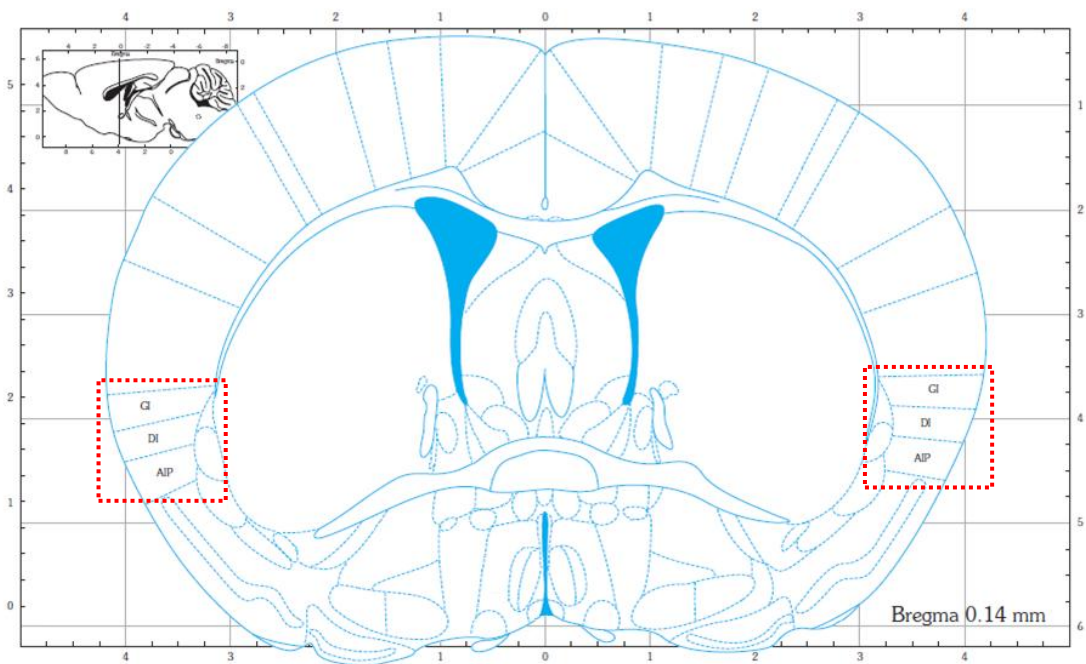


Figura 11. Representación de un corte coronal de un cerebro de ratón, 0.14 mm anterior a bregma. *GI*: ínsula granular, *DI*: ínsula disgranular, *AIP*: ínsula agranular posterior (modificada de Franklin & Paxinos, 2007).

7.4. Análisis de datos

El registro del tiempo de permanencia inicial en cada compartimento fue normalizado a un índice de preferencia en función de la duración total de la sesión. Ambas bases de datos fueron examinadas a través de un análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en

²³ Esta región de la CI fue seleccionada siguiendo la metodología reportada en (Contreras et al., 2007).

inglés) de 2 vías, donde los factores considerados fueron Grupo (ABS1 o ABS10) y Compartimento (Rayas o Círculos).

Un análisis posterior sobre el tiempo de permanencia en el compartimento asignado a la administración de anfetamina fue realizado mediante un ANOVA Mixto, donde los factores considerados fueron Grupo y Condicionamiento (PRETEST o POSTEST). Además se obtuvieron las diferencias de tiempo de permanencia en el compartimento asignado a la administración de anfetamina, antes y después del condicionamiento, en relación al compartimento control.

En cuanto a la actividad motora, se registró el número total de cruces, antes y después del condicionamiento, dividiendo cada compartimento en 2 mitades para un total de 4 rectángulos de superficie total. Se realizó la misma comparación por ANOVA Mixto para estos datos. Finalmente, la cuantificación de la expresión de la proteína c-Fos fue sometida a una *prueba t de Student no pareada*, donde se compararon ambos grupos.

8. Resultados

Al comparar la cantidad de tiempo de permanencia inicial en cada compartimento a través del ANOVA, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los mismos, donde los roedores pasaron un lapso mayor de tiempo en el compartimento de rayas ($F_{[1, 28]} = 15.73$, $p = 0.0005$, Figura 12). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los tiempos de ambos grupos ($F_{[1, 28]} = 0.00$, $p = 1.00$) ni en la interacción entre ambos factores ($F_{[1, 28]} = 2.06$, $p = 0.1625$). El análisis *post hoc* no reportó diferencias entre los grupos ($p > 0.05$). Esto indica que los roedores de ambos grupos se comportaron de manera similar, demostrando en promedio, una preferencia mayor por el compartimento con claves contextuales de rayas, en relación al compartimento de círculos. Este resultado concuerda con datos previos del laboratorio, correspondientes a la estandarización de esta tarea conductual.

Al comparar el tiempo de permanencia en el compartimento asignado a la administración de anfetamina, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los registros obtenidos antes y después del condicionamiento ($F_{[1, 14]} = 65.01$, $p < 0.0001$, Figura 13). No obstante, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($F_{[1, 14]} = 0.31$, $p = 0.5838$) ni en la interacción entre ambos factores ($F_{[1, 14]} = 0.96$, $p = 0.3443$). El análisis *post hoc* no observó diferencias entre los grupos ($p > 0.05$). Lo anterior indica que ocurrió una reversión de preferencias entre los compartimentos, causada por el condicionamiento y uniforme para ambos grupos, evidenciada por el aumento de tiempo invertido en el compartimento donde se experimentaron los efectos de la anfetamina y la disminución de tiempo en el compartimento control (Figura 14).

En cuanto a la actividad motora, el análisis reportó diferencias significativas entre el número de cruces observados antes y después del condicionamiento ($F_{[1, 14]} = 10.72$, $p = 0.0055$, Figura 15). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos ($F_{[1, 14]} = 0.04$, $p = 0.8360$) ni en la interacción entre ambos factores ($F_{[1, 14]} = 0.02$, $p = 0.8845$). El análisis *post hoc* no observó diferencias entre los grupos ($p > 0.05$). Esto indica que ocurrió un aumento de la actividad motora en consecuencia del tratamiento crónico con anfetamina, de manera uniforme para ambos grupos.

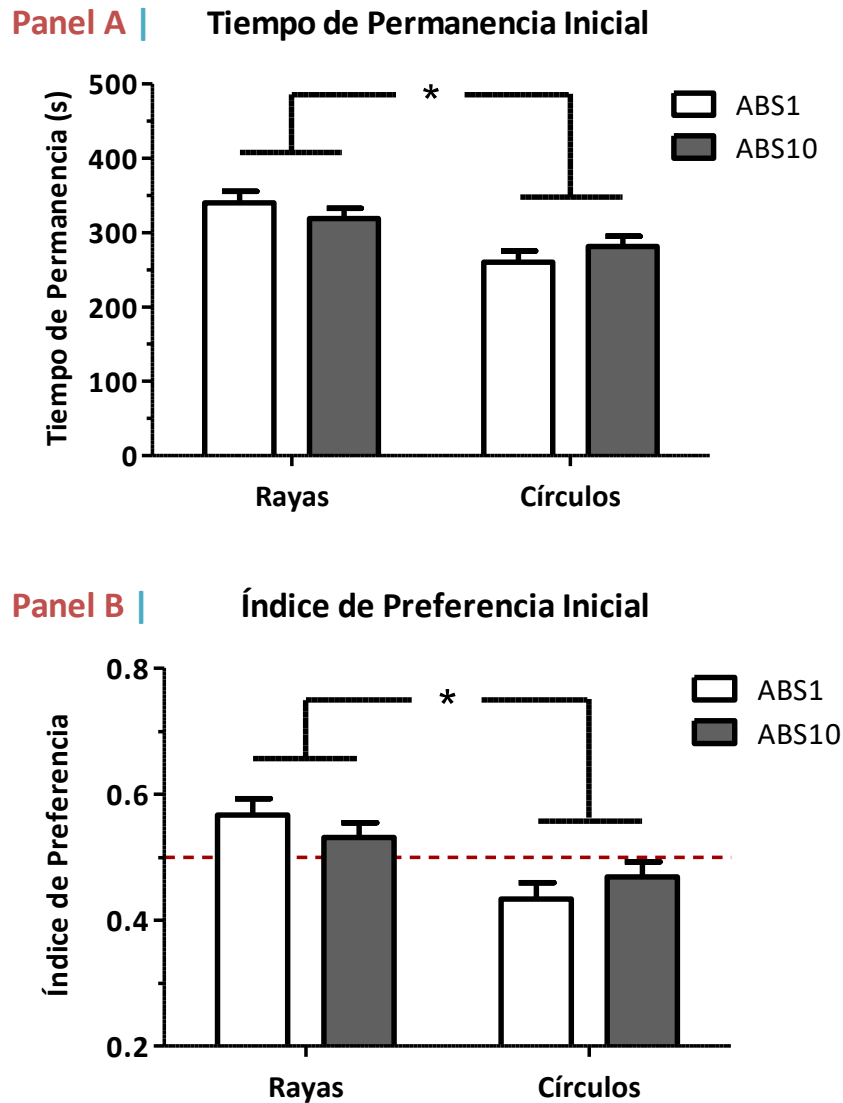
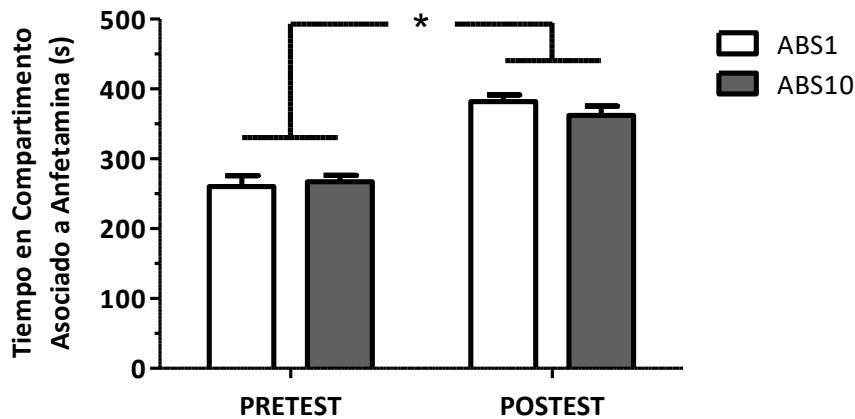


Figura 12. *Panel A:* Tiempo de permanencia inicial en cada compartimento. *Panel B:* Índices de preferencia iniciales, por compartimento. Se muestran las medias (\pm EEM). La línea punteada indica el punto de indiferencia. El análisis de datos realizado a través de un ANOVA de 2 vías arrojó una diferencia significativa entre los compartimentos, para cada grupo. Sin embargo, la prueba *post hoc* de Bonferroni no encontró diferencias entre los grupos. *: $p < 0.001$

Al comparar la cuantificación de la expresión de la proteína c-Fos 1 y 10 días después de la última sesión de condicionamiento, a través de una *prueba t no pareada*, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, donde se observó un aumento en la expresión de la proteína c-Fos a los 10 días, en comparación

a la expresión cuantificada después de un lapso de solo 1 día. ($t_{[14]} = 5.26, p < 0.0001$, Figura 16).

Panel A | Tiempo de Permanencia antes y después del Condicionamiento



Panel B | Índice de Preferencia antes y después del Condicionamiento

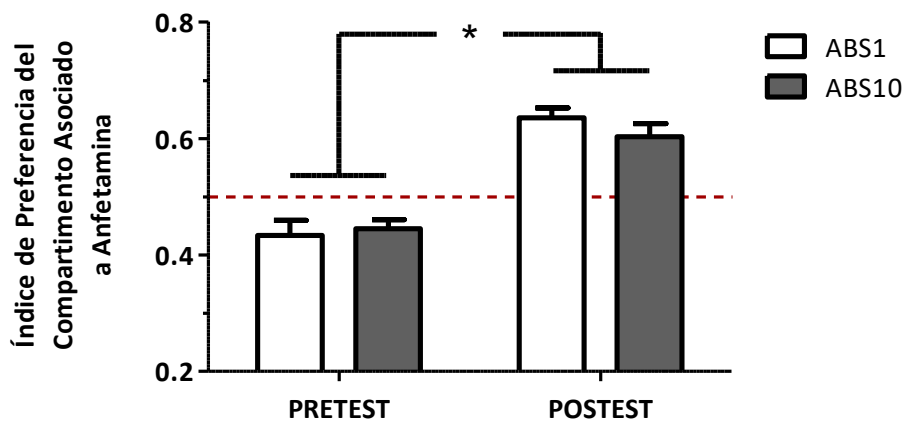


Figura 13. *Panel A:* Tiempo de permanencia en el compartimento asociado a amfetamina, antes y después del condicionamiento. *Panel B:* Índices de preferencia del compartimento asociado a amfetamina, antes y después del condicionamiento. Se muestran las medias (\pm EEM). La línea punteada indica el punto de indiferencia. El análisis de datos realizado a través de un ANOVA Mixto arrojó una diferencia significativa entre los registros previos y posteriores al condicionamiento, para cada grupo. Sin embargo, la prueba *post hoc* de Bonferroni no encontró diferencias entre los grupos. *: $p < 0.0001$

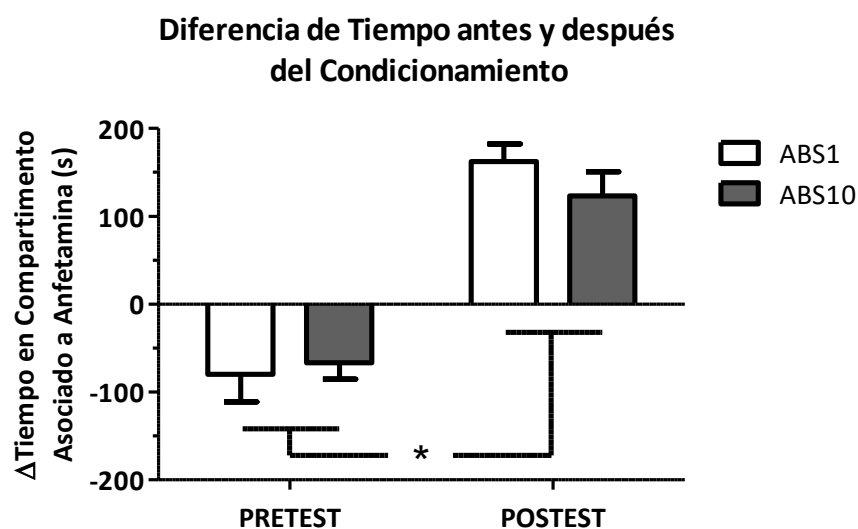


Figura 14. Diferencia de tiempo de permanencia en el compartimento asociado a la administración de anfetamina, en relación al compartimento control, antes y después del condicionamiento. Se muestran las medias (\pm EEM). El análisis de datos realizado a través de un ANOVA Mixto arrojó una diferencia significativa entre los registros previos y posteriores al condicionamiento, para cada grupo. Sin embargo, la prueba *post hoc* de Bonferroni no encontró diferencias entre los grupos. *: $p < 0.0001$

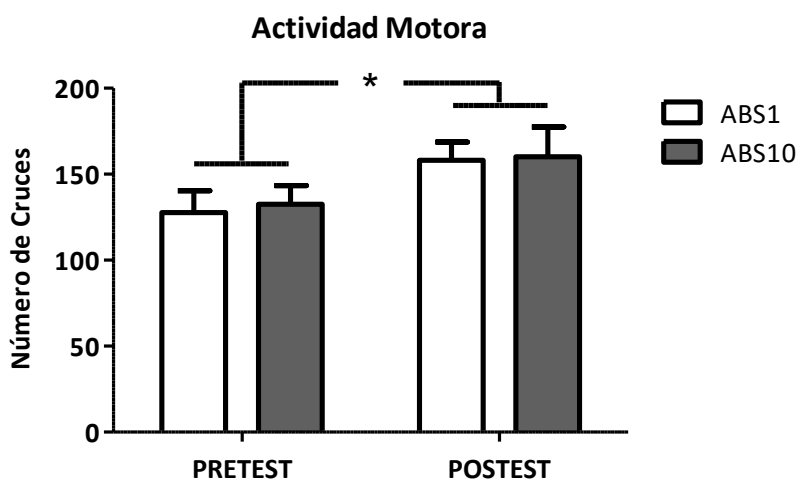
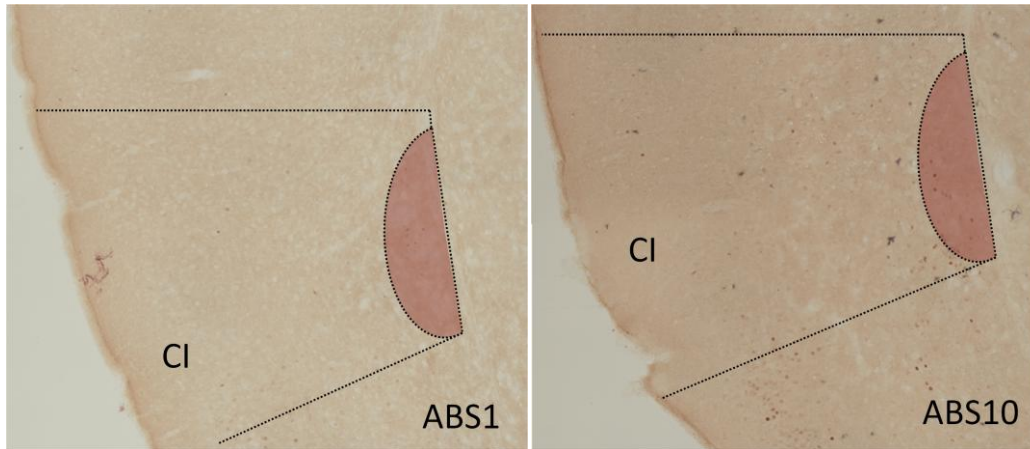


Figura 15. Número de cruces antes y después del condicionamiento. Se muestran las medias (\pm EEM). El análisis de datos realizado a través de un ANOVA Mixto arrojó una diferencia significativa entre los registros previos y posteriores al condicionamiento, para cada grupo. Sin embargo, la prueba *post hoc* de Bonferroni no encontró diferencias entre los grupos. *: $p < 0.01$

Panel A | Expresión de la Proteína c-Fos en la Corteza Insular



Panel B | Inmunorreactividad de Proteína C-Fos

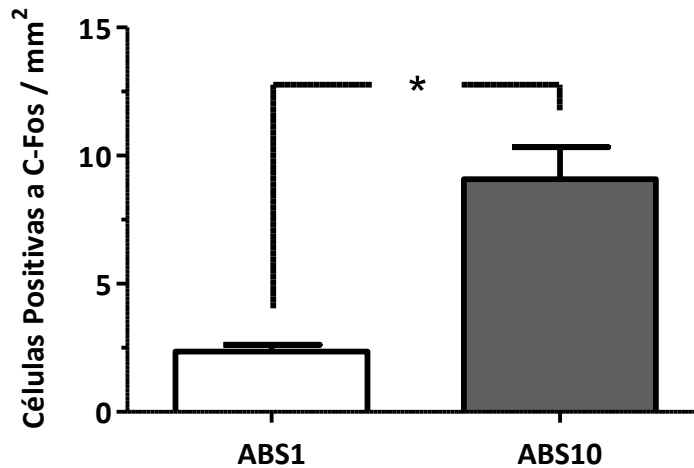


Figura 16. *Panel A:* Imágenes representativas de la ínsula de ratones sometidos a distintos periodos de abstinencia, después de ser tratados mediante inmunohistoquímica para c-Fos. *CI:* corteza insular, el área sombreada corresponde al claustrum y no fue incluida en el análisis de partículas. *Panel B:* Cuantificación de la expresión de la proteína c-Fos 1 y 10 días después de la última administración del tratamiento. Se muestran las medias (\pm EEM). El análisis de datos realizado a través de una *prueba t no pareada* arrojó una diferencia significativa sobre la cuantificación entre ambos grupos. *: $p < 0.0001$

9. Discusión

Por medio de la presentación recurrente de claves visuales específicas y la exposición contigua a un tratamiento crónico de anfetamina, se estableció satisfactoriamente un condicionamiento pavloviano entre ambos estímulos. La evidencia de esta asociación recae en el aumento del tiempo de permanencia en el compartimento con las claves visuales donde se experimentaron los efectos de la anfetamina, en comparación al tiempo de permanencia inicial en el mismo. Este aumento refleja el desarrollo de una preferencia –inicialmente inexistente– por las claves contextuales del compartimento, y se interpreta como una conducta de búsqueda de recompensa.

Al analizar los registros conductuales obtenidos durante la prueba posterior al condicionamiento, no se observaron diferencias, entre los grupos de abstinencia, sobre el tiempo de permanencia en el compartimento asociado al tratamiento con anfetamina ni sobre el número de cruces. Estos inesperados resultados podrían atribuirse parcialmente a limitaciones en el modelo de CPP; específicamente al tiempo de permanencia como variable dependiente. Dado que durante las pruebas conductuales, los roedores tienen libre acceso a ambos compartimentos, el tiempo de permanencia del compartimento condicionado no sólo se ve restringido a la duración total de la sesión sino también al tiempo de permanencia en el compartimento contrario.

Esta característica no se observa en procedimientos análogos de condicionamiento operante, donde la variable dependiente –que consiste en el número de respuestas emitidas al operando condicionado– no resulta sustancialmente limitada por la duración de la sesión ni por las respuestas emitidas al operando contrario, sino por aspectos motivacionales o puramente motores (Grimm et al., 2001). Posiblemente al incrementar el número de la muestra se podrían descubrir diferencias entre ambos grupos, tanto en el nivel de preferencia condicionada como en la actividad motora.

No obstante, el análisis estadístico de la cuantificación inmunohistoquímica observó un aumento significativo en la expresión de la proteína c-Fos en la ínsula, durante la exposición a las claves condicionadas, correspondiente al grupo de roedores sometidos a 10 días de abstinencia, en comparación al grupo sometido a 1 día de abstinencia.

Los resultados de esta investigación se suman a las observaciones de estudios previos donde la evocación de la preferencia de lugar condicionada por un tratamiento crónico con anfetamina desencadenó un incremento de la expresión de la proteína c-Fos en la ínsula (Contreras et al., 2007) y demuestran por primera vez, que un periodo prolongado de abstinencia induce una mayor actividad de la CI en respuesta a la exposición a estas claves condicionadas, en comparación a un lapso de abstinencia relativamente breve.

Después de su expresión, la proteína c-Fos conforma un heterodímero con una de las proteínas de la familia Jun²⁴ (c-Jun, JunB, JunD) resultando en un factor de transcripción denominado proteína activadora-1 (AP-1 por sus siglas en inglés), que regula la expresión de otros genes al interactuar con la secuencia de ADN (Ácido Desoxirribonucleico) –TGACTCA– en la región regulatoria de los genes blanco (Kovács, 1998; Sheng & Greenberg, 1990).

Se ha reportado que el complejo c-Fos/c-Jun estimula la expresión genética, mientras que el complejo c-Fos/JunB la inhibe (Kovács, 1998; Sheng & Greenberg, 1990), por lo que el aumento indiscriminado de la expresión de c-Fos no permite conocer qué ocurre exactamente sobre la regulación a la alta o a la baja en la transcripción de otros genes en la CI, puesto que no ofrece evidencia adicional acerca de la composición específica de la AP-1.

Actividad de la corteza insular durante la exposición a claves asociadas al consumo; evidencia conductual y manipulaciones farmacológicas en roedores.

Aún no queda clara cuál es la participación de la CI en el mantenimiento de las adicciones a sustancias de abuso. Dado que las claves contextuales adquieren valor predictivo sobre la presentación recurrente de un reforzador, esta asociación desencadena una expectativa de recompensa que conduce a la búsqueda del reforzador. Bajo esta perspectiva, en un estudio reciente se ha descrito que ocurre un aumento en la actividad de la ínsula –durante la exposición a claves asociadas a la entrega de alimento– vinculado a la conducta de búsqueda del reforzador (Kusumoto-

²⁴ c-Jun, JunB y JunD son proteínas de la familia Jun y también productos de *genes de expresión temprana* (Kovács, 1998).

Yoshida, Liu, Chen, Fontanini, & Bonci, 2015). En el mismo reporte se demostró que la inactivación farmacológica de esta estructura –a través de la administración de una mezcla de muscimol y baclofen– o por medio de optogenética, inhibe la conducta de búsqueda del reforzador.

Lo anterior se suma al cúmulo de evidencia que sugiere que la ínsula participa en el procesamiento de las asociaciones condicionadas que conducen finalmente a la búsqueda de un reforzador, ya que se han observado resultados similares al manipular dicha estructura a partir tanto de protocolos de condicionamiento clásico como de condicionamiento operante (Contreras et al., 2012, 2007; Forget et al., 2010; Hollander et al., 2008; Wu et al., 2014).

En líneas paralelas de investigación se ha descrito la ocurrencia de cambios tanto a nivel conductual como molecular, asociados a la interrupción de un tratamiento con sustancias de abuso durante distintos lapsos de tiempo. Por ejemplo, en ratas sometidas a un periodo prolongado de abstinencia –después de haber sido expuestas a un tratamiento crónico de nicotina– se observó un incremento en la complejidad morfológica de las dendritas basales en la corteza insular rostral agranular, en comparación a un grupo control (Ehlinger, Bergstrom, McDonald, & Smith, 2012). Esta remodelación dendrítica da cuenta de fenómenos de plasticidad inducidos por el tratamiento crónico de nicotina. Los autores del estudio reconocen que no se determinó con certeza si este efecto se debe exclusivamente al tratamiento o al periodo subsecuente de abstinencia. No obstante, en un estudio diferente se reportó la ocurrencia de un aumento significativo en la densidad de la materia gris de la ínsula anterior de fumadores asiduos, en comparación a individuos no fumadores (Zhang et al., 2011). Esta evidencia apoya el desarrollo de cambios estructurales en la CI, consecuencia del consumo crónico de tabaco, sin la consideración de un periodo de abstinencia.

En un estudio distinto, además de corroborar los resultados de Grimm y colaboradores (2001) en un protocolo de autoadministración sistémica de nicotina, se detectó un incremento de la cantidad fosforilada de la *fosfoproteína de 32 kDa regulada por dopamina y AMPc* (DARPP-32 por sus siglas en inglés) en la CI de ratas sometidas a

una abstinencia prolongada (Abdolahi, Acosta, Breslin, Hemby, & Lynch, 2010). La DARPP-32 es una molécula implicada en la cascada bioquímica de amplificación de la neurotransmisión dopaminérgica²⁵. Al integrar las observaciones conductuales con los cambios moleculares inducidos por un lapso prolongado de abstinencia, se ha sugerido que existe una relación entre el incremento de la conducta de búsqueda de reforzador y el aumento basal de la vía de señalización de PKA, a través de la fosforilación de la DARPP-32, en la ínsula.

Esta aproximación técnica resulta similar a la utilizada en la presente investigación, con la reserva de que en el reporte de Abdolahi y colaboradores (2010) no se expuso a los roedores a las claves asociadas a la entrega del reforzador y, consecuentemente, se realizó la cuantificación a partir de un estado basal. Sin embargo, da cuenta de cambios conductuales y moleculares –a nivel de CI– que son regulados únicamente por el lapso de abstinencia.

Adicionalmente, se ha observado que la emulación del síndrome de abstinencia, precipitada por la administración de naltrexona –un fármaco antagonista de los receptores opioides– después de la administración crónica de morfina, provoca el aumento de la expresión del ARNm (ácido ribonucleico mensajero) de c-Fos en la capa agranular de la ínsula, mediante hibridación *in situ* (Georges, Stinus, & Le Moine, 2000). A pesar de que este tipo de emulación del síndrome de abstinencia difiere procedimental y conceptualmente de la abstinencia abordada en la presente investigación, se ha observado la expresión del gen c-fos en las inmediaciones de la ínsula a partir de ambas aproximaciones.

Intercomunicación límbica y cortical.

Gracias a estudios de marcado neuroanatómico en roedores, se sabe que la ínsula recibe proyecciones dopaminérgicas provenientes del VTA (Saper, 1982), distintas a las que proyectan a la corteza prefrontal y cuyas terminales se colocalizan con interneuronas GABAérgicas locales (Ohara et al., 2003). Simultáneamente, se observó

²⁵ Al ser fosforilada en la treonina 34 por la proteína quinasa A (PKA por sus siglas en inglés), la DARPP-32 inhibe la acción de la proteína fosfatasa-1 (PP-1 por sus siglas en inglés), lo que favorece el estado fosforilado de otras múltiples fosfoproteínas.

que las neuronas piramidales de esa misma región expresan receptores GABA_B en su superficie y proyectan directamente al NAc, sugiriendo la existencia de una vía de modulación indirecta del NAc, por parte del VTA y a través de la ínsula.

También se sabe que la CI recibe aferencias orexinérgicas a través de la vía dorsal ascendente, cuyo origen es el HL (Date et al., 1999; Peyron et al., 1998) y que, a su vez, la ínsula también posee proyecciones hacia el HL, por lo que sostienen una comunicación bidireccional (Saper, 1982). Tanto el VTA como el HL están íntimamente relacionados con el circuito de recompensa. No obstante, se conoce poco acerca del impacto que tiene cada proyección, por separado, en las distintas regiones de la ínsula y su aporte a los correlatos conductuales observados durante la exposición a sustancias de abuso o a claves contextuales asociadas.

Por otra parte, existe evidencia en modelos *in vivo*, de la expresión de receptores μ -opioides en la superficie de las neuronas orexinérgicas del HL, así como de la expresión de la proteína c-Fos en dichas neuronas en respuesta tanto a la administración crónica de morfina como a la emulación del síndrome de abstinencia precipitada por naloxona (Georgescu et al., 2003), congruente con lo reportado por Georges y colaboradores (2000). Además, se ha reportado que la administración intraventricular tanto de orexina A como B, provoca aumentos en la expresión de la proteína c-Fos en las áreas a donde proyectan las neuronas orexinérgicas (Date et al., 1999). Estas observaciones sugieren que podría existir una modulación de la actividad de la CI por parte de las aferencias orexinérgicas provenientes del HL, durante el consumo y la abstinencia.

En cuanto a la fase de adquisición del CPP, se ha reportado que la lesión excitotóxica de la CI impide el establecimiento del condicionamiento entre las claves contextuales y los efectos de la administración sistémica de nicotina, pero no afecta el condicionamiento de aversión al lugar (CPA por sus siglas en inglés) entre dichas claves y la emulación del síndrome de abstinencia precipitada por la administración de un antagonista nicotínico (Scott & Hiroi, 2011). Este tipo de lesión se realizó al administrar ácido iboténico, el cual afecta preferencialmente los cuerpos celulares, no así a los tractos presentes. Esto implica que las observaciones se deben principalmente

a la alteración de la actividad intrínseca de la región y no a la perturbación de la comunicación entre otras áreas.

El estudio anterior sugiere que la ínsula interviene en la asociación de estímulos cuando el EC se compone de los efectos de una sustancia de abuso, no así cuando el EC es la emulación del síndrome de abstinencia.

Otro estudio demostró que la inhibición farmacológica de la CI granular posterior también impide el establecimiento de la asociación entre las claves contextuales y los efectos de la morfina (C. L. Li, Zhu, Meng, Li, & Sui, 2013). No obstante, esto no ocurre cuando se inhibe la CI rostral agranular, distinguiendo funcionalmente ambas subregiones de la ínsula. Por otro lado, la inhibición de ambas subregiones impide la consolidación del CPA precipitado por naloxona, contrario a lo reportado en el estudio anterior, lo que complica aún más el entendimiento del rol de la ínsula en ambos ejemplos de aprendizaje asociativo con componentes afectivos.

La contradicción entre ambos resultados puede ser explicada por diferencias procedimentales, enfatizando en que en el primero se realiza una lesión anatómica indiscriminada e irreversible, que afecta tanto a la adquisición como a la expresión subsecuente del condicionamiento, mientras que en el otro se lleva a cabo una inhibición farmacológica durante cada sesión de adquisición, pero la estructura se encuentra intacta durante la sesión de prueba del condicionamiento. No obstante, en estos protocolos resulta complicado distinguir el papel de la ínsula en los distintos procesos que ocurren a lo largo de este aprendizaje, como lo son la adquisición, la consolidación de la memoria y la evocación de la memoria.

Por otra parte, se ha demostrado que la administración sistémica de nicotina aumenta la expresión de la proteína c-Fos en neuronas, específicamente orexinérgicas, del HL (Pasumarthi, Reznikov, & Fadel, 2006). Esta activación neuronal podría estar vinculada a la actividad de la ínsula durante la exposición aguda a sustancias de abuso que correspondería a la fase de adquisición e inclusive a la consolidación de la memoria.

Curiosamente, la inhibición farmacológica indiscriminada del núcleo basolateral de la amígdala (BLA por sus siglas en inglés) –una estructura que sostiene una comunicación

bidireccional con la CI (Saper, 1982)– durante o inmediatamente después de la sesiones de adquisición del CPP inducido por anfetamina, también impide la consolidación de la asociación entre las claves contextuales y los efectos de la anfetamina (Hsu, Schroeder, & Packard, 2002). Además, la sola inhibición de esta estructura, previo a la prueba del condicionamiento, también impide la evocación del CPP.

En un estudio distinto, la inhibición farmacológica de esta misma estructura durante la exposición a claves asociadas al consumo, en roedores entrenados en una tarea operante de autoadministración sistémica de metanfetamina y sometidos a lapsos diferenciales de abstinencia, no tuvo efecto sobre el patrón de respuesta inducido por tales claves. No obstante, después de la inhibición del núcleo central de la amígdala (CeA por sus siglas en inglés) se observó una disminución significativa sobre el restablecimiento de la conducta de búsqueda del reforzador (X. Li, Zeric, Kambhampati, Bossert, & Shaham, 2015).

En un estudio subsecuente donde se utilizó un procedimiento similar de autoadministración de nicotina, se observó una mayor activación, a través de la expresión de c-Fos, tanto de la CeA como de la BLA de roedores sometidos a un periodo de abstinencia, durante la exposición a claves contextuales asociadas. Además, la inhibición selectiva de los ensambles neuronales activados en la CeA durante dicha exposición, atenuó la conducta de autoadministración (Funk et al., 2016). Más investigación es necesaria para esclarecer el papel que juegan ambas subestructuras en el mantenimiento de las adicciones.

Las destacadas similitudes entre los resultados de la inhibición de la ínsula y la amígdala durante el protocolo de CPP, tanto en la fase de adquisición como en la fase de evocación sugieren que ambas estructuras podrían estar participando, de manera conjunta, en la consolidación, evocación y expresión de las asociaciones condicionadas en este procedimiento.

En un estudio subsecuente, se administró anisomicina (un inhibidor de síntesis de proteínas) en la ínsula agranular rostral o en la granular posterior inmediatamente

después de la expresión del CPP inducido por anfetamina. En una segunda sesión de prueba, 24 horas después, se observó la completa extinción del condicionamiento previamente establecido, que se mantuvo durante sesiones de prueba posteriores, en ambos tratamientos (Contreras et al., 2012). Este efecto solo se observó en aquellos grupos donde se administró el tratamiento después de la sesión de prueba del CPP, pero no en aquellos en los que no hubo sesión de prueba que antecediera a la administración de anisomicina.

Esta manipulación afectó la actividad dependiente de síntesis protéica, en las inmediaciones de dichas subregiones de la CI, posterior a la evocación del CPP. Esta robusta extinción se atribuye a la alteración de la memoria del condicionamiento, dando lugar a un comportamiento donde pareciera que la asociación entre las claves contextuales y los efectos de la anfetamina se hubiera desvanecido por completo.

10. Conclusiones

Mientras el sometimiento de roedores a dos periodos distintos de abstinencia no afectó el patrón conductual de la evocación del CPP inducido por un tratamiento crónico con anfetamina, se observó un impacto diferencial sobre la actividad de la CI durante la exposición a claves contextuales condicionadas. Se registró un aumento significativo de la expresión de la proteína c-Fos en la ínsula de ratones expuestos a 10 días de abstinencia, en comparación a ratones expuestos a 1 día de abstinencia.

Dicha expresión se considera como un marcador indirecto de actividad neuronal vinculada a la evocación de las asociaciones condicionadas y a la expresión conductual del CPP. Se demostró que la expresión de la proteína c-Fos es regulada no sólo por la exposición a claves contextuales condicionadas, sino también por el periodo de abstinencia desde la última administración del tratamiento. No obstante, más investigación es necesaria para corroborar esta evidencia, así como evaluar si ocurre un cambio similar en la actividad de otras estructuras relacionadas.

11. Referencias Bibliográficas

- Abdollahi, A., Acosta, G., Breslin, F. J., Hemby, S. E., & Lynch, W. J. (2010). Incubation of nicotine seeking is associated with enhanced protein kinase A-regulated signaling of dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa in the insular cortex. *European Journal of Neuroscience*, *31*(4), 733–741.
<http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07114.x>
- Abdollahi, A., Williams, G. C., Benesch, C. G., Wang, H. Z., Spitzer, E. M., Scott, B. E., ... van Wijngaarden, E. (2015). Smoking cessation behaviors three months following acute insular damage from stroke. *Addictive Behaviors*, *51*, 24–30.
<http://doi.org/10.1016/j.addbeh.2015.07.001>
- American Psychiatric Association. (1994). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (4th ed.). Washington, DC: American Psychiatric Publishing.
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (5th ed.). Arlington, VA: American Psychiatric Publishing.
- Asma, S., Mackay, J., Song, S. Y., Zhao, L., Morton, J., Palipudi, K. M., ... Tursan d'Espaignet, E. (2015). *The GATS Atlas*. Atlanta, GA: CDC Foundation. Retrieved from <http://www.who.int/tobacco/publications/surveillance/gatstlas/en/>
- Berman, S. M., Kuczenski, R., McCracken, J. T., & London, E. D. (2009). Potential adverse effects of amphetamine treatment on brain and behavior: a review. *Molecular Psychiatry*, *14*(2), 123–142. <http://doi.org/10.1038/mp.2008.90>
- Bermúdez-Rattoni, F. (2014). The forgotten insular cortex: Its role on recognition memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, *109*, 207–216.
<http://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.01.001>
- Binder, D. K., Schaller, K., & Clusmann, H. (2007). The seminal contributions of Johann-Christian Reil to Anatomy, Physiology and Psychiatry. *Neurosurgery*, *61*(5), 1091–1096. <http://doi.org/10.1227/01.NEU.0000296946.63697.9F>
- Bonson, K. R., Grant, S. J., Contoreggi, C. S., Links, J. M., Metcalfe, J., Weyl, H. L., ...

- London, E. D. (2002). Neural systems and cue-induced cocaine craving. *Neuropsychopharmacology*, 26(3), 376–386. [http://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00371-2](http://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00371-2)
- Brody, A. L., Mandelkern, M. A., London, E. D., Childress, A. R., Lee, G. S., Bota, R. G., ... Jarvik, M. E. (2002). Brain metabolic changes during cigarette craving. *Archives of General Psychiatry*, 59(12), 1162–72. <http://doi.org/10.1001/archpsyc.59.12.1162>
- Brunton, L. L., Chabner, B. A., & Knollmann, B. C. (Eds.). (2011). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (12th ed.). McGraw-Hill.
- Buccafusco, J. J. (Ed.). (2000). *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. CRC Press.
- Carlezon, W. A., & Chartoff, E. H. (2007). Intracranial self-stimulation (ICSS) in rodents to study the neurobiology of motivation. *Nature Protocols*, 2(11), 2987–2995. <http://doi.org/10.1038/nprot.2007.441>
- Carlson, N. R. (2013). *Physiology of Behavior* (11th ed.). Pearson.
- Contreras, M., Billeke, P., Vicencio, S., Madrid, C., Perdomo, G., González, M., & Torrealba, F. (2012). A role for the insular cortex in long-term memory for context-evoked drug craving in rats. *Neuropsychopharmacology*, 37(9), 2101–2108. <http://doi.org/10.1038/npp.2012.59>
- Contreras, M., Ceric, F., & Torrealba, F. (2007). Inactivation of the Interoceptive Insula Disrupts Drug Craving and Malaise Induced by Lithium. *Science*, 318(5850), 655–658. <http://doi.org/10.1126/science.1145590>
- Controlled Substance Act (1970). 91st United States Congress. Retrieved from <http://www.deadiversion.usdoj.gov/21cfr/21usc/812.htm>
- Cunningham, C. L., Gremel, C. M., & Groblewski, P. A. (2006). Drug-induced conditioned place preference and aversion in mice. *Nature Protocols*, 1(4), 1662–1670. <http://doi.org/10.1038/nprot.2006.279>

- Date, Y., Ueta, Y., Yamashita, H., Yamaguchi, H., Matsukura, S., Kangawa, K., ... Nakazato, M. (1999). Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(January), 748–753. <http://doi.org/10.1073/pnas.96.2.748>
- Di Pietro, N. C., Black, Y. D., & Kantak, K. M. (2006). Context-dependent prefrontal cortex regulation of cocaine self-administration and reinstatement behaviors in rats. *European Journal of Neuroscience*, *24*(11), 3285–3298. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05193.x>
- Domjan, M. (2014). *The Principles of Learning and Behavior* (7th ed.). Cengage Learning.
- Ehlinger, D. G., Bergstrom, H. C., McDonald, C. G., & Smith, R. F. (2012). Nicotine-induced dendritic remodeling in the insular cortex. *Neuroscience Letters*, *516*(1), 89–93. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.03.064>
- Fleckenstein, A. E., Volz, T. J., Riddle, E. L., Gibb, J. W., & Hanson, G. R. (2007). New insights into the mechanism of action of amphetamines. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *47*, 681–698. <http://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105140>
- Forget, B., Pushparaj, A., & Le Foll, B. (2010). Granular insular cortex inactivation as a novel therapeutic strategy for nicotine addiction. *Biological Psychiatry*, *68*(3), 265–71. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.01.029>
- Franklin, K. B. J., & Paxinos, G. (2007). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (3rd ed.). Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-374247-6.50004-3>
- Funk, D., Coen, K., Tamadon, S., Hope, B. T., Shaham, Y., & Lê, A. D. (2016). Role of Central Amygdala Neuronal Ensembles in Incubation of Nicotine Craving. *Journal of Neuroscience*, *36*(33), 8612–8623. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1505-16.2016>

Fusar-Poli, P., Howes, O., & Borgwardt, S. (2009). Johann Cristian Reil on the 200th anniversary of the first description of the insula (1809). *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *80*(12), 1409.
<http://doi.org/10.1136/jnnp.2009.185884>

Garavan, H., Pankiewicz, J., Bloom, A., Cho, J.-K., Sperry, L., Ross, T. J., ... Stein, E. A. (2000). Cue-Induced Cocaine Craving: Neuroanatomical Specificity for Drug Users and Drug Stimuli. *American Journal of Psychiatry*, *157*(11), 1789–1798.
<http://doi.org/10.1176/appi.ajp.157.11.1789>

Georges, F., Stinus, L., & Le Moine, C. (2000). Mapping of c-fos gene expression in the brain during morphine dependence and precipitated withdrawal, and phenotypic identification of the striatal neurons involved. *European Journal of Neuroscience*, *12*(12), 4475–4486. <http://doi.org/10.1046/j.0953-816X.2000.01334.x>

Georgescu, D., Zachariou, V., Barrot, M., Mieda, M., Willie, J. T., Eisch, A. J., ... DiLeone, R. J. (2003). Involvement of the lateral hypothalamic peptide orexin in morphine dependence and withdrawal. *The Journal of Neuroscience*, *23*(8), 3106–3111.

Gray, H. (1918). *Anatomy of the human body*. (W. H. Lewis, Ed.) (20th ed.). Philadelphia: Lea & Febiger.

Grimm, J. W., Hope, B. T., Wise, R. A., & Shaham, Y. (2001). Incubation of cocaine craving after withdrawal. *Nature*, *412*(6843), 141–142.
<http://doi.org/10.1038/35084134>

Headlee, C. P., Coppock, H. W., & Nichols, J. R. (1955). Apparatus and Technique Involved in a Laboratory Method of Detecting the Addictiveness of Drugs. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, *44*(4), 229–31.
<http://doi.org/10.1002/jps.3030440415>

Hefzy, H., Silver, R. W., & Silver, B. (2011). The No Smoking Sign-Insular Infarction. *Journal of Neuroimaging*, *21*(2), e169–e170. <http://doi.org/10.1111/j.1552-6569.2010.00486.x>

- Hollander, J. A., Lu, Q., Cameron, M. D., Kamenecka, T. M., & Kenny, P. J. (2008). Insular hypocretin transmission regulates nicotine reward. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(49), 19480–5. <http://doi.org/10.1073/pnas.0808023105>
- Hsu, E. H., Schroeder, J. P., & Packard, M. G. (2002). The amygdala mediates memory consolidation for an amphetamine conditioned place preference. *Behavioural Brain Research*, *129*(1–2), 93–100. [http://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00376-X](http://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00376-X)
- Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Comisión Nacional Contra las Adicciones, & Secretaría de Salud. (2015). *Encuesta Nacional de Consumo de Drogas en Estudiantes 2014: Reporte de Drogas*. México, D.F. Retrieved from http://www.conadic.salud.gob.mx/pdfs/investigacion/ENCODE_DROGAS_2014.pdf
- Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Instituto Nacional de Salud Pública, & Secretaría de Salud. (2012a). *Encuesta Nacional de Adicciones 2011: Reporte de Alcohol*. México, D.F. Retrieved from http://www.inprf.gob.mx/psicosociales/encuestas_ena2011.html
- Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Instituto Nacional de Salud Pública, & Secretaría de Salud. (2012b). *Encuesta Nacional de Adicciones 2011: Reporte de Drogas*. México, D.F. Retrieved from http://www.inprf.gob.mx/psicosociales/encuestas_ena2011.html
- Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Instituto Nacional de Salud Pública, & Secretaría de Salud. (2012c). *Encuesta Nacional de Adicciones 2011: Reporte de Tabaco*. México, D.F. Retrieved from http://www.inprf.gob.mx/psicosociales/encuestas_ena2011.html
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (Eds.). (2013). *Principles of Neural Science* (5th ed.). McGraw-Hill Education.
- Kilts, C. D., Schweitzer, J. B., Quinn, C. K., Gross, R. E., Faber, T. L., Muhammad, F., ... Drexler, K. P. G. (2001). Neural Activity Related to Drug Craving in Cocaine Addiction. *Archives of General Psychiatry*, *58*(4), 334.

<http://doi.org/10.1001/archpsyc.58.4.334>

Koob, G. F., Arends, M. A., & Le Moal, M. (2014). *Drugs, Addiction, and the Brain*. Elsevier Inc.

Koob, G. F., & Le Moal, M. (2006). *Neurobiology of Addiction*. Elsevier Academic.

Kovács, K. J. (1998). c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochemistry International*, 33(4), 287–297.

[http://doi.org/10.1016/S0197-0186\(98\)00023-0](http://doi.org/10.1016/S0197-0186(98)00023-0)

Kuhar, M. (2012). *The Addicted Brain: Why We Abuse Drugs, Alcohol and Nicotine*. New Jersey: FT Press.

Kumar, R., Steinberg, H., & Stolerman, I. P. (1968). Inducing a Preference for Morphine in Rats without Premedication. *Nature*, 218(5141), 564–565.

<http://doi.org/10.1038/218564a0>

Kusumoto-Yoshida, I., Liu, H., Chen, B. T., Fontanini, A., & Bonci, A. (2015). Central role for the insular cortex in mediating conditioned responses to anticipatory cues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(4), 1190–5. <http://doi.org/10.1073/pnas.1416573112>

Li, C. L., Zhu, N., Meng, X. L., Li, Y. H., & Sui, N. (2013). Effects of inactivating the agranular or granular insular cortex on the acquisition of the morphine-induced conditioned place preference and naloxone-precipitated conditioned place aversion in rats. *Journal of Psychopharmacology*, 27(9), 837–844.

<http://doi.org/10.1177/0269881113492028>

Li, X., Zeric, T., Kambhampati, S., Bossert, J. M., & Shaham, Y. (2015). The Central Amygdala Nucleus is Critical for Incubation of Methamphetamine Craving. *Neuropsychopharmacology*, 40(5), 1297–1306. <http://doi.org/10.1038/npp.2014.320>

Mazur, J. E. (2012). *Learning and Behavior* (7th ed.). Pearson.

McClernon, F. J., Hiott, F. B., Huettel, S. A., & Rose, J. E. (2005). Abstinence-Induced

- Changes in Self-Report Craving Correlate with Event-Related fMRI Responses to Smoking Cues. *Neuropsychopharmacology*, 30(10), 1940–1947.
<http://doi.org/10.1038/sj.npp.1300780>
- Naqvi, N. H., Rudrauf, D., Damasio, H., & Bechara, A. (2007). Damage to the insula disrupts addiction to cigarette smoking. *Science*, 315(5811), 531–534.
<http://doi.org/10.1126/science.1135926>
- Ohara, P. T., Granato, A., Moallem, T. M., Wang, B. R., Tillet, Y., & Jasmin, L. (2003). Dopaminergic input to GABAergic neurons in the rostral agranular insular cortex of the rat. *Journal of Neurocytology*, 32(2), 131–141.
<http://doi.org/10.1023/B:NEUR.0000005598.09647.7f>
- Olds, J., & Milner, P. (1954). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 47(6), 419–427. <http://doi.org/10.1037/h0058775>
- Pasumarthi, R. K., Reznikov, L. R., & Fadel, J. (2006). Activation of orexin neurons by acute nicotine. *European Journal of Pharmacology*, 535(1–3), 172–176.
<http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.02.021>
- Peyron, C., Tighe, D. K., van den Pol, A. N., de Lecea, L., Heller, H. C., Sutcliffe, J. G., & Kilduff, T. S. (1998). Neurons containing hypocretin (orexin) project to multiple neuronal systems. *The Journal of Neuroscience*, 18(23), 9996–10015.
- Rasband, W. S. (2016). ImageJ. Bethesda, MD: U.S. National Institutes of Health.
Retrieved from <http://imagej.nih.gov/ij/>
- Russo, S. J., & Nestler, E. J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(9), 609–625. <http://doi.org/10.1038/nrn3381>
- Saper, C. B. (1982). Convergence of autonomic and limbic connections in the insular cortex of the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 210(2), 163–173.
<http://doi.org/10.1002/cne.902100207>
- Scott, D., & Hiroi, N. (2011). Deconstructing craving: Dissociable cortical control of cue

- reactivity in nicotine addiction. *Biological Psychiatry*, 69(11), 1052–1059.
<http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.01.023>
- Sell, L. A., Morris, J. S., Bearn, J., Frackowiak, R. S. J., Friston, K. J., & Dolan, R. J. (1999). Activation of reward circuitry in human opiate addicts. *European Journal of Neuroscience*, 11(3), 1042–1048. <http://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00522.x>
- Sell, L. A., Morris, J. S., Bearn, J., Frackowiak, R. S. J., Friston, K. J., & Dolan, R. J. (2000). Neural responses associated with cue evoked emotional states and heroin in opiate addicts. *Drug and Alcohol Dependence*, 60(2), 207–216.
[http://doi.org/10.1016/S0376-8716\(99\)00158-1](http://doi.org/10.1016/S0376-8716(99)00158-1)
- Sheng, M., & Greenberg, M. E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, 4(4), 477–485.
[http://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90106-P](http://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90106-P)
- Spragg, S. D. S. (1940). Morphine addiction in chimpanzees. *Comparative Psychology Monographs*, 15(7), 1–132.
- Staddon, J. E. R. (1983). *Adaptive Behavior and Learning*. Cambridge University Press.
Retrieved from <http://dukespace.lib.duke.edu/dspace/handle/10161/2878>
- Standring, S. (Ed.). (2008). *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice* (40th ed.). Elsevier Limited.
- Sulzer, D., Sonders, M. S., Poulsen, N. W., & Galli, A. (2005). Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: A review. *Progress in Neurobiology*, 75(6), 406–433. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.04.003>
- Suñer-Soler, R., Grau, A., Gras, M. E., Font-Mayolas, S., Silva, Y., Dávalos, A., ... Serena, J. (2012). Smoking Cessation 1 Year Poststroke and Damage to the Insular Cortex. *Stroke*, 43(1), 131–136.
<http://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.630004>
- Thanos, P. K., Bermeo, C., Rubinstein, M., Suchland, K. L., Wang, G. J., Grandy, D. K., & Volkow, N. D. (2010). Conditioned place preference and locomotor activity in

- response to methylphenidate, amphetamine and cocaine in mice lacking dopamine D4 receptors. *Journal of Psychopharmacology*, 24(6), 897–904.
<http://doi.org/10.1177/0269881109102613>
- Tzschentke, T. M. (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: Update of the last decade. *Addiction Biology*, 12(3–4), 227–462.
<http://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2007.00070.x>
- United Nations Office on Drugs and Crime. (2016). *World Drug Report 2016*. Vienna. Retrieved from <http://www.unodc.org/wdr2016/>
- Wang, G. J., Volkow, N. D., Fowler, J. S., Cervany, P., Hitzemann, R. J., Pappas, N. R., ... Felder, C. (1999). Regional brain metabolic activation during craving elicited by recall of previous drug experiences. *Life Sciences*, 64(9), 775–784.
[http://doi.org/10.1016/S0024-3205\(98\)00619-5](http://doi.org/10.1016/S0024-3205(98)00619-5)
- Wang, Z., Faith, M., Patterson, F., Tang, K., Kerrin, K., Wileyto, E. P., ... Lerman, C. (2007). Neural substrates of abstinence-induced cigarette cravings in chronic smokers. *The Journal of Neuroscience*, 27(51), 14035–14040.
<http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2966-07.2007>
- Weeks, J. R. (1962). Experimental Morphine Addiction: Method for Automatic Intravenous Injections in Unrestrained Rats. *Science*, 138(3537), 143–144.
<http://doi.org/10.1126/science.138.3537.143>
- World Health Organization. (2004). *Neuroscience of Psychoactive Substance Use and Dependence*. Geneva: World Health Organization. Retrieved from http://www.who.int/substance_abuse/publications/psychoactives/en/
- World Health Organization. (2012). *WHO Global Report: Mortality Attributable to Tobacco*. Retrieved from http://www.who.int/tobacco/publications/surveillance/rep_mortality_attributable/en/
- World Health Organization. (2014). *Global Status Report on Alcohol and Health 2014*. Luxembourg. Retrieved from

http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/

World Health Organization. (2016). *World Health Statistics 2016: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals*. Retrieved from

http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2016/en/

Wu, W., Li, H., Liu, Y., Huang, X., Chen, L., & Zhai, H. (2014). Involvement of insular muscarinic cholinergic receptors in morphine-induced conditioned place preference in rats. *Psychopharmacology*, 231(21), 4109–18. <http://doi.org/10.1007/s00213-014-3550-1>

Zhang, X., Salmeron, B. J., Ross, T. J., Geng, X., Yang, Y., & Stein, E. A. (2011). Factors underlying prefrontal and insula structural alterations in smokers. *NeuroImage*, 54(1), 42–48. <http://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.08.008>