



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

LA PARTICIPACIÓN DE LA CORTEZA INSULAR EN EL CIRCUITO  
ASOCIADO AL MANTENIMIENTO DE LA MEMORIA ADICTIVA  
DEPENDIENTE DEL CONTEXTO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:  
ELVI GIL LIEVANA

TUTOR PRINCIPAL:  
DR. FEDERICO BERMÚDEZ RATTONI  
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DRA. ANGÉLICA ZEPEDA RIVERA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS  
DR. FATUEL TECUAPETLA AGUILAR  
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., JUNIO 2021



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.

Los experimentos de optogenética y conductuales se realizaron en el laboratorio de Neurobiología del Aprendizaje y la Memoria en el Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Federico Bermúdez Rattóni, gracias al financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), proyectos:

CONACyT Foins 747  
CONACyT 250870  
DGAPA-PAPIIT-UNAM IN212919

También se agradece el apoyo del técnico académico Dr. Luis F. Rodríguez Durán.

Los experimentos de electrofisiología se realizaron en el laboratorio de Neurobiología del Apetito del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), bajo la dirección del Dr. Ranier Gutiérrez Mendoza, gracias al financiamiento otorgado por el proyecto productos Medix 3247.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Federico Bermudez Rattoni**, por su apoyo incondicional y enseñanzas durante el desarrollo de mi estancia en el doctorado. Mi respeto y admiración profunda por la gran calidad profesional y humana.

Al **Dr. Ranier Gutiérrez** por su valiosa intervención, por el enorme entusiasmo y guía en este trabajo.

A los integrantes de mi comité tutorial, **Dra. Angeliza Zepeda Rivera** y **Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar** por las aportaciones, sugerencias y disposición para la realización de este proyecto. Gracias por fomentar la actividad humana más interesante, la investigación.

A los miembros del jurado:

**Dra. María Isabel Miranda Saucedo**  
**Dra. Martha Lilia Escobar Rodríguez**  
**Dr. Miguel Ángel Morales Mendoza**  
**Dr. Eduardo Adrián Garza Villarreal**  
**Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar**

Quienes enriquecieron mi conocimiento y sus valiosas aportaciones mejoraron el contenido de la tesis.

Al **M. C. Gerardo Ramírez Mejía** por todo el apoyo incondicional durante toda la estancia en el doctorado y por el resultado final, una gran amistad.

Al **M. C. Oscar Giovanny Urrego Morales** por las largas y temidas discusiones acerca del proyecto. Gracias por la paciencia, la energía y el tiempo invertido durante el desarrollo de este trabajo.

A la **MVZ. Claudia Rivera Cerecedo** y al **MVZ. Héctor Malagón**, por haber proporcionado los animales de experimentación para la realización de esta tesis.

A la memoria del ser más amado de este mundo.

A mi mamá por ser el cimiento más resistente, a mi papá por ser el refugio más seguro y a mi hermana por ser el amanecer más radiante.

Gracias por acompañarme en una travesía más.  
Gracias porque "aquí todo sigue igual" como siempre.

# ÍNDICE

RESUMEN .....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Neurobiología de la adicción.....	3
1.2 Los circuitos neuronales en la adicción .....	6
1.3 Neurotransmisión dopaminérgica en la adicción .....	8
1.4 Neurotransmisión glutamatérgica en la adicción .....	9
1.5 La formación y mantenimiento de la memoria adictiva .....	10
1.6 La corteza insular anterior en la memoria adictiva.....	11
1.7 Reconsolidación de la memoria adictiva.....	13
2. JUSTIFICACIÓN Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	16
3. HIPÓTESIS.....	17
4. OBJETIVO GENERAL.....	17
4.1 Objetivos particulares .....	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
5.1 Sujetos experimentales.....	18
5.2 Genotipificación .....	18
5.3 Vectores virales .....	18
5.4 Cirugía estereotáxica.....	19
5.5 Procedimientos generales .....	19
5.6 Condicionamiento de preferencia de lugar acoplado a la estimulación optogenética .....	20
5.7 Microdiálisis .....	20
5.8 Inmunofluorescencia.....	22
5.9 Registro eléctrico durante la activación optogenética del VTA .....	22
5.10 Registro eléctrico durante la inhibición optogenética de las fibras BLA→aIC ..	23
5.11 Registros extracelulares .....	23
5.12 Estadística y reproducibilidad .....	24
6. RESULTADOS .....	25
6.1 La activación optogenética de las terminales TH+ en la aIC provenientes del VTA con cocaína establece un CPL .....	25

6.2	Modulación de la aIC por activación optogenética de las neuronas TH+ del VTA	28
6.3	La activación de las neuronas VTA TH + induce CPL	30
6.4	La evocación de la memoria del CPL induce la liberación de neurotransmisores en la aIC	32
6.5	El bloqueo del receptor glutamatérgico NMDA en la aIC acelera la extinción de la memoria del CPL	34
6.6	La inhibición optogenética de la vía glutamatérgica BLA→aIC acelera la extinción del CPL	38
7.	DISCUSIÓN	43
8.	CONCLUSION	47
9.	REFERENCIAS	48
10.	ANEXO I	57

## RESUMEN

La adicción es un trastorno patológico que comparte mecanismos con los procesos de aprendizaje y memoria. Uno de los principales problemas en la adicción es la alta resistencia a la extinción de señales asociadas con las drogas, lo que contribuye a la alta tasa de recaída en personas adictas. El circuito neuronal que participa en las adicciones se conoce como el sistema mesolímbico dopaminérgico. Este sistema está formado principalmente por las neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental (VTA) y sus conexiones con otras áreas cerebrales, entre las que se encuentran la corteza insular anterior (aIC) y la amígdala basolateral (BLA). Estudios científicos en humanos y en modelos animales han demostrado que lesiones en la aIC provoca la pérdida de adicción a las drogas. Sin embargo, no se han descrito los posibles mecanismos celulares y las conexiones neuronales en la aIC que participan durante la adicción. Por otro lado, estudios de imagenología en humano han reportado que las conexiones entre la BLA y la aIC participan en la búsqueda y en la recaída de la adicción a las drogas. A pesar de conocer la relación entre estas estructuras y la memoria adictiva, no se ha evaluado si la vía BLA→aIC controla el mantenimiento de dicha memoria. Para esto, en un modelo de ratón transgénico que expresaba la proteína cre-recombinasa bajo el promotor de tirosina hidroxilasa (TH+) activamos optogenéticamente a las neuronas TH+ del VTA para inducir el condicionamiento de preferencia acoplado a la estimulación optogenética (CPL) como un modelo conductual que nos permitió evaluar la memoria adictiva. Nuestros resultados demostraron que la estimulación optogenética de las terminales TH+ en la aIC provenientes del VTA no establece un CPL. Sin embargo, cuando los ratones fueron estimulados optogenéticamente en las terminales TH+ de la aIC y administrados por vía intraperitoneal con una dosis baja de cocaína aumentó el tiempo de permanencia en el lugar condicionado. Mediante estudios electrofisiológicos demostramos que la activación optogenética en los somas de las neuronas TH+ aumentó la respuesta de las neuronas del VTA y moduló la respuesta neuronal en la aIC. A través de microdiálisis *in vivo*, en la aIC observamos únicamente liberación de dopamina cuando estimulamos optogenéticamente los somas del VTA. Además, durante la evocación de la memoria adictiva (en ausencia de activación optogenética) se indujo una fuerte liberación de glutamato, dopamina y noradrenalina en la aIC. A través de farmacología, encontramos que solo el bloqueo del receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA) en la aIC aceleró el proceso de extinción de la memoria adictiva. Finalmente, encontramos que la inhibición optogenética de la vía glutamatérgica BLA→aIC provocó la desinhibición de los circuitos locales en la aIC, acelerando la extinción e impidiendo el restablecimiento de la memoria adictiva. Por lo tanto,



nuestro trabajo demuestra que la conexión dopaminérgica entre el VTA y la aIC no es suficiente para inducir el condicionamiento de preferencia de lugar, pero modula la formación de esta memoria. Mientras que la proyección glutamatérgica BLA→aIC controla el mantenimiento de la memoria adictiva a través de los receptores NMDA.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Neurobiología de la adicción

La neurobiología de la adicción ha progresado a través del estudio en modelos animales y a través de estudios de imagenología cerebral en personas adictas. Aunque ningún modelo animal de adicción emula completamente la condición humana, estos modelos permiten la investigación de signos o síntomas específicos asociados con la condición psicopatológica (Koob & Volkow, 2016). La adicción a las drogas no es un fenómeno estático y, como ocurre con otras desregulaciones conductuales, hay diferentes componentes que constituyen un ciclo o círculo de la patología en constante crecimiento (Baumeister et al. 1994).

Todas las drogas de abuso producen efectos reforzantes que son responsables del inicio del trastorno adictivo. Sin embargo, otros procesos conductuales también son cruciales para el mantenimiento de la adicción, incluidas las consecuencias negativas de la abstinencia de drogas y los diferentes estímulos que conducen a la recaída, por ejemplo: señales asociadas a las drogas, factores estresantes y reexposición a las drogas (Koob et al., 2004). La búsqueda compulsiva, la pérdida del autocontrol y la susceptibilidad a recaer son las principales características patológicas que provocan todos los tipos de drogas (Britt & Bonci, 2013).

Existen varias teorías de la adicción a las drogas de abuso y la neurobiología involucrada en elementos del ciclo de adicción. Las primeras teorías sugirieron que el comportamiento adictivo se desarrolla en respuesta a los efectos gratificantes agudos de las drogas de abuso, y que la dependencia ocurre como una función de un impulso recurrente de la recompensa (Wise 1980). Aunque el refuerzo positivo está inicialmente involucrado en el desarrollo de un trastorno por uso de sustancias, el abuso de las drogas a largo plazo provoca la aparición de efectos psicológicos y fisiológicos aversivos si la droga es retenida o retirada del sistema, como un medio para evitar las consecuencias aversivas de la abstinencia de drogas (es decir, refuerzo negativo) (Wikler 1973; Camí y Farré, 2003). Por lo tanto, los comportamientos adictivos reflejan un cambio gradual del refuerzo positivo (impulsividad) al refuerzo negativo (compulsividad) (Koob, 2004). Sin embargo, estas teorías de condicionamiento no pueden explicar completamente algunos aspectos de la dependencia a las drogas, como la reanudación de la búsqueda y el consumo después de un período prolongado de abstinencia (es decir, recaída). De esta forma, se ha teorizado que el uso prolongado de las drogas conduce a una serie de neuroadaptaciones que contribuyen a la naturaleza perdurable del estado adictivo (Feltenstein et al., 2021).

La teoría de Wise & Bozarth (Wise & Bozarth, 1982; 1984; 1987; Bozarth et al, 1989) basa la adicción en el reforzamiento positivo, indicando que el consumo de las drogas de abuso se hacía por el placer de consumirlas (propiedades hedónicas). De acuerdo con esta teoría el inicio del consumo de las drogas produce efectos placenteros y gratificantes. Sin embargo, se ha demostrado que los efectos placenteros de las drogas desarrollan tolerancia con el consumo repetitivo (Kozak & Fought, 2011), lo que significa que el placer no puede explicar el uso continuo de la droga, ya que disminuye con el tiempo por el efecto de la propia tolerancia, que es la disminución del efecto de la dosis de una droga con el consumo progresivo.

Robinson & Berridge (Robinson & Berridge 1993, 2008; Berridge & Robinson 1995) postularon en su teoría de la "sensibilización del incentivo" de la adicción a las drogas, que la exposición crónica a las drogas de abuso da como resultado alteraciones en varios sistemas neuronales, incluidas áreas normalmente involucradas en la motivación para reforzadores naturales. La teoría expone que, en las primeras etapas del consumo de las drogas de abuso el consumo es esporádico y la emoción que predomina es el placer por consumir la sustancia, pero cuando la adicción se consolida, la emoción que predomina en el sujeto es la urgencia y el anhelo compulsivo (craving), que es la necesidad de consumir dicha droga debido a que se encuentra ausente. Esta teoría, separa en dos conceptos la asociación entre el valor del incentivo de la droga o "wanting" y el efecto hedónico o "liking". En los primeros consumos de las drogas de abuso, el individuo experimenta el placer que se obtiene (liking) y a medida que pasa tiempo, el sujeto experimenta un deseo creciente y no controlable de consumir dicha droga. Este deseo o anhelo compulsivo va aumentando por no consumir la droga, lo que desencadena que el deseo o anhelo de consumo comience a ser más intenso, induciendo patrones compulsivos de comportamiento de búsqueda de drogas. De esta manera, el sistema se sensibiliza a la droga y a los estímulos asociados a ella.

Por otro lado, la teoría de Koob & Le Moal indican que la adicción de drogas se caracteriza por cambios neurobiológicos que conducen al consumo compulsivo crónico y recurrente con desregulación en los sistemas hedónicos cerebrales (Koob, 2009). La impulsividad es "una predisposición hacia reacciones rápidas y no planificadas a estímulos internos y externos sin tener en cuenta las consecuencias negativas de estas reacciones para ellos mismos o para los demás". Mientras que, la compulsividad es la manifestación de "acciones perseverativas y repetitivas que son excesivos e inapropiados" (Berlin & Hollander, 2014). Los comportamientos

impulsivos suelen ir acompañados de sentimientos de placer o gratificación, pero las compulsiones a menudo se realizan para reducir la tensión o la ansiedad de los pensamientos obsesivos (Moeller et al., 2001). Los trastornos impulsivos se caracterizan por una sensación creciente de tensión o excitación antes de cometer un acto de placer, gratificación o alivio en el momento de cometer el acto. Los trastornos impulsivos se asocian en gran medida con mecanismos de refuerzo positivo. En cambio, los trastornos compulsivos se caracterizan por la ansiedad y el estrés antes de cometer una conducta compulsiva repetitiva y el alivio del estrés mediante la realización de la conducta compulsiva (Koob & Volkow, 2016). A medida que un individuo pasa de la impulsividad a la compulsividad, se produce un cambio del refuerzo positivo que impulsa la conducta motivada al refuerzo negativo (Koob et al., 2004).

La búsqueda compulsiva de drogas que está asociada con la adicción se puede conceptualizar como un ciclo recurrente de tres etapas: atracón/intoxicación, abstinencia/afecto negativo y preocupación/anticipación (deseo compulsivo) (Koob & Le Moal, 1997) y tres dominios de disfunción (en la saliencia incentiva/hábitos patológicos, estados emocionales negativos y función ejecutiva (Koob & Volkow, 2016; Koob, 2021). Este ciclo va empeorando con el tiempo e implica cambios neuroplásticos en los sistemas de recompensa (Baumeister et al., 1994; Koob & Le Moal, 1997). En el ciclo de la adicción hay múltiples fuentes de refuerzo que pueden contribuir al uso compulsivo de las drogas de abuso. El refuerzo positivo ocurre cuando la presentación de la droga aumenta la probabilidad de una respuesta para volver a obtener la droga, provocando efectos placenteros. El refuerzo negativo, por el contrario, ocurre con el alivio de un estado aversivo existente o el alivio de un estado aversivo generado por la droga (por ejemplo, abstinencia) (Wikler, 1973). La etapa de abuso/intoxicación está asociada con el refuerzo positivo, mientras que la etapa de abstinencia/afecto negativo está asociada con el refuerzo negativo. El reforzamiento condicionado positivo y negativo contribuyen a la etapa de preocupación/anticipación (Koob & Le Moal, 2008).

Por último, otras teorías se han centrado en neuroadaptaciones específicas inducidas por fármacos que pueden ser la base del aprendizaje asociativo no adaptativo (Di Chiara, 1999; Hyman & Malenka, 2001), la pérdida del control sobre el comportamiento y la toma de decisiones (Jentsch & Taylor, 1999; Franklin et al., 2002; Goldstein & Volkow, 2002). Así como, el aprendizaje aberrante de estímulo/respuesta que resulta en la formación de comportamientos asociados a las drogas (Wise, 2002; Everitt & Robbins, 2005; Volkow et al., 2006), y la disfunción en los sistemas de memoria que permiten establecer memorias patológicas no adaptativas

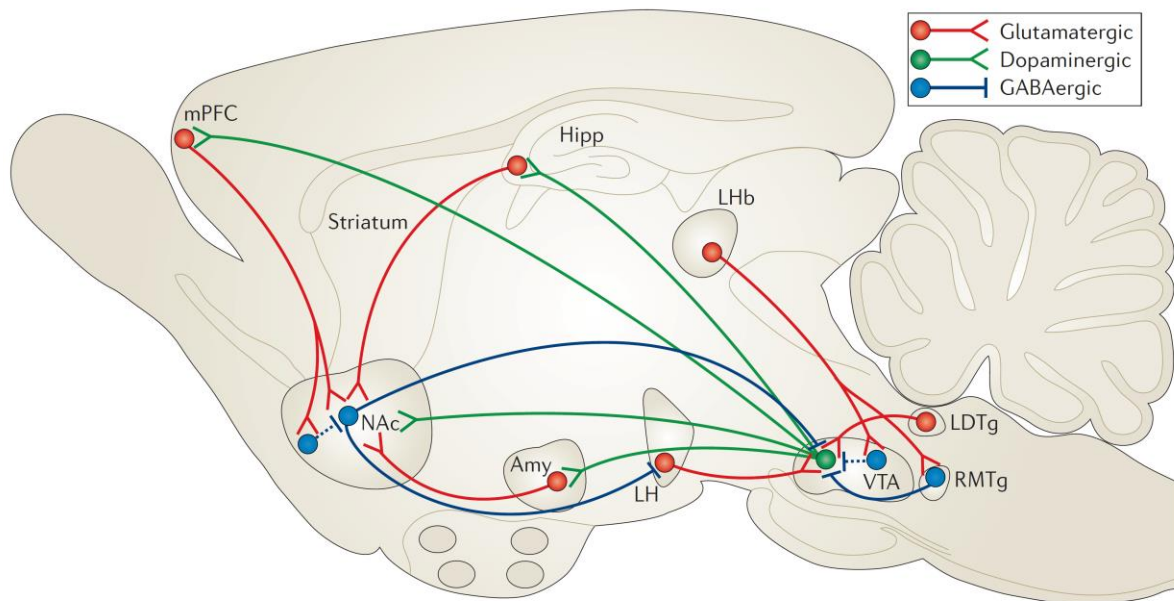
(Taylor et al., 2009; Sorg, 2012; Everitt et al., 2018). En resumen, ninguna de estas teorías explica por completo todos los elementos del ciclo de la adicción. Sin embargo, el desarrollo de este trabajo se centró en las últimas teorías que hablan acerca de la disfunción en los sistemas de memoria que permiten establecer memorias patológicas desadaptativas.

## **1.2 Los circuitos neuronales en la adicción**

En el cerebro existen muchos cambios inducidos por drogas que son comunes en el estado adicto, lo que sugiere un mecanismo neuronal común (Britt & Bonci, 2013). A pesar de que el mecanismo de acción inicial de las drogas de abuso implica diferentes dianas neuroquímicas (Hyman & Malenka, 2001), las desregulaciones neurales producidas involucran vías neuroquímicas y neuroanatómicas similares (Nestler, 2002). De hecho, múltiples estudios apoyan la existencia de mecanismos neurobiológicos comunes para las propiedades adictivas de la mayoría de las drogas de abuso. Esta información se basa en hallazgos que muestran el papel crucial de las vías dopaminérgicas mesocorticolímbicas en los procesos adictivos (Volkow et al., 2002; Maldonado et al., 2006; Calipari et al., 2017). Las drogas de abuso interactúan con estos circuitos cerebrales comunes produciendo cambios adaptativos que conducen a una profunda desregulación de las vías de motivación y recompensa del cerebro (Pierce & Kumaresan, 2006). El sistema mesocorticolímbico representa un sustrato neuronal común para las propiedades reforzantes de las drogas de abuso, donde la transmisión de la dopamina es crucial (Ikemoto, 2010).

El circuito de recompensa mejor caracterizado en el cerebro comprende neuronas dopaminérgicas en el área ventral tegmental (VTA) que se proyectan al núcleo accumbens (NAc) (Berridge & Kringelbach, 2008). Las principales neuronas del NAc son neuronas espinosas medianas GABAérgicas (MSN). Este circuito VTA-NAc es crucial para el reconocimiento de recompensa en el medio ambiente y por iniciar su consumo (Koob & Le Moal, 2008). Las neuronas dopaminérgicas del VTA también inervan varias regiones de la corteza prefrontal, amígdala central (CeA), amígdala basolateral (BLA) e hipocampo, entre otras áreas (Fudge et al., 2017; Scherf & Angenstein, 2017; Tang et al., 2020). Todas estas estructuras cerebrales que son llamadas regiones de recompensa están interconectadas de formas complejas. El NAc recibe inervaciones glutamatérgicas de la corteza prefrontal, amígdala e hipocampo (Heimer et al., 1997; Prado et al., 2016). Mientras que la corteza prefrontal, amígdala e hipocampo, tienen conexiones glutamatérgicas recíprocas entre sí (Pierce & Kumaresan, 2006). La salida funcional

de cada una de estas regiones se modula por varios tipos de interneuronas GABAérgicas (Taylor et al., 2014). Además, cada una de estas regiones recibe conexiones serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe y entradas noradrenérgicas del locus coeruleus (Sara, 2009; Huang et al., 2019). Por último, existe evidencia que las neuronas del VTA también liberan glutamato o GABA, que pueden contribuir a sus efectos funcionales (Hnasko et al., 2012; Tritsch et al., 2012; Ntamati & Lüscher, 2016) (Ver figura 1).



**Figura 1. Circuito de recompensa.** Esquema simplificado de las principales conexiones dopaminérgicas, glutamatérgicas y GABAérgicas del área ventral tegmental (VTA) en el cerebro de los roedores. El circuito de recompensa incluye principalmente proyecciones dopaminérgicas del VTA al núcleo accumbens (NAc), que liberan dopamina en respuesta a estímulos relacionados con la recompensa. También hay proyecciones GABAérgicas del NAc al VTA; proyecciones a través de la vía directa, mediadas por neuronas espinosas medianas (MSN) de tipo D1 que inervan directamente al VTA, mientras que las proyecciones a través de la vía indirecta mediadas por MSN de tipo D2 inervan el VTA a través de neuronas GABAérgicas. El NAc recibe una densa inervación de los circuitos glutamatérgicos de la corteza prefrontal medial (mPFC), hipocampo (Hipp) y amígdala (Amy), así como otras regiones. El VTA recibe entradas desde el tegmento dorsal lateral (LDTg), habénula lateral (LHb) e hipotálamo lateral (LH), así como conexiones GABAérgicas y glutamatérgicas de la amígdala. Estas entradas glutamatérgicas controlan aspectos de la percepción y la memoria relacionadas con la recompensa. Las líneas discontinuas indican proyecciones internas inhibitorias. Mientras que el tegmento rostromedial (RTMg) envían conexiones al VTA a través de neuronas GABAérgicas (Tomado de Russo et al., 2013).

### **1.3 Neurotransmisión dopaminérgica en la adicción**

El circuito neuronal que participa en las adicciones se conoce como el sistema mesolímbico dopaminérgico que se origina en el VTA. Se ha demostrado que el VTA tiene proyecciones dopaminérgicas hacia el NAc, la amígdala central y basolateral (BLA), el hipocampo, la corteza prefrontal, cingulada, perrinal e insular (IC), entre otras áreas (Ohara et al., 2003; Wise, 2004; Naqvi & Bechara, 2009; 2010; Nestler, 2013; Nieh et al., 2013).

El NAc recibe proyecciones del hipotálamo lateral, la corteza prefrontal, el hipocampo y por su puesto del VTA. El NAc a su vez envía proyecciones al VTA y al hipotálamo lateral. Mientras que el VTA envía y recibe proyecciones de la corteza prefrontal y del hipotálamo lateral (Russo et al., 2013). Estas estructuras forman el sistema de recompensa, en el que la información visceral es recibida por el hipotálamo lateral, mientras que la activación del VTA ocurre ante la presencia de reforzadores endógenos o exógenos. El NAc parece ser un integrador del estado inicial de necesidad, de la ejecución de una conducta motivada y la sensación subjetiva de placer ante la obtención del reforzador (Koob & Le Moal, 2008; Gardner, 2011). La información del contexto es proporcionada por el hipocampo y la ejecución de la conducta adictiva está a cargo de las estructuras corticales y los núcleos involucrados en la coordinación de movimientos (Aragona et al., 2003; Nestler, 2013). Por otro lado, la BLA es una estructura neuronal clave involucrada en el comportamiento de búsqueda de drogas (Stefanik & Kalivas, 2013; Wassum & Izquierdo, 2015). De hecho, la actividad glutamatérgica en la BLA regula el mantenimiento de la búsqueda de cocaína (Luo et al, 2015).

Evidencias en humanos y animales sugieren que la adicción a las drogas está asociada con grandes interrupciones en los circuitos de recompensa del cerebro (Russo et al., 2013). Por lo tanto, la dopamina en este circuito de recompensa es el componente crucial de la conducta adictiva. Se ha demostrado en animales adictos a drogas de abuso, que la mayoría de las neuronas dopaminérgicas provocan una liberación alta de dopamina tras recibir una recompensa. De esta manera, las neuronas dopaminérgicas que codifican las conductas adictivas, son excitadas por acontecimientos placenteros e inhibidas por eventos aversivos (Puig et al., 2014). Todas las drogas de abuso tienen en común que incrementan (directa o indirectamente) la liberación de dopamina y por lo tanto la actividad sináptica de estas neuronas. Los estudios de neuroimagen en humanos muestran evidencia que la adicción además de involucrar mecanismos

dopaminérgicos, también involucra mecanismos serotoninérgicos, endocannabinoides, opiáceos, gabaérgicos, y glutamatérgicos (Wise, 2004; Gardner, 2011).

#### **1.4 Neurotransmisión glutamatérgica en la adicción**

La transmisión glutamatérgica representa hasta el 70% de la transmisión sináptica en el sistema nervioso central. Existen evidencia de que una parte importante del papel del glutamato en la adicción está relacionada directa o indirectamente con la modificación de la actividad del sistema dopaminérgico (Cornish & Kalivas, 2000; Kaposova & Szumlinski, 2008). El sistema mesocorticolímbico dopaminérgico también está conectado con estructuras glutamatérgicas.

Como se mencionó anteriormente, el sistema mesocorticolímbico dopaminérgico está formado principalmente por neuronas dopaminérgicas en el VTA que se proyectan a regiones como el NAc, la amígdala y la corteza prefrontal. Cada una de estas regiones recibe un aporte glutamatérgico sustancial (Heimer et al., 1997; Groenewegen et al., 1999). Por ejemplo, el VTA recibe proyecciones glutamatérgicas de la corteza prefrontal, amígdala, entre otras (Geisler et al., 2007; Omelchenko & Sesack, 2009). El NAc recibe entradas glutamatérgicas de la corteza prefrontal, amígdala, el hipocampo y varios núcleos del tálamo (Christie et al., 1987). La corteza prefrontal recibe información glutamatérgica de hipocampo, amígdala y tálamo. Por tanto, existe una fuerte inervación glutamatérgica excitadora en el circuito mesolímbico dopaminérgico que proporciona una base anatómica para las interacciones dopamina-glutamato en la regulación de las propiedades adictivas de las drogas de abuso, así como la plasticidad sináptica (Pulvirenti & Diana, 2001; Lapish et al., 2006). Además de los efectos directos sobre la transmisión sináptica del sistema mesolímbico, la exposición a drogas de abuso modifica la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP) y/o la depresión a largo plazo (LTD) (Thompson et al., 2004).

La plasticidad sináptica glutamatérgica en la adicción comparte el mismo tipo de cambios moleculares involucrados en los procesos de aprendizaje y memoria (Chen et al., 2008; Nestler, 2013; Volkow & Morales, 2015). Se ha demostrado que la estimulación tetánica de la BLA induce LTP en la IC, que depende de la actividad del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAr) (Jones et al., 1999; Escobar & Bermúdez-Rattoni, 2000; Rodríguez-Durán et al., 2017). Se ha reportado que esta comunicación glutamatérgica participa en la consolidación del condicionamiento aversivo al sabor, que es un tipo de memoria de reconocimiento (Osorio-Gómez et al., 2016; 2017).



## 1.5 La formación y mantenimiento de la memoria adictiva

Desde el punto de vista evolutivo el aprendizaje y la memoria favorecen la supervivencia de los organismos. Durante el aprendizaje se adquiere una nueva información que es codificada y almacenada a través de un proceso llamado consolidación para que posteriormente esta información sea recuperada mediante la evocación de la memoria; (Sharma et al., 2010) desencadenando una serie de cambios neuronales que se manifiestan en la conducta (Squire & Zola, 1996). Sin embargo, en los últimos años se ha estudiado que el cerebro también adquiere y almacena información patológica, tal es el caso de la adicción, en donde los procesos neuronales que normalmente sirven al aprendizaje de respuestas de recompensa están alterados (Bernstein et al., 2011).

El término de memoria adictiva y la importancia de la recaída en las adicciones han sido temas de discusión desde hace más de 30 años. Por lo que este concepto no es nuevo, en 1972 Mello introdujo el término de memoria adictiva en una discusión que realizó en cuanto a las conductas relacionadas con la adicción. Desde el punto de vista de la neurobiología, psicología y farmacología han definido de manera general a la memoria adictiva como un proceso biológico que permite la exposición repetida a una sustancia o actividad para obtener una recompensa placentera que induce alteraciones patológicas estructurales y funcionales en el cerebro para impulsar la búsqueda compulsiva de placer y la pérdida de control sobre ella (Böning, 2009). A partir de esto, se inició el estudio de la interacción de los efectos reforzantes de la adicción con los sistemas de que integran la memoria.

En este sentido, evidencias experimentales sugieren que la adicción y la memoria comparten ciertos mecanismos. Partiendo desde el hecho que todas las adaptaciones inducidas por drogas pueden ser vistas como tipos de memoria molecular o celular, la célula nerviosa que realice dichos cambios es diferente como resultado de la exposición a la droga y por lo tanto responde de manera diferente. Por otro lado, la mayoría de los cambios que se han asociado con un estado de adicción (alteraciones en la transcripción de genes, la epigenética y la plasticidad sináptica) están implicados en las formas tradicionales de diferentes tipos de memorias (Nestler, 2013). Por último, las regiones del cerebro afectadas por las drogas de abuso son sustratos neurales clave para la formación y mantenimiento de memorias. Esto coincide con la creciente comprensión de que algunas de las características más importantes de la adicción desde el punto de vista clínico (por ejemplo, el deseo de droga y la recaída) reflejan anormalidades en los circuitos tradicionales de memoria (Böning, 2009; Müller, 2013).

Las señales ambientales asociadas a la recompensa pueden convertirse en fuertes conductoras del comportamiento y contribuir al desarrollo de la adicción. Por lo tanto, la identificación de los mecanismos que reducen la fuerza de recuerdos asociados con la droga podría ayudar en el tratamiento de la adicción a diferentes niveles. Los estudios de la adquisición, consolidación y evocación de la memoria adictiva y la interrupción de estos procesos han recibido una mayor atención en los últimos años. Recientemente se ha examinado lo que sucede durante y después de la evocación de la memoria (Duvarci & Nader, 2004). Varios reportes han establecido que en el proceso de evocación puede ser desestabilizado el engrama, permitiendo que la memoria sea lábil y esté sujeta a la interrupción (Finnie & Nader, 2012). Una vez que se desestabiliza la memoria puede restabilizarse en un proceso denominado reconsolidación, que comparte muchos de los mecanismos moleculares esenciales para la consolidación inicial. Cada vez que una memoria asociada a la droga se evoca y se reconsolida provoca progresivamente su fortalecimiento y mantenimiento de dicha memoria (Sara, 2000; Lee, 2008; Tronson & Taylor, 2007). Por otro lado, la exposición a las señales ambientales en ausencia de la droga de abuso ya sea repetida o durante un período prolongado de tiempo, puede conducir a la formación de una nueva memoria, llamada extinción que interfiere con los comportamientos de expresión conductual asociados a la memoria original (Holmes & Quirk, 2010; Torregrossa & Taylor, 2012). El restablecimiento de la memoria ocurre cuando se reactivan otra vez los mecanismos de consolidación y reconsolidación de la memoria original, una vez que la memoria adictiva ya se había extinguido. Las manipulaciones farmacológicas pueden afectar a todas las fases de la memoria, incluyendo la extinción y los procesos de reconsolidación, para mejorar y fortalecer la memoria o para que sea más débil e incluso olvidada (Torregrossa & Taylor, 2016).

## **1.6 La corteza insular anterior en la memoria adictiva**

La corteza insular (IC) está situada en el lóbulo temporal en primates y seres humanos. En los roedores se encuentra a lo largo del surco rinal y la arteria cerebral media (Bermudez-Rattoni 2014). La organización anatómica y citoarquitectónica de esta corteza se divide en tres áreas principales: la zona dorsal granular, la zona media disgranular y zona ventral agranular (Bermudez-Rattoni, 2014). La IC es una región cortical integradora heterogénea que recibe información tanto ambiental como interna para generar una "representación interoceptiva" (Craig, 2009).

Durante mucho tiempo, se ha estudiado la participación de la IC en funciones del control visceral, la relevancia de los estímulos, la toma de decisiones, así como las memorias de reconocimiento visual y gustativa (Benjamin & Golden, 1985; Augustine, 1996; Bermudez-Rattoni, 2004; Kurth et al., 2010; Bermudez-Rattoni 2014). Sin embargo, en la actualidad se han reportado evidencias que indican la participación fundamental de la IC en la adicción a las drogas (Yousefzadeh-Fard et al., 2013; Droutman et al., 2015; Belin-Rauscent et al., 2016; Rotge et al., 2017).

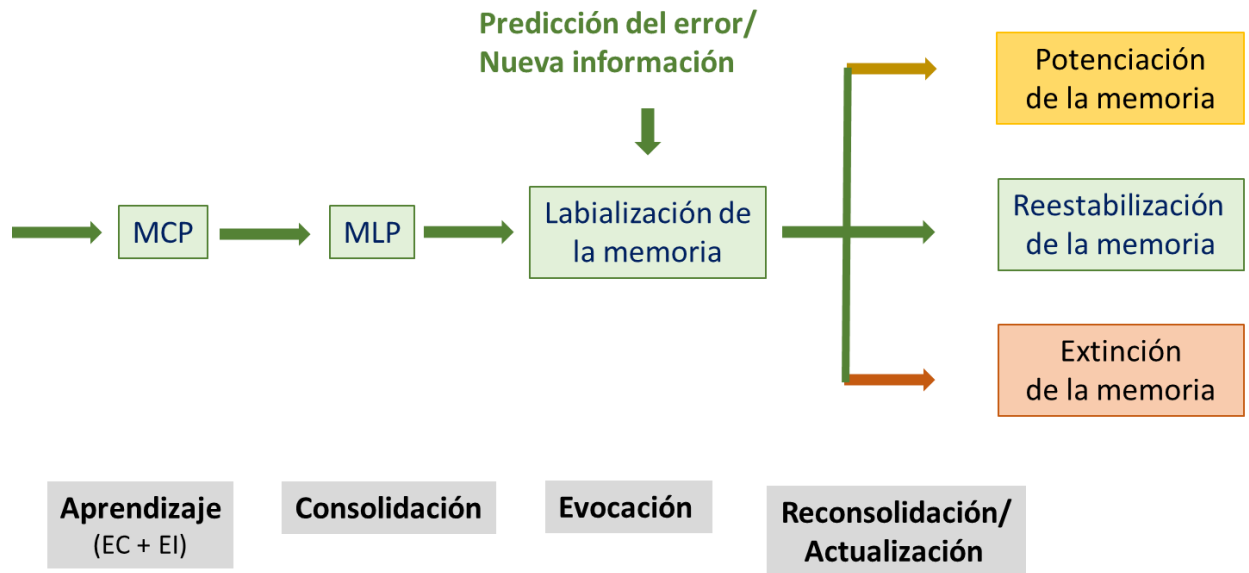
Naqvi et al., 2007 reportaron que lesiones en la IC de personas fumadoras crónicas suprimía completamente la adicción al tabaco sin recaída. Así mismo, se ha reportado que personas adictas al opio que sufrieron isquemia en la IC como consecuencia de accidentes cerebrovasculares, presentaron mayor probabilidad a disminuir o detener el consumo del opio. Este hallazgo demostró que las personas jóvenes adictas tienen la misma probabilidad de disminuir el consumo al opio como las personas mayores. Además, que las personas adictas con infarto en la IC consumen menos opio tanto antes como después del accidente cerebrovascular (Yousefzadeh-fard et al., 2013). Hoy en día, se ha propuesto que la función central de la IC en la adicción a las drogas es representar los efectos interoceptivos de la droga y su búsqueda (Naqvi et al., 2014).

Así mismo, estudios realizados en roedores han demostrado que la corteza insular agranular rostral, llamada de ahora en adelante corteza insular anterior (aIC), participa en el mantenimiento de la adicción a la anfetamina, la nicotina, la cocaína y el alcohol (Di Pietro & Mashhoon, 2008; Contreras et al., 2012; Abdolahi et al., 2005; Cosme et al., 2015; Pushparaj et al., 2015; Arguello et al., 2017; Rotge et al., 2017; Haaranen et al., 2020). Incluso, ya ha sido reportado que las lesiones de la aIC afectan de manera diferencial el desarrollo y mantenimiento de la pérdida de control sobre la administración de cocaína, lo que sugiere que la naturaleza de la contribución de los mecanismos interoceptivos asociados a la cocaína cambia en el curso del desarrollo de la adicción (Rotge et al., 2017). Se ha propuesto que la participación crucial de la aIC en el comportamiento adictivo puede estar relacionado con sus conexiones a las áreas límbicas como la corteza cingulada anterior, la corteza prefrontal, la CeA, la BLA y el VTA que son estructuras que participan en procesos recompensantes (Escobar & Bermudez-Rattoni, 2000, Ohara et al., 2003; Naqvi & Bechara, 2009; 2010; Forget et al., 2010; Campbell et al., 2019). De hecho, resultados indican que las proyecciones excitadoras de la aIC hacia la CeA y al NAc, participan en el control y la recompensa del alcohol (Haaranen et al., 2020).

## **1.7 Reconsolidación de la memoria adictiva**

La memoria adictiva como cualquier tipo de memoria está formada por diferentes fases que implican distintos procesos neurobiológicos. Estas fases son: la adquisición, consolidación, evocación, reconsolidación y extinción de la memoria, (Alberini et al., 2006, Bouton, 2004). La extinción y la reconsolidación son las fases más estudiadas en el mantenimiento de la memoria adictiva debido a que ofrecen la oportunidad de influir en la fuerza de una señal de la memoria asociada a las drogas de abuso. Se ha aceptado ampliamente que la extinción implica un nuevo aprendizaje que inhibe o anula el aprendizaje inicial en lugar del olvido (Bouton, 2004). Las respuestas a una señal extinguida pueden reaparecer con el paso del tiempo (recuperación espontánea), contextos cambiantes (renovación) o presentación del estímulo incondicionado (reinstalación) (Myers et al., 2006). Por otro lado, la reconsolidación es el proceso de restablecer el rastro de la memoria después de que se evoca o reactiva, posiblemente fortaleciendo y regresando a la memoria al almacenamiento de largo plazo (Tronson & Taylor, 2007).

También se ha reportado que las memorias consolidadas pueden sufrir procesos lábiles después de la recuperación (reactivación) que desestabilizan el rastro de memoria original y lo hacen susceptible a ser afectado por agentes amnésicos (Nader et al., 2000; Rodríguez -Ortiz & Bermudez-Rattoni, 2017) (Ver figura 2). Por lo tanto, existe una oportunidad para alterar los recuerdos asociados con las drogas al proporcionar agentes amnésicos apropiados después de la recuperación para reducir las memorias relacionadas con las drogas (Fuchs et al., 2009; Milton & Everitt, 2010).



**Figura 2. Reconsolidación y actualización de la memoria.** El diagrama muestra la entrada de información al sistema a través del aprendizaje clásico en donde un estímulo condicionado se asocia con un estímulo incondicionado (EC+EI) para establecer una memoria de corto plazo (MCP). Paralelo a este proceso ocurre la consolidación de la memoria (MLP) que requiere síntesis de proteínas. Una vez la memoria es consolidada, se expresa conductualmente a través de un proceso llamado evocación. En este momento la memoria es susceptible a tres posibles procesos. La memoria puede ser potenciada, reestabilizada o extinta, lo cual dependerá de los estímulos y las respuestas que ocurran durante la reconsolidación o actualización de la memoria (Tomado y modificado de Rodríguez-Ortiz & Bermudez-Rattoni, 2017).

Estudios en modelos animales han demostrado que el mantenimiento de la adicción puede ser interrumpido por agentes amnésicos administrados cerca del momento de la evocación de la memoria (Lee et al., 2005; Miller & Marshall, 2005). De hecho, se ha reportado que la infusión de anisomicina, un inhibidor de la síntesis proteica, en la aIC inmediatamente después de la reactivación de la memoria provoca una pérdida reversible del condicionamiento preferencia de lugar asociado con anfetamina (Contreras et al., 2012). Por otro lado, se ha reportado que la memoria asociada a las drogas se reconsolidada de una manera similar a la memoria aversiva y que esta reconsolidación dependiente de la amígdala se puede interrumpir para reducir el impacto de la búsqueda de drogas (Lee et al., 2005). También, se ha demostrado que la señalización glutamatérgica en el receptor NMDA es necesaria para la reconsolidación de la memoria adictiva.

Los antagonistas del receptor NMDA administrados durante la evocación de la memoria, impiden la reconsolidación del condicionamiento de preferencia de lugar (CPL) asociado a la cocaína (Kelley et al., 2007; Brown et al., 2008; Itzhak, 2008), anfetamina (Sadler et al., 2007; Sakurai et al., 2007) y morfina (Zhai et al., 2008). Además, se ha demostrado que los antagonistas del receptor NMDA interrumpen la reconsolidación de la memoria adictiva en procesos susceptibles como el restablecimiento de la búsqueda de alcohol inducida por señales (Von Der Goltz et al., 2009) y la adquisición de una nueva respuesta instrumental para un reforzador condicionado previamente asociado con la cocaína (Milton et al., 2008).

Actualmente, todos los datos sobre los mecanismos glutamatérgicos de la reconsolidación de la memoria adictiva se han centrado en el receptor de glutamato NMDA. Sin embargo, algunos reportes sobre el receptor glutamatérgico AMPA indican que este receptor no parece estar involucrado en la desestabilización de la memoria adictiva (Ben Mamou et al., 2006; Milton & Everitt, 2010).

## 2. JUSTIFICACIÓN Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

A pesar de que históricamente la IC ha sido una estructura cerebral relacionada con diferentes tipos de memoria como la memoria gustativa y la memoria de reconocimiento (Benjamin & Golden, 1985; Augustine, 1996; Bermudez-Rattoni, 2004; Kurth et al., 2010; Bermudez-Rattoni 2014), recientemente se ha demostrado que la IC, específicamente el área agranular (aIC), también participa en procesos de memoria no adaptativos, como el mantenimiento a las drogas de abuso (Di Pietro & Mashhoon, 2008; Contreras et al., 2012; Abdolahi et al., 2005; Cosme et al., 2015; Pushparaj et al., 2015; Arguello et al., 2017; Rotge et al., 2017; Haaranen et al., 2020). La adicción a las drogas es un disturbo patológico que comparte mecanismos celulares y moleculares con los procesos normales de aprendizaje y memoria (Pulvirenti & Diana, 2001; Lapish et al., 2006), produciendo cambios neuronales que conducen a una profunda desregulación en los circuitos involucrados en los procesos conductuales de motivación y recompensa (Pierce & Kumaresan, 2006). Uno de los principales problemas en la adicción es la alta resistencia a la extinción de las señales asociadas con las drogas, lo que contribuye a la alta tasa de recaída en personas adictas (Alberini et al., 2006, Bouton, 2004). La extinción y la reconsolidación son las fases más estudiadas en el mantenimiento de la memoria adictiva debido a que ofrecen la oportunidad de modificar la respuesta conductual de los estímulos asociados con las drogas (Fuchs et al., 2009; Milton & Everitt, 2010). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar la neurotransmisión, los mecanismos celulares y las respuestas electrofisiológicas en la aIC que están involucrados en el mantenimiento de la memoria adictiva dependiente del contexto, a través de la comunicación que existe entre la aIC con dos estructuras que forman parte del circuito de recompensa, el área ventral tegmental (VTA) y la amígdala basolateral (BLA).

### **3. HIPÓTESIS**

La corteza insular anterior (aIC) participa en el mantenimiento de la memoria adictiva dependiente del contexto a través de la comunicación que existe con dos estructuras, el área ventral tegmental (VTA) y la amígdala basolateral (BLA).

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la neurotransmisión, los mecanismos celulares y las respuestas electrofisiológicas en la aIC que están involucrados en el mantenimiento de la memoria adictiva dependiente del contexto, manipulando optogenéticamente las proyecciones del VTA y la BLA.

#### **4.1 Objetivos particulares**

- Determinar la concentración extracelular de diferentes neurotransmisores y evaluar las respuestas electrofisiológicas en la aIC durante la estimulación optogenética de los somas del VTA para evaluar la funcionalidad de la vía.
- Activar optogenéticamente las neuronas dopaminérgicas de la vía VTA→aIC para establecer un CPL robusto y de esta manera generar un modelo conductual que nos permita evaluar el mantenimiento de la memoria adictiva dependiente del contexto.
- Determinar la concentración extracelular de diferentes neurotransmisores en la aIC durante la adquisición y la evocación del CPL para caracterizar la neurotransmisión durante la formación y mantenimiento de la memoria adictiva dependiente del contexto.
- Determinar el efecto del bloqueo de los receptores glutamatérgicos, dopaminérgicos y noradrenérgicos en la aIC durante la evocación del CPL para conocer los mecanismos celulares involucrados en el mantenimiento de la memoria adictiva dependiente del contexto.
- Evaluar las respuestas electrofisiológicas en las neuronas de la aIC durante la inhibición optogenética de las proyecciones glutamatérgicas de la BLA para evaluar la funcionalidad de la vía.
- Inhibir optogenéticamente las proyecciones glutamatérgicas de la BLA hacia la aIC durante la evocación del CPL para conocer si esta vía participa en el mantenimiento de la memoria adictiva dependiente del contexto.



## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Sujetos experimentales

Los sujetos de experimentación fueron ratones transgénicos TH-Cre (tirosina hidroxilasa, línea FI12) que expresan la proteína Cre-recombinasa bajo el promotor endógeno de tirosina hidroxilasa. El pie de cría fue donado por el Dr. Rui M. Costa de Champalimaud Centre for the Unknown y se cruzaron con ratones C57BL / 6J durante al menos seis generaciones.

Los ratones TH-Cre experimentales machos y hembras tenían de 3 a 4 meses de edad (23-35 g de peso corporal) al inicio de los experimentos. No se encontraron diferencias entre ratones TH-Cre machos y hembras en ninguno de los experimentos realizados. Los ratones se alojaron individualmente en cajas de acrílico transparentes con alimento y agua disponibles *ad libitum*, con ciclo luz/oscuridad de 12/12 h, temperatura de  $22 \pm 2$  °C, y humedad relativa de  $50 \pm 5\%$ .

Las tareas conductuales se llevaron a cabo durante la fase de luz del ciclo. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del Instituto de Fisiología Celular (FBR125-18) y cumplieron con las pautas establecidas en la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

### 5.2 Genotipificación

Se utilizó el método de lisis alcalina para la extracción de ADN (Rudbeck & Dissing, 1998). El método consistió en lisar 1 mm de cola en un reactivo alcalino (NaOH 25 mM, EDTA 0.2 mM) en condiciones de calor (95 °C, 1 h) y neutralización adicional con una solución tampón (Tris-HCl 1 M a pH 7,5). Después de centrifugar a 2500 rpm durante 2 minutos, se recuperó el sobrenadante que contenía el ADN. Este ADN se usó para la amplificación de PRC con el kit QIAGEN. Los cebadores utilizados para PCR fueron Cre Reverse 5'GGTTTCCCGCAGAACCTGAA y Cre Forward 5'AGCCTGTTTTGCACGTTCCACC.

### 5.3 Vectores virales

Los virus adenoasociados inducibles por Cre (AAV) fueron obtenidos de University of North Carolina (UNC) Gene Therapy Center (GTC) vector core. La concentración viral fue de  $5.2 \times 10^{12}$  moléculas virales/ml para rAAV5 / Efl $\alpha$ -DIO-hChR2 (H134R) -eYFP (ChR2);  $6.0 \times 10^{12}$  moléculas virales/ml para rAAV5 / Efl $\alpha$ -DIO-eYFP (eYFP);  $5.2 \times 10^{12}$  moléculas virales/ml para rAAV5-CamKIIa-eEYFPeYFP (eNpHR3.0);  $5.1 \times 10^{12}$  moléculas virales/ml para rAAV5-CamKIIa-eYFP (eYFP). Los virus se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

## 5.4 Cirugía estereotáxica

Los ratones fueron anestesiados con isoflurano (inducción 3%, mantenimiento 1-1.5%, matriz ViP 3000). Las agujas de microinyección (29-G) se conectaron a una jeringa Hamilton de 10  $\mu$ l y se llenaron con el vector viral. Para todos los experimentos, los ratones fueron inyectados bilateralmente con el vector viral (0.5  $\mu$ l) a una velocidad de 0.1  $\mu$ l/minuto con 5 minutos adicionales para una difusión completa. Los ratones fueron implantados con fibras ópticas centrales de 200  $\mu$ m a través de férulas de circonio de 1.25 mm de ancho, en cada hemisferio. Los vectores virales ChR2 o eYFP se inyectaron en el VTA (de Bregma (mm): - 3.08 AP,  $\pm$  0.60 ML, y - 4.80 DV). Los vectores virales eNpHR3.0 o eYFP se inyectaron en el BLA (de Bregma (mm): - 2.05 = AP,  $\pm$  3.40 ML y - 5.30 DV). Las fibras ópticas se implantaron por encima del VTA (de Bregma (mm): - 3.08 AP,  $\pm$  1.20 ML, y - 4.30 DV a un ángulo de 10°) o en la aIC (1.70 AP,  $\pm$  2.60 ML, y - 2.75 DV). Para los experimentos de microdiálisis, se implantó unilateralmente una cánula guía (CMA/7: Microdiálisis CMA) en la aIC (de Bregma (mm): + 1.40 AP,  $\pm$  3.30 ML y - 3.5 DV). Para los experimentos farmacológicos, los ratones fueron implantados con cánulas de guía bilaterales (C316G-24 ga, Plastics One) en la aIC (de Bregma (mm): + 1.40 AP,  $\pm$  3.30 ML - 3.0 DV). Todas las coordenadas de referencia fueron tomadas del atlas del cerebro del ratón de Allen.

## 5.5 Procedimientos generales

Los experimentos de conducta comenzaron 4 semanas después de la cirugía de infección en el VTA para permitir la expresión suficiente de las opsinas. Los ratones recibieron estimulación optogenética en el VTA o aIC a través de fibras ópticas multimodales (Thorlabs), mediante un láser de estado sólido bombeado por diodos (473 nm o 532 nm, 150 mW; Sistemas láser OEM) con una salida de 62.5  $\mu$ m de diámetro (Thorlabs) que pasó a través de una junta rotatoria óptica de un solo canal antes de dividirse 50:50 con un acoplador óptico fusionado. La intensidad de la salida de luz fue de 15 mW por fibra dividida para todos los experimentos. Los ratones se conectaron al láser justo antes de comenzar cada sesión conductual o de microdiálisis. Se montó una cámara de video sobre los compartimentos de preferencia de lugar acondicionado y se rastreó el tiempo pasado en cada compartimento con el software informático Debut Video Capture-NCH.

## **5.6 Condicionamiento de preferencia de lugar acoplado a la estimulación optogenética**

La caja de CPL (20x20x42 cm) consistió en una arena acrílica dividida a la mitad con dos señales visuales diferentes. Un lado tenía rayas negras/blancas y el otro lado tenía círculos negros/blancos. La posición de las señales visuales siempre fue contrabalanceada en la sala donde se realizaron los experimentos. Los ratones siempre fueron libres de explorar la arena acrílica permitiendo el paso entre ambos lados. Durante la sesión de pre-condicionamiento (día 1), los ratones exploraron la arena durante 10 minutos. Los ratones fueron condicionados en el lado donde pasaron menos tiempo durante la sesión de pre-condicionamiento. Durante las sesiones de condicionamiento que duraron 20 minutos (día 2-4), se activó optogenéticamente el VTA de los ratones mientras estaban en el lado condicionado. El láser azul (473 nm) se pulsó a 20 Hz (5 ms de ancho) y 12-14 mW. En los experimentos, se incluyeron todos los ratones ChR2 que pasaron al menos el 75% del tiempo total durante la tercera sesión de condicionamiento en el lado donde se encendió el láser (lado condicionado). Durante la sesión de post-condicionamiento (día 5), los ratones ChR2 y eYFP exploraron la arena durante 10 minutos sin estimulación. Por otro lado, los ratones inyectados en la BLA con NpHR3.0 (y los correspondientes ratones de control eYFP) recibieron inhibición optogenética en la aIC durante toda la sesión de post-condicionamiento (día 5). El láser verde (532 nm) se pulsó constantemente a 12-14 mW. Para todos los ratones, se realizaron sesiones de extinción durante 10 minutos posteriores al condicionamiento (días 6-8) y al restablecimiento (días 10-16) del CPL. La sesión de restablecimiento fue de 5 minutos (día 9) y consistió en la activación optogenética del VTA mientras los ratones estaban en el lado previamente condicionado, utilizando los mismos parámetros de estimulación que las sesiones de condicionamiento. El índice de preferencia en el lado condicionado se calculó dividiendo el tiempo pasado en el lado condicionado entre el tiempo total de exploración.

## **5.7 Microdiálisis**

Los procedimientos de microdiálisis comenzaron conectando la entrada de la sonda (CMA7 Microdialysis Probes, con una longitud total de membrana de 2 mm) al sistema de bomba de microinfusión (CMA/Microdiálisis), que infundió continuamente la solución Ringer (NaCl 144 mM, KCl 4.8 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.2 mM y CaCl<sub>2</sub> 1.7 mM) a una velocidad de 0.25 µl/min. Los primeros 60 minutos de muestreo se tomaron como un período de estabilización. A través de la membrana de microdiálisis, se colectaron un total de 6 muestras consecutivas en fracciones de 16 min (4

µl) en viales que contenían 1 µl de una mezcla antioxidante (ácido ascórbico 0.25 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 0.27 mM y ácido acético 0.1 M). El período de estabilización se hizo en una caja de madera (30x17x19 cm) con dos puertas laterales. La caja de madera estaba dentro de la caja de CPL o de la cámara de microdiálisis (diámetro 30 cm x altura 30 cm), en ambos casos se tomaron 3 muestras como basales. Una vez que la muestra 3 se había colectado por completo, se abrieron las puertas laterales y se retiró la caja de madera después de que el ratón salió. Los ratones ChR2 y eYFP que entraron a la caja de CPL fueron condicionados previamente y la muestra 4 se colectó mientras realizaban la sesión de post-condicionamiento. Mientras que, los ratones ChR2 y eYFP que no fueron condicionados permanecieron en la cámara de microdiálisis y la muestra 4 se colectó durante la activación optogenética del VTA. Se colectaron 2 muestras más después del estímulo. Las muestras se almacenaron a -80 ° C hasta que se analizaron con el método de electroforesis capilar.

Las muestras se derivatizaron con 5-furoilquinolina-3-carbaldehído (FQ) y se analizaron mediante un sistema de electroforesis capilar (Beckman-Coulter PACE/MDQ, sistema de glicoproteína) con detección de fluorescencia inducida por láser. En la reacción de derivación se añadieron 4 µl de una muestra con 1 µl de patrón interno (1 mg/ml, O-metil-L-treonina), se mezclaron con 6 µl de FQ (16.67 mM) y 2 µl de KCN (25 mM). La mezcla reacciona en la oscuridad (65°C) durante 15 minutos y la reacción se detiene con hielo. La identificación de neurotransmisores se basa en el tiempo de retención en un sistema tampón de cromatografía electrocinética micelar (MEKC) que incluye boratos 35 mM, dodecil sulfato de sodio (SDS) 25 mM, 13% de metanol grado HPLC, a pH 9.5. Las muestras se inyectaron hidrodinámicamente a 0.5 psi durante cinco segundos; la separación se realizó a 20kV. Mientras las moléculas migran dentro del capilar, se mueven a una ventana donde un láser de iones de argón las excita a 488 nm. Luego, la fluorescencia pasa mediante un filtro de interferencia de paso de banda a 590 nm y se detecta mediante un tubo fotomultiplicador. La señal se tradujo en picos que forman un electroferograma donde se puede analizar por comparación el área bajo la curva (AUC) de la muestra desconocida con el AUC de un estándar interno conocido. Los datos se analizaron usando el Karat System Gold (Beckman Coulter). Todos los resultados se convirtieron en porcentaje de liberación basal (% basal = concentración de neurotransmisor x 100/media de las tres primeras muestras).

## 5.8 Inmunofluorescencia

Después de las tareas conductuales los ratones fueron administrados con pentobarbital sódico a una dosis de 75 mg/kg por vía intraperitoneal y perfundidos con solución salina isotónica (SSI) y fijados con paraformaldehído al 4%. Los cerebros fueron tratados con PFA 4% durante 7 días y posteriormente con sacarosa al 30% por 4 días. Los cerebros se cortaron en el criostato Leica CM520 y se obtuvieron cortes de 40  $\mu$  para realizar la inmunohistoquímica contra tirosina hidroxilasa. Se incubaron cortes coronales en flotación con anticuerpo primario policlonal de conejo anti-tirosina hidroxilasa (Pel-Freez, Rogers, AR) disuelto en tampón de albúmina de suero bovino al 5% (NaCl 150 mM, Triton X-100 0.1%, base trizma 100 mM, pH 7.4) a una dilución de 1:1000 durante la noche. Los cortes coronales se lavaron con solución salina tamponada con Tris y se incubaron con anticuerpo secundario IgG de cabra anti-conejo conjugado con el fluoróforo CY3 (Millipore, Darm-Stadt, Alemania) disuelto en tampón de albúmina de suero bovino al 5% a una dilución de 1:250 durante 2 h. Los cortes coronales se montaron en medio de montaje de fluorescencia Dako con 4',6-diamidino-2-fenilindol. Se observó la inmunofluorescencia usando un microscopio confocal ZEISS LSM 800.

## 5.9 Registro eléctrico durante la activación optogenética del VTA

Los ratones TH-Cre fueron inyectados con ChR2 bilateralmente en el VTA (de Bregma (mm): - 3.0 AP,  $\pm$  0.60 ML, - 4.80 DV) y se permitió 3 semanas de recuperación para la expresión de la opsina. Después de este tiempo, los ratones fueron implantados bilateralmente con fibras ópticas en el VTA (de Bregma (mm): - 3.0 AP,  $\pm$  1.20 ML, - 4.30 DV, ángulo de 10°) como se describió anteriormente, pero en este caso, un arreglo de 16 cables de tungsteno se implanto unilateralmente en la aIC (de Dura (mm): +1.4 AP,  $\pm$  3.30 ML, - 3.20 DV). Otro grupo de ratones se les implantó un optrodo (16 alambres de tungsteno, 35  $\mu$ m cada uno) que rodeaba la fibra óptica en el VTA (de Dura (mm): - 3.0 AP,  $\pm$  0.60 ML, - 4.0 DV). Se les permitió a los ratones recuperarse una semana más. Los ratones fueron registrados durante un escaneo de frecuencias de láser, donde recibieron una frecuencia aleatoria de estimulación durante 1 s encendido, seguido de 2 s apagado, y la siguiente frecuencia se eligió al azar. Las frecuencias de estimulación fueron: control (sin estimulación), 4, 7, 20, 33, 50 Hz (ancho de pulso de 5 ms) y un pulso continuo de 1 s. El escaneo se realizó durante 20 min. Los ratones se registraron en un máximo de 9 sesiones consecutivas.

## **5.10 Registro eléctrico durante la inhibición optogenética de las fibras BLA→aIC**

Un grupo de ratones TH-Cre (NpHR3.0/ChR2) fueron inyectados con ChR2 bilateralmente en el VTA (de Bregma (mm): - 3.08 AP,  $\pm$  0.60 ML, y - 4.80 DV) y NpHR3.0 bilateralmente en la BLA (de Bregma (mm): - 2.05 AP,  $\pm$  3.40 ML, y - 5.30 DV), se permitieron 3 semanas de recuperación para la expresión de las opsinas. Después de eso, se implantó un optrodo unilateralmente en el aIC (de Dura (mm): +1.4 AP,  $\pm$  3.30 ML, - 3.20 DV). Otro grupo de ratón TH-Cre (NpHR3.0) fueron inyectados solo con NpHR3.0 bilateralmente en la BLA (de Bregma (mm): - 2.05 = AP,  $\pm$  3.40 ML, y - 5.30 DV) y se implantó un optrodo en la aIC (de Dura (mm): +1.4 AP,  $\pm$  3.30 ML, - 3.20 DV) después de 3 semanas. Después de la cirugía, se permitió a los ratones una semana adicional para la recuperación. Luego, ambos grupos de ratones fueron registrados en la aIC mientras se inhibían optogenéticamente las fibras BLA→aIC durante una tarea de bucle abierto que consistía en bloques de 1 min encendido con láser y 1 min apagado durante un tiempo total de 30 min (pulsación constante a 12-14 mW y 532 nm), en 7 sesiones consecutivas.

## **5.11 Registros extracelulares**

La actividad neuronal se registró utilizando un sistema Procesador de Adquisición Multicanal (Plexon, Dallas, TX) interconectado con un Med Associates en el lado condicionado del CPL para registrar los eventos conductuales simultáneamente. Las señales de voltaje extracelular se amplificaron primero x1 mediante un escenario analógico (Plexon HST / 16o25-GEN2-18P-2GP-G1), luego se amplificaron (x1000) y se tomaron muestras a 40 kHz. Las señales sin procesar se filtraron en paso de banda de 154 Hz a 8,8 kHz y se digitalizaron a una resolución de 12 bits. Solo se analizaron neuronas individuales con potenciales de acción con una relación señal/ruido a una tasa de 3:1. Los potenciales de acción se aislaron en línea utilizando ventanas de umbral de tiempo de voltaje y el algoritmo de plantillas de contorno de tres componentes principales. Se asignó un grupo de formas de onda a una sola unidad si se cumplían dos criterios: los intervalos entre espigas eran mayores que el período refractario establecido en 1 ms, y si una nube elipsoide visible compuesta por las proyecciones tridimensionales de los primeros tres componentes principales Se formó un análisis de formas de onda de espiga. Los picos se clasificaron utilizando el software Offline Sorter (Plexon, Dallas, TX) 67. Solo se analizaron las marcas de tiempo de las formas de onda ordenadas sin conexión. Todos los datos electrofisiológicos se analizaron utilizando MATLAB (The MathWorks Inc., Natick, MA).

## 5.12 Estadística y reproducibilidad

Los datos conductuales y de microdiálisis se analizaron en GraphPad Prism 8. Cuando la distribución de los datos fue normal de acuerdo con la prueba de Kolmogorov-Smirnov, se utilizó una ANOVA de dos vías con la corrección Geisser-Greenhouse para datos no homocedásticos. La prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni o Tukey se realizaron cuando los datos eran paramétricos. Los datos con distribución no paramétrica se analizaron con la prueba de Mann-Whitney. Todos los datos se muestran como media  $\pm$  SEM. La significancia se fijó en  $\alpha=0.05$ . el análisis estadístico fue de dos colas. El análisis electrofisiológico se realizó con Matlab 2015a. En el caso de los registros electrofisiológicos, la tasa de disparo se comparó utilizando una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis seguida de una prueba post hoc de Tukey-Kramer. Las neuronas cuyas tasas de disparo fueron significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) del ensayo control durante el período de "encendido del láser" en cualquier frecuencia del láser se clasificaron como moduladas. La diferencia entre las tasas de disparo durante la estimulación con láser versus los ensayos control determinaron el signo de la modulación. Para los datos conductuales, el tamaño de la muestra fue el mínimo necesario para obtener un umbral de efecto de tamaño de 0.5 mediante la prueba d de Cohen que divide la diferencia entre las medias y la desviación estándar agrupada. Debido a nuestra experiencia previa en estudios de microdiálisis, utilizamos el número mínimo de ratones para obtener una significancia estadística mediante el análisis no paramétrico. Para los registros electrofisiológicos, nuestro tamaño de muestra se basó en estudios previos similares y todos los grupos se replicaron de forma independiente. El análisis de datos fue realizado por ciegos, es decir, los ratones se identificaron solo después de obtener los parámetros conductuales, electrofisiológicos o de microdiálisis.

## 6. RESULTADOS

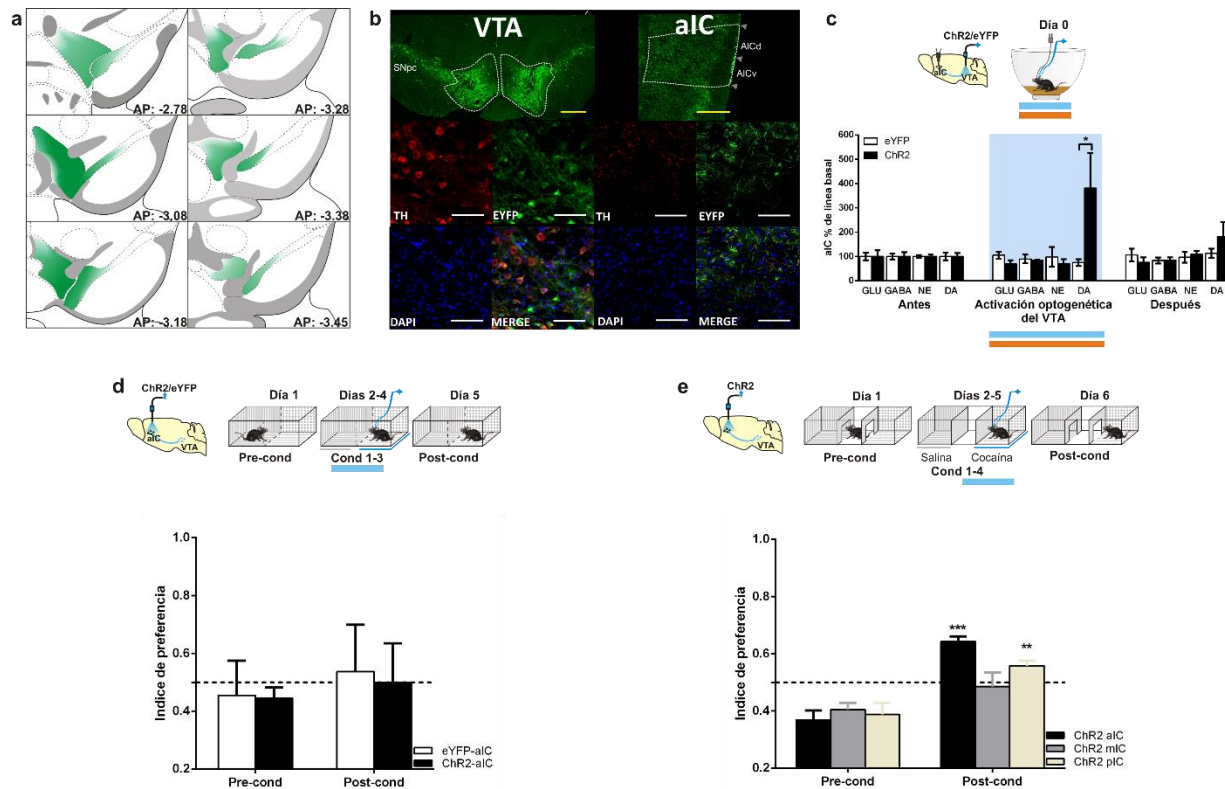
### 6.1 La activación optogenética de las terminales TH+ en la aIC provenientes del VTA con cocaína establece un CPL

Para estudiar la vía dopaminérgica VTA→aIC, se caracterizó la expresión de la proteína eYFP en los somas de las neuronas TH+ del VTA y en las terminales de la aIC provenientes del VTA de ratones transgénicos TH-cre. Para este fin, se analizaron cortes coronales del VTA y de la aIC. Observamos que las neuronas del VTA con inmunoreactividad endógena de la proteína TH fueron positivas para la proteína reportera eYFP cerca del sitio de inyección viral. Del mismo modo, en cortes coronales de la aIC, la expresión de eYFP colocalizó con las terminales TH+ del VTA (Fig. 1a y b). También, se determinó la concentración extracelular de dopamina, noradrenalina, glutamato y ácido gamma-aminobutírico (GABA) en la aIC a través de electroforesis capilar durante la activación optogenética de las neuronas TH+ del VTA (Fig. 1c). El análisis de neurotransmisores reveló un aumento de la concentración extracelular de dopamina en la aIC cuando se estimularon optogenéticamente las neuronas TH+ del VTA (Fig. 1c). Para saber si las proyecciones provenientes del VTA a la aIC participaban en la memoria adictiva dependiente de contexto, decidimos estudiar esta vía durante la formación de dicha memoria. Para ello, infectamos las neuronas TH+ del VTA y activamos optogenéticamente las terminales TH+ de la aIC durante las sesiones de condicionamiento (1-4 Cond) (Fig. 1d). Encontramos que los ratones que expresaban el canal catiónico channelrhodopsin-2 (ChR2) entrenados durante 4 sesiones de 20 minutos en 4 días consecutivos (una sesión por día) no desarrollaron preferencia por el lugar asociado a la estimulación optogenética (Fig. 1d).

La cocaína es un psicoestimulante que bloquea la bomba de recaptura de las monoaminas, incluida la dopamina (Heikkila et al., 1975), y aumenta los niveles de este neurotransmisor en algunas regiones del cerebro como en el VTA (Heidbreder et al., 1996). También, se ha demostrado la participación de la aIC en el desarrollo y mantenimiento de la pérdida de control sobre el consumo de cocaína (Pelloux et al., 2013; Rotge et al., 2017). De acuerdo con estos antecedentes, decidimos estimular optogenéticamente las terminales TH+ de la aIC y simultáneamente administrar por vía intraperitoneal una dosis baja de cocaína (5 mg/kg) para evaluar si era posible establecer un CPL robusto. Los ratones que fueron sometidos a este protocolo aumentaron el tiempo de permanencia en el lugar condicionado (Fig. 1e). Es importante mencionar que, aunque los datos no son mostrados en la gráfica, encontramos que la administración de la dosis baja de cocaína en el grupo de ratones eYFP (control) no aumentó la



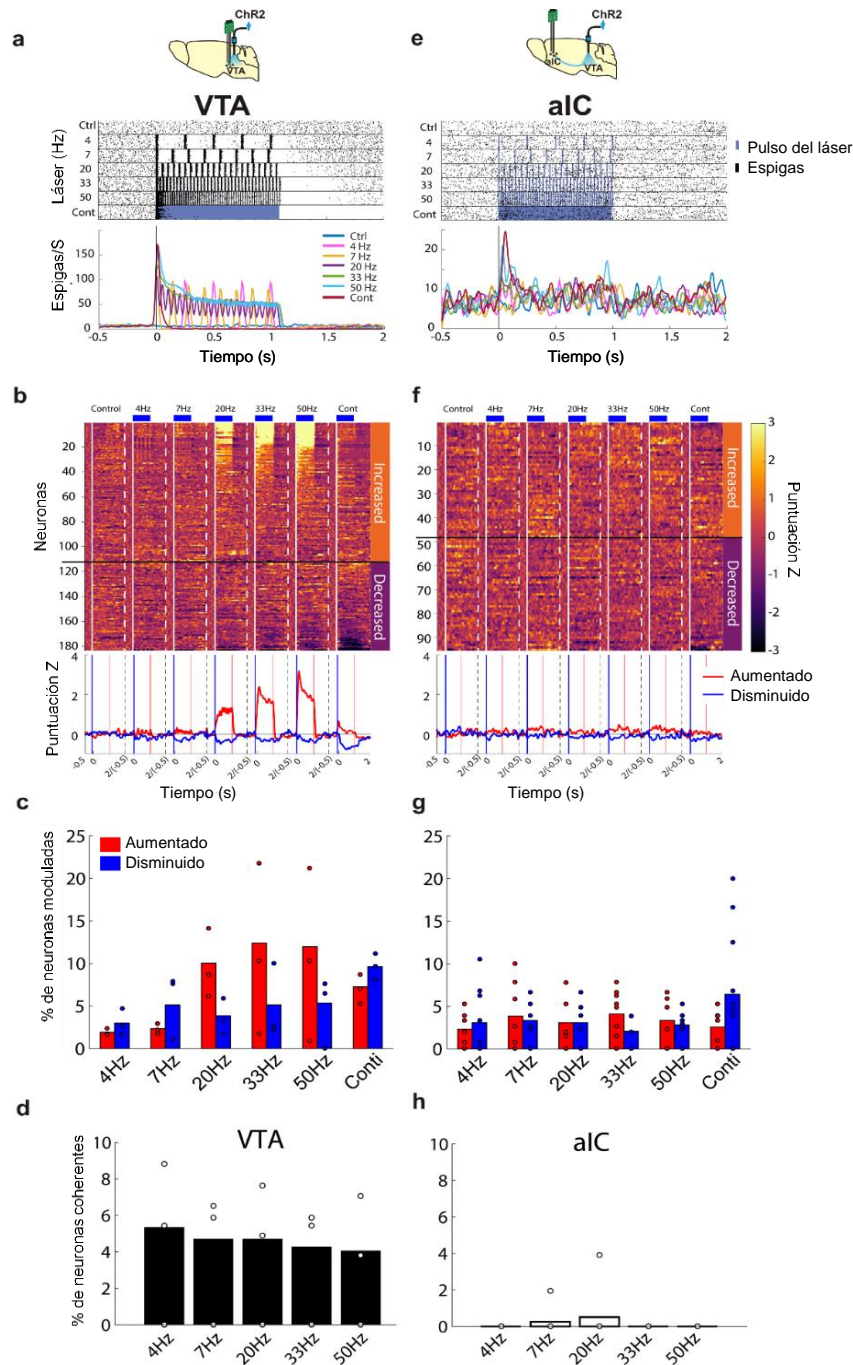
preferencia por el lugar condicionado. Los ratones estimulados optogenéticamente en las terminales TH+ de la corteza medial (mIC) y posterior (pIC) simultáneamente con una dosis baja de cocaína no desarrollaron preferencia por el lugar condicionado (Fig. 1e). Este resultado indica que la activación optogenética de las terminales TH+ en la aIC provenientes del VTA son necesarias, pero no suficientes para establecer un CPL.



**Figura 1. La activación optogenética de terminales TH+ en la aIC provenientes del VTA con cocaína establece un CPL. a)** Diagrama de infección y difusión del virus en el eje anteroposteior del VTA. **b)** Imágenes representativas de la triple inmunofluorescencia TH (rojo), diclorhidrato de 4',6-diamidina-2'-fenilindol (DAPI, azul) y eYFP (verde) en los somas de VTA y en sus proyecciones a la aIC. En el merge se muestra la colocalización. La barra de escala amarilla representa 500  $\mu\text{m}$  y la barra de escala blanca representa 100  $\mu\text{m}$ . SNpc, sustancia negra pars compacta; AICd, corteza insular agranular dorsal; AICv, corteza insular agranular ventral. **c)** Concentración extracelular relativa de neurotransmisores en comparación con la línea basal antes, durante y después de la activación optogenética de las neuronas TH+ del VTA (barra azul) en ratones eYFP (n=4) y ChR2 (n=4). Las barras horizontales azules indican la activación optogenética de las neuronas TH+ del VTA a 20 Hz (5 ms), 12-14 mW y 473 nm. La microdiálisis *in vivo* (barra naranja) reveló que la concentración extracelular de dopamina (DA) aumentó durante la estimulación VTA en ratones ChR2. Para DA, la prueba de Mann-Whitney mostró diferencia entre eYFP y ChR2 durante la estimulación VTA U-valor=0, P=0.0286. La noradrenalina (NA), el glutamato (GLU) y el ácido gamma aminobutírico (GABA) no mostraron cambios estadísticamente significativos. **d)** La preferencia de los compartimentos se determinó durante el pre-condicionamiento (Pre-cond). La estimulación optogenética se realizó en el lugar menos preferido. En el post-condicionamiento (Post-cond), se evaluó la preferencia del lugar. Los ratones eYFP (n=6) y ChR2 (n=8) fueron condicionados durante cuatro sesiones con estimulación optogenética en las terminales TH+ en la aIC provenientes del VTA. Los ratones no mostraron preferencia por el lugar que fue asociado con la estimulación optogenética. La prueba t de student no mostró efecto de grupo. **e)** Los ratones fueron condicionados durante cuatro sesiones con estimulación optogenética de las terminales TH+ provenientes de VTA en la corteza insular anterior (aIC) (n=7), corteza insular medial (mIC) (n=7) o corteza insular posterior (pIC) (n=7) y simultáneamente administrados con 5 mg/kg de cocaína por vía intraperitoneal. La prueba t de Student mostró efecto de grupo. Todos los datos se muestran como media  $\pm$  SEM. Las líneas horizontales discontinuas indican azar. \* P < 0.05, \*\*\* P < 0.0001.

## 6.2 Modulación de la aIC por activación optogenética de las neuronas TH+ del VTA

Para caracterizar la modulación funcional de la vía VTA→aIC, se realizaron registros electrofisiológicos en el VTA o en la aIC de ratones silvestres en libre movimiento durante la activación optogenética de las neuronas TH+ del VTA. La figura 2a representa un gráfico de trama y un histograma de tiempo periestimulo (PSTH) de una neurona representativa del VTA que respondió eléctricamente a la estimulación optogenética. Esta neurona del VTA respondió fielmente a frecuencias de 4 Hz hasta 20 Hz. A frecuencias más altas y estimulación continua, se observó una respuesta inicial rápida seguida de una disminución gradual de la actividad (Fig. 2a). El componente inhibitorio de la respuesta fue más evidente en la estimulación continua. Se observó el mismo patrón de respuesta al medir la actividad poblacional (Fig. 2b). Las frecuencias de 20, 33 y 50 Hz mostraron un mayor porcentaje de neuronas que exhibieron tasas de disparo aumentadas y disminuidas en comparación con la tasa de disparo de las neuronas control (Fig. 2c). En contraste, las neuronas de la aIC respondieron con una baja fidelidad ante la activación optogenética de las neuronas TH + en el VTA (Fig 2e). El porcentaje de neuronas que respondieron a la estimulación optogenética del VTA en la aIC fue menor que en el VTA (Fig 2f y 2g). A pesar de que la coherencia de las neuronas del VTA es similar en las frecuencias de 4-50 Hz (Fig 2d), en la aIC se observó un ligero aumento en la coherencia de las neuronas a 20 Hz (Fig 2h). Por lo tanto, los registros electrofisiológicos revelaron que 20 Hz (5 ms de ancho, 12-14 mW y 473 nm) era la frecuencia de estimulación óptima para nuestro modelo. Debido a esto, decidimos usar esta frecuencia para todos los experimentos conductuales posteriores.

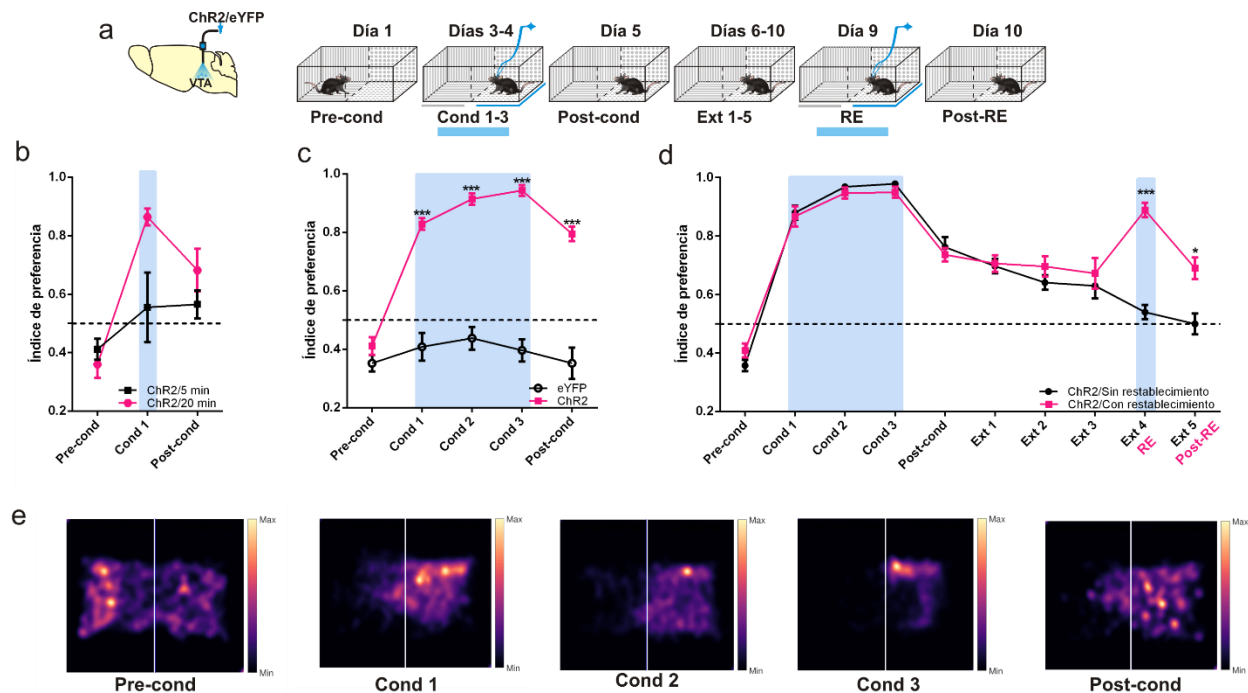


**Figura 2. La activación optogénica de los somas TH+ del VTA evocan una respuesta neuromoduladora en la aIC. a)** Gráfico que representa el disparo neuronal e histograma de tiempo peristimulo (PSTH) correspondiente al registro de una neurona del VTA. Las respuestas se alinearon al inicio de la activación del láser (tiempo =0); los puntos negros indican un potencial de acción único, mientras que las líneas azules indican pulsos del láser. **b)** Mapa de calor de las respuestas poblacionales registradas en el VTA, normalizadas en función de la tasa de disparo del control para cada frecuencia del láser. Las neuronas se clasificaron según su patrón modulador en relación con la actividad en los ensayos del control (prueba de Kruskal-Wallis). Abajo, PSTH de la población correspondiente; las líneas rojas representan neuronas con respuestas aumentadas y azules con respuestas disminuidas en respuesta a la activación del láser. **c)** Porcentaje de neuronas moduladas en el VTA durante la activación optogénica

de los somas de VTA a diferentes frecuencias. **d)** Porcentaje de neuronas con respuestas coherentes a la activación del láser, registradas en el VTA. Cada punto representa el porcentaje de coherencia para un único sujeto. **e)** Gráfico de disparo neuronal e histograma de tiempo peristímulo (PSTH) correspondiente al registro de una neurona del aIC. **f)** Mapa de calor de las respuestas poblacionales registradas en la aIC. **g)** Porcentaje de neuronas moduladas en la aIC durante la activación optogenética de los somas de VTA a diferentes frecuencias. **h)** Porcentaje de neuronas con respuestas coherentes a la activación del láser, registradas en la aIC.

### **6.3 La activación de las neuronas VTA TH + induce CPL**

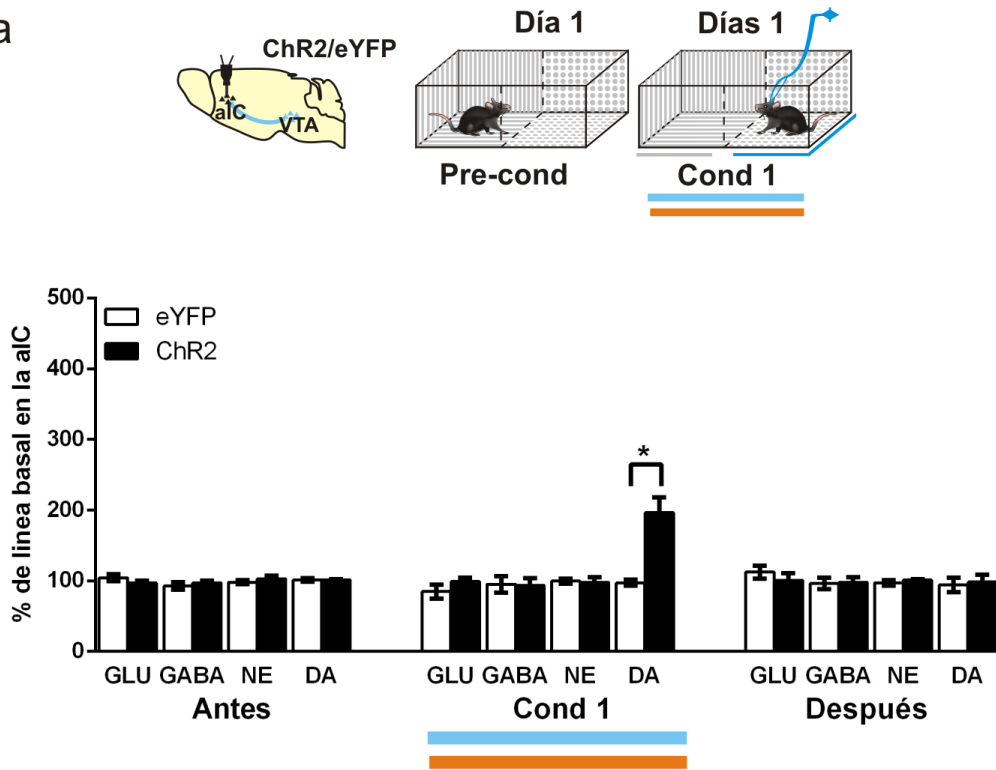
Para evaluar la participación de la aIC durante la extinción de la memoria adictiva dependiente de contexto, decidimos establecer un CPL robusto que mantuviera el condicionamiento durante un largo periodo de tiempo. Para ello, activamos optogenéticamente a las neuronas TH+ del VTA (Fig. 3a). Se observó que los ratones que expresaban el canal catiónico channelrhodopsin-2 (ChR2) entrenados en una sola sesión de 5 o 20 minutos cada una, desarrollaron una baja preferencia por el lugar asociado con la estimulación optogenética (Fig. 3b). Sin embargo, los ratones ChR2 entrenados con tres sesiones (cond 1-3) de 20 minutos en tres días consecutivos (una sesión por día) desarrollaron una fuerte preferencia por el lugar asociado con la estimulación optogenética (Fig. 3c y e). La preferencia por el lugar se mantuvo durante 5 sesiones de extinción continua (una por día) hasta que la preferencia condicionada desapareció por completo (Fig 3d). Con el objetivo de reestablecer la memoria adictiva una vez que ya se había extinguido, ratones ChR2 fueron estimulados (ChR2/ con restablecimiento) optogenéticamente durante una sola sesión de 5 minutos (RI) en el lado previamente condicionado siguiendo el mismo protocolo de adquisición (Fig. 3d). La sesión posterior a la estimulación optogenética de 5 minutos (Post-RI) mostró un restablecimiento de la memoria adictiva, debido a que los ratones aumentaron la preferencia por el lugar condicionado comparados con el grupo de ratones sin restablecimiento de la memoria adictiva. Estos resultados muestran que una vez que se extingue la memoria adictiva dependiente de contexto, una breve activación de las neuronas VTA TH + es suficiente para restablecer la preferencia por el lado condicionado.



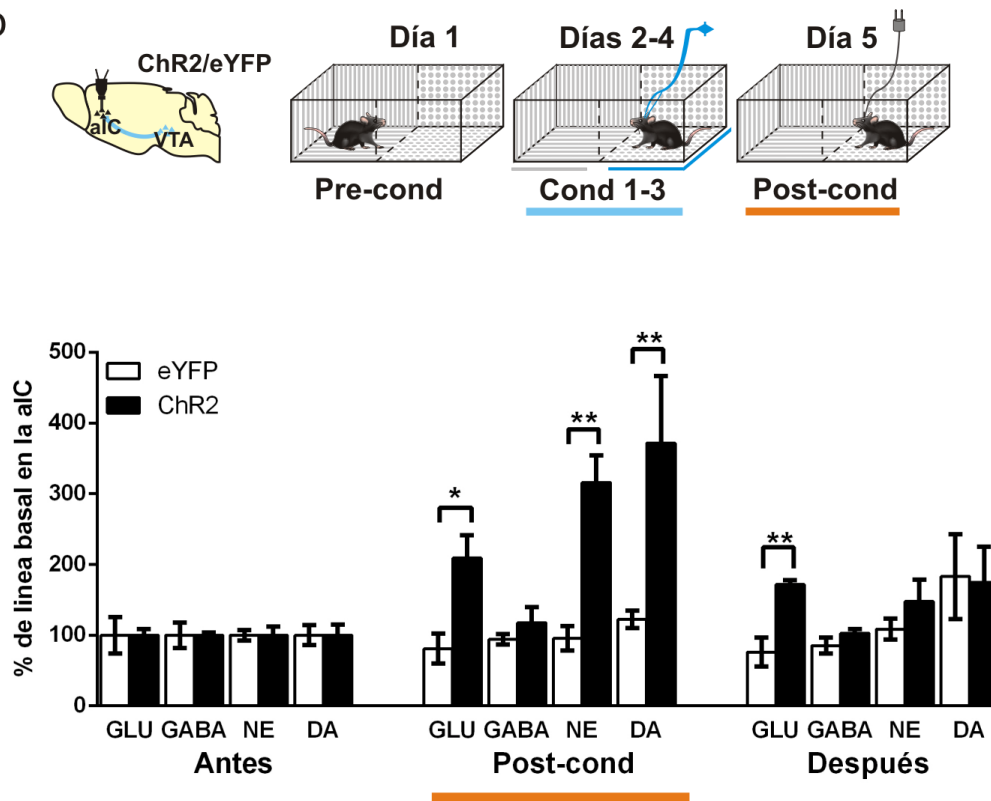
#### **6.4 La evocación de la memoria del CPL induce la liberación de neurotransmisores en la aIC**

Determinamos la respuesta neuroquímica en la aIC provocada por la activación optogenética de las neuronas TH+ del VTA durante el condicionamiento y evocación de la memoria del CPL en ratones. Para esto, utilizamos la técnica de microdiálisis *in vivo* en libre movimiento y electroforesis capilar para determinar la concentración extracelular de dopamina, noradrenalina, glutamato y ácido gamma-aminobutírico (GABA). El análisis de neurotransmisores reveló un aumento de la concentración extracelular de dopamina cuando se estimularon optogenéticamente las neuronas TH+ del VTA durante la primera sesión de condicionamiento (Cond 1) (Fig. 4a). También se determinó la concentración extracelular de dopamina, noradrenalina, glutamato y GABA durante la evocación de la memoria del CPL (post-cond) en ratones previamente condicionados. En la Fig. 4b se muestra un aumento en las concentraciones extracelulares de dopamina, noradrenalina y glutamato. La dopamina aumentó su concentración durante el condicionamiento y durante la evocación de la memoria del CPL, mientras que el glutamato y la noradrenalina solo aumentaron su concentración durante la evocación de la memoria del CPL, lo que indica que estos tres neurotransmisores podrían estar involucrados en el mantenimiento de la memoria adictiva dependiente de contexto.

a



b



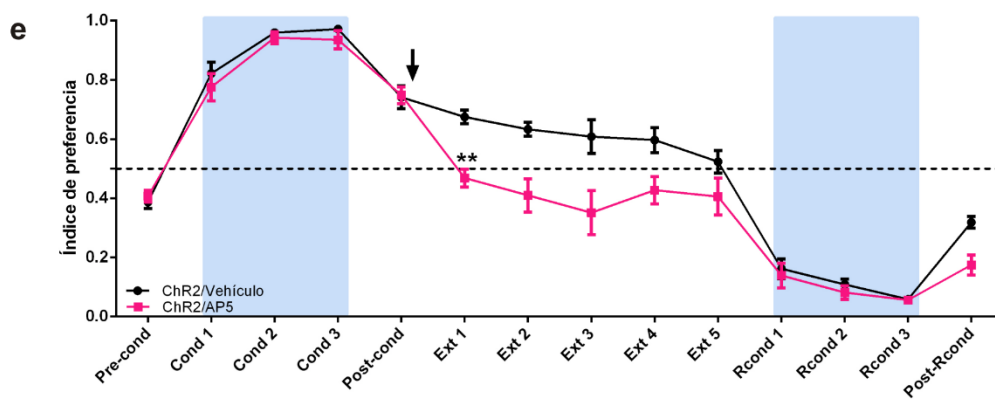
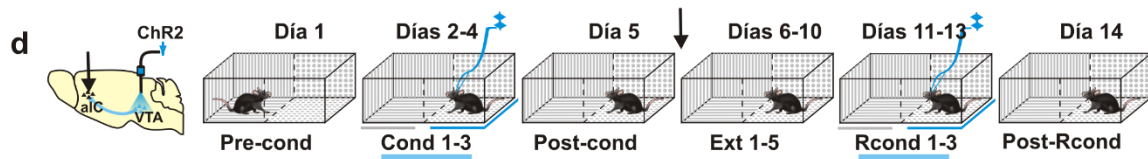
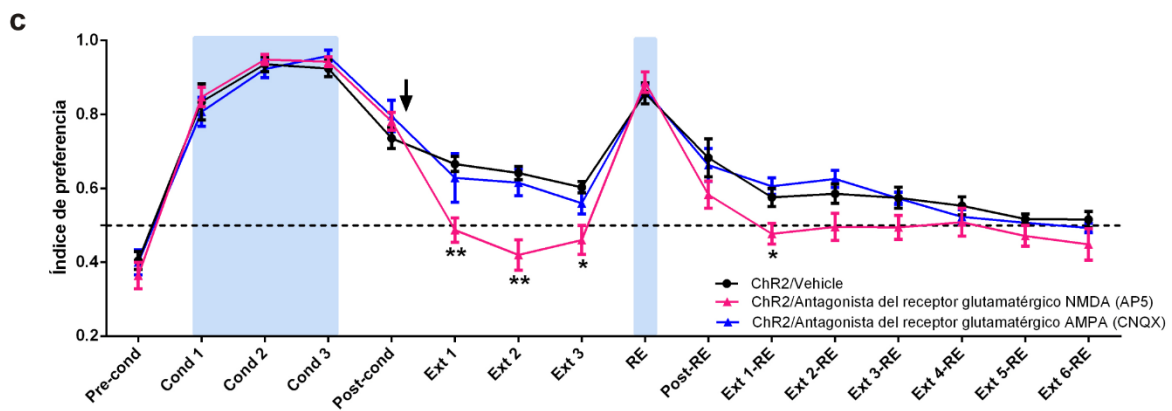
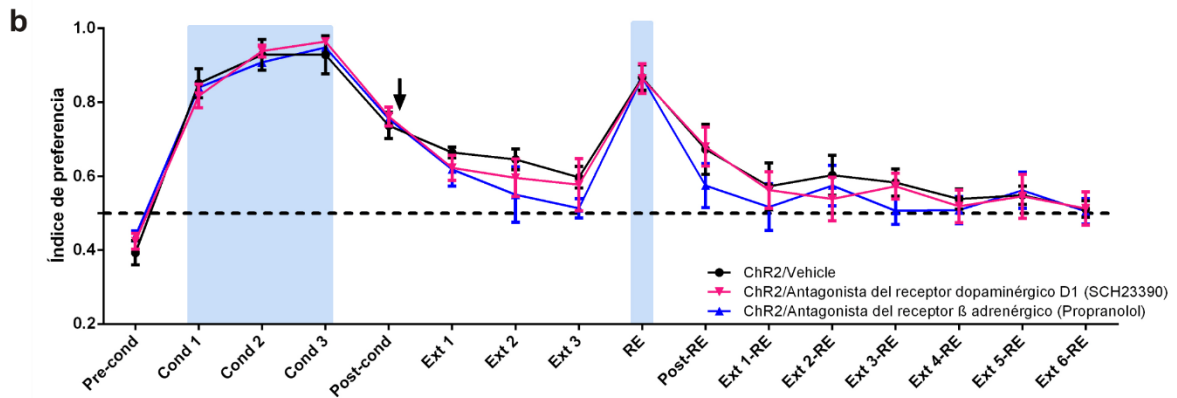
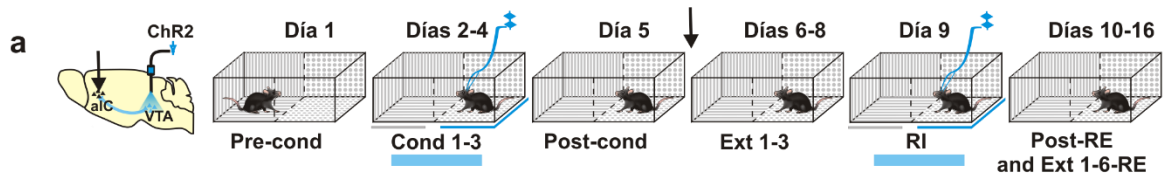


**Figura 4. El condicionamiento induce la liberación de dopamina, mientras que la evocación del CPL induce la liberación de dopamina, noradrenalina y glutamato en la aIC. a)** Arriba se muestra, el diagrama de infección viral, estimulación optogenética de neuronas TH+ en el VTA e implantación de la cánula guía de microdiálisis en la aIC. Abajo se muestra, la concentración extracelular relativa de neurotransmisores en comparación con la línea basal antes, durante y después del primer día de condicionamiento (Cond 1) con activación optogenética de las neuronas TH+ del VTA (barra azul) en ratones eYFP (n=4) y ChR2 (n=4). Las barras horizontales azules indican la activación optogenética de las neuronas TH+ del VTA. La microdiálisis *in vivo* (barra naranja) reveló que la concentración extracelular de dopamina (DA) aumentó durante la estimulación VTA en ratones ChR2. Para DA, la prueba de Mann-Whitney mostró diferencia entre eYFP y ChR2 durante la estimulación VTA U-valor=0, P=0.0286. La noradrenalina (NA), el glutamato (GLU) y el ácido gamma aminobutírico (GABA) no mostraron cambios estadísticamente significativos. **b)** Arriba se muestra, el diagrama de infección por virus, guía de microdiálisis implantación de cánula en aIC y preferencia de lugar de acondicionamiento en tiempo real (CPL). Abajo se muestra, la concentración extracelular relativa de neurotransmisores en comparación con la línea basal antes, durante y después de la evocación de la memoria del CPL (Post-cond) en ratones entrenados eYFP (n=4) y ChR2 (n=6). La microdiálisis *in vivo* (barra naranja) reveló mayor concentración extracelular de DA, NE y GLU debido a la exposición al contexto durante la evocación de la memoria del CPL en ratones ChR2. Para GLU, la prueba de Mann-Whitney mostró diferencia entre eYFP y ChR2 durante el valor U posterior al cond = 1, P = 0.0190 y después del valor U CPL = 0, P = 0.0095. Para NA, la prueba de Mann-Whitney mostró diferencia entre eYFP vs ChR2 durante el valor U posterior al cond=0, P=0.0095. Para DA, la prueba de Mann-Whitney mostró diferencia entre eYFP y ChR2 durante el valor U posterior al cond=0, P=0.0095. Todos los datos se muestran como media  $\pm$  EEM. \* P <0.05, \*\* P <0.001.

## 6.5 El bloqueo del receptor glutamatérgico NMDA en la aIC acelera la extinción de la memoria del CPL

Dado que las concentraciones extracelulares de dopamina, noradrenalina y glutamato aumentaron en la aIC durante la evocación de la memoria del CPL, se decidió administrar inyecciones intra-corticales de antagonistas para los receptores de dopamina, noradrenalina o glutamato después de la evocación (Post-cond) de la memoria del CPL (Fig. 5a). Observamos que la administración del antagonista del receptor tipo D1 (SCH23390) o el antagonista del receptor adrenérgico  $\beta$  (propranolol) no afectó el mantenimiento del CPL (Fig. 5b). En contraste, la inyección intra-cortical de AP5, un antagonista del receptor NMDA, aceleró la tasa de extinción de la memoria del CPL. El CPL se restableció después de la estimulación optogenética de baja duración (RI) en el grupo ChR2/vehículo, pero no en el grupo ChR2/AP5 (Fig. 5c). Por el contrario, las inyecciones intra-corticales de CNQX, un antagonista del receptor de ácido glutamato  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA), no afectaron el mantenimiento de la memoria del CPL (Fig. 5c). Para saber si el bloqueo de los receptores NMDA en la aIC, después de la evocación de la memoria del CPL tenía efectos inespecíficos permanentes sobre el CPL, realizamos un protocolo de condicionamiento inverso (Rcond 1-3)

(Fig. 5d). Observamos que un bloqueo previo de los receptores NMDA en la aIC no impide la formación posterior de un nuevo condicionamiento (Fig. 5e). Esto indica que el bloqueo de los receptores NMDA en la aIC durante la evocación de la memoria del CPL es temporal y no impide la formación de nuevos trazos de memoria.



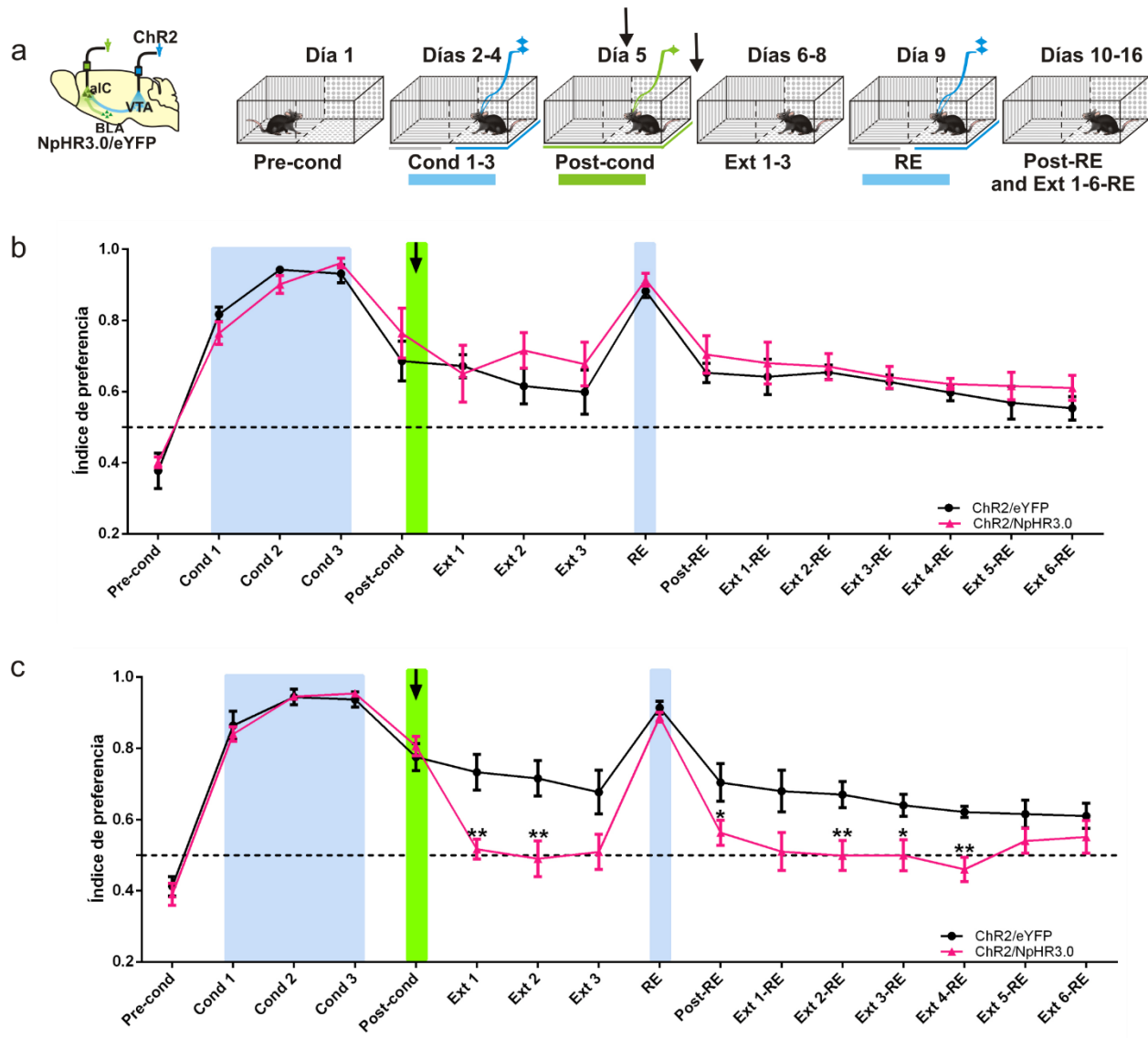
**Figura 5. El bloqueo del receptor glutamatérgico NMDA posterior a la evocación de la memoria del CPL acelera la tasa de extinción.** **a)** Diagrama de estimulación optogenética de neuronas TH+ en el VTA y diagrama temporal de la tarea conductual. La preferencia del lugar se determinó durante el pre-condicionamiento (Precond.). Los ratones fueron condicionados durante 3 sesiones de 20 minutos durante la activación de las neuronas TH+ del VTA (Cond 1-3). La estimulación optogenética se realizó en el lugar menos preferido. Las barras azules muestran activación optogenética del VTA a 20 Hz (5 ms de ancho), 12-14 mW y 473 nm. En el post-condicionamiento (Post-cond), se evaluó la preferencia del lugar después de las sesiones de condicionamiento con la estimulación optogenética. **b)** Las inyecciones intra-corticales de antagonistas, de los receptores dopaminérgicos D1 (SCH23390) y  $\beta$ -adrenérgicos (propranolol), después del Post-cond no afectaron el mantenimiento (Ext 1-3) ni el restablecimiento (Post-RE) del CPL inducido por la activación optogenética de las neuronas TH+ durante 5 min (RE) de la VTA. ChR2/vehículo (n=7), ChR2/SCH23390 (n=7) y ChR2/Propranolol (n=6). El ANOVA de medidas no mostró efecto de grupo:  $F_{2,17}=0.3844$ ,  $P=0.6866$ , efecto de tiempo:  $F_{5.830,89.76}=59.05$ ,  $P<0.0001$ , y sin interacción:  $F_{30,255}=0.5162$ ,  $P=0.9840$ . **c)** La inyección intra-cortical del antagonista de los receptores NMDA (AP5) pero no de los receptores AMPA (CNQX) después del Post-cond aceleró la tasa de extinción (Ext 1-3) y bloqueó el restablecimiento (Post-RE) de la memoria del CPL (Ext 1-6- RE) inducida por la activación optogenética de las neuronas TH+ durante 5 minutos del VTA (RE). ChR2/vehículo (n=7), ChR2/AP5 (n=7) y ChR2/CNQX (n=7). El ANOVA de medidas repetidas mostró el efecto del grupo principal:  $F_{2,18}=9.099$ ,  $P=0.0019$ , efecto de tiempo:  $F_{5.830, 104.9}=103.7$ ,  $P<0.0001$  e interacción:  $F_{30,270}=2.216$ ,  $P=0.0005$ . Prueba de Tukey post-hoc ChR2/Vehículo vs ChR2/AP5 para Ext 1  $P=0.0025$ , Ext 2  $P=0.0028$ , Ext 3  $P=0.0234$ , Ext 1-RE  $P=0.0103$ . **d)** Después de que se extinguió la preferencia del lugar (Ext 1-5), los ratones se condicionaron con activación optogenética del VTA en el lado opuesto (Rcond 1-3) y se determinó la preferencia por el lugar 24 horas después (Post-Rcond). El ANOVA de medidas repetidas mostró el efecto del grupo principal:  $F_{1,11}=20.17$ ,  $P=0.0009$ , efecto de tiempo:  $F_{4.124,45.37}=133.2$ ,  $P<0.001$  e interacción:  $F_{13,143}=3.467$ ,  $P=0.0001$ . Prueba post-hoc de Bonferroni ChR2/Vehículo (n=6) vs ChR2/AP5 (n=7) para Ext 1  $P=0.0034$ . Todos los datos se muestran como media  $\pm$  SEM. La flecha indica el tiempo de administración de los fármacos. La línea horizontal discontinua no indica preferencia. \*\*  $P<0.001$ . Todos los datos se muestran como la media  $\pm$  EEM. La flecha indica el tiempo de administración de los antagonistas. Las líneas horizontales discontinuas indican azar. \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ .

## 6.6 La inhibición optogenética de la vía glutamatérgica BLA→aIC acelera la extinción del CPL

Varios estudios han relacionado la estimulación de la vía BLA→IC con cambios plásticos en la IC, los cuales están relacionados con la consolidación y extinción de la memoria de reconocimiento (Miranda & McGaugh, 2004; Rivera-Olvera et al., 2018). Del mismo modo, la estimulación de alta frecuencia de la BLA induce la facilitación a largo plazo en la IC y produce una extinción más prolongada de los recuerdos aversivos (Escobar & Bermúdez-Rattoni, 2000). Además, las inyecciones intra-corticales de antagonistas de los receptores NMDA en la IC impide la plasticidad sináptica y en el comportamiento a largo plazo (Escobar et al., 1998a;1998b, Ferreira et al., 2005, Rodríguez-Durán et al., 2017). Estos datos sugieren que las fibras que provienen de la BLA a la IC son glutamatérgicas y probablemente modulen la consolidación de la memoria.

Para evaluar si la inhibición optogenética de las fibras glutamatérgicas aferentes de la BLA a la aIC podría acelerar la extinción de la memoria adictiva dependiente de contexto, realizamos la fotoinhibición de las fibras BLA→aIC durante o después de la sesión de evocación del CPL en ratones Chr2/NpHR3.0 y Chr2/eYFP (Fig. 6a).

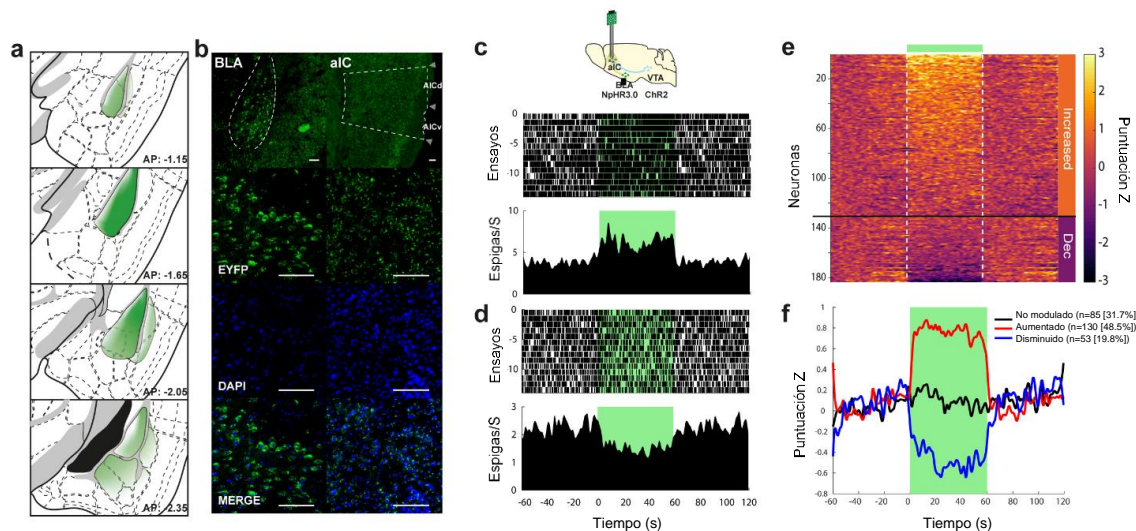
Se inhibió optogenéticamente la aIC con el láser verde (12-14 mW, 532 nm) durante la evocación de la memoria (Post-cond), independientemente del lado que visitaran los ratones. Se encontró que la inhibición optogenética de las proyecciones glutamatérgicas de la BLA a la aIC durante la sesión de post-condicionamiento aceleró el proceso de extinción (Fig. 6b). Del mismo modo, el CPL se reestableció (Post-RI) después de la estimulación optogenética de baja duración (RI) en el grupo Chr2/eYFP pero no en el grupo Chr2 NpHR3.0. Sin embargo, cuando se realizó la inhibición optogenética inmediatamente después de la sesión de post-condicionamiento no se afectó el mantenimiento o la extinción del CPL (Fig. 6c), lo que sugiere la existencia de una ventana temporal donde las proyecciones glutamatérgicas de la BLA a la aIC son necesarias para el mantenimiento de la memoria adictiva dependiente de contexto.



**Figura 6. La inhibición optogenética de las proyecciones glutamatergicas de la BLA hacia la aIC acelera la extinción del CPL. a)** Diagrama de la infección viral en las neuronas TH+ del VTA, inhibición optogenética de las proyecciones de la BLA hacia la aIC y diagrama temporal de la tarea conductual. La preferencia del lugar se determinó durante el pre-condicionamiento (Pre-cond.). Los ratones fueron condicionados durante 3 sesiones de 20 minutos durante la activación de las neuronas TH+ del VTA (Cond 1-3). La estimulación optogenética se realizó en el lugar menos preferido. Las barras azules muestran activación optogenética del VTA a 20 Hz (5 ms de ancho), 12-14 mW y 473 nm. Las barras azules indican activación optogenética de las neuronas TH+ del VTA; la barra verde indica inhibición optogenética de las proyecciones glutamatergicas de la BLA hacia la aIC. **b)** La inhibición optogenética de las proyecciones glutamatergicas en la aIC durante la sesión de post-condicionamiento (Post-cond) aceleró la tasa de extinción en el grupo ChR2/NpHR3.0 (n=9) pero no en el grupo ChR2/eYFP (n=7). El láser verde se pulsó constantemente a 12-14 mW y 532 nm. El ANOVA de medidas repetidas mostró el efecto principal del grupo:  $F_{1,14}=7,266$ ,  $P=0,0174$ , efecto de tiempo:  $F_{4,704,65.85}=62.50$ ,  $P<0.0001$  e interacción:  $F_{15,210}=4.406$ ,  $P<0,0001$ . Post-hoc Bonferroni ChR2/eYFP vs ChR2/NpHR3.0 para Ext 1  $P=0.0042$ , Ext 2  $P=0.0068$ , Post-RE  $P=0.0483$ , Ext 2-RE  $P=0.0082$ , Ext 3-RE  $P=0.0206$ , Ext 4-RE  $P=0,0013$ . **c)** La inhibición optogenética de las proyecciones glutamatergicas en la aIC después de la sesión de post-

condicionamiento (Post-cond) no afectó el mantenimiento del CPL en ninguno de los dos grupos, NpHR3.0 (n=7) y eYFP (n=7). La inhibición optogenética en la aIC duró 10 minutos y se realizó fuera de la caja conductual del CPL. El ANOVA de medidas repetidas no mostró efecto de grupo:  $F_{1,12}=1.178$ ,  $P=0.229$ , efecto de tiempo:  $F_{5,180}=29.01$ ,  $P < 0.0001$  y sin interacción:  $F_{15,180}=0.6331$ ,  $P=0.8450$ . Todos los datos se muestran como la media  $\pm$  EEM. La flecha indica el tiempo de inhibición de la vía glutamatérgica BLA→aIC. Las líneas horizontales discontinuas indican azar. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

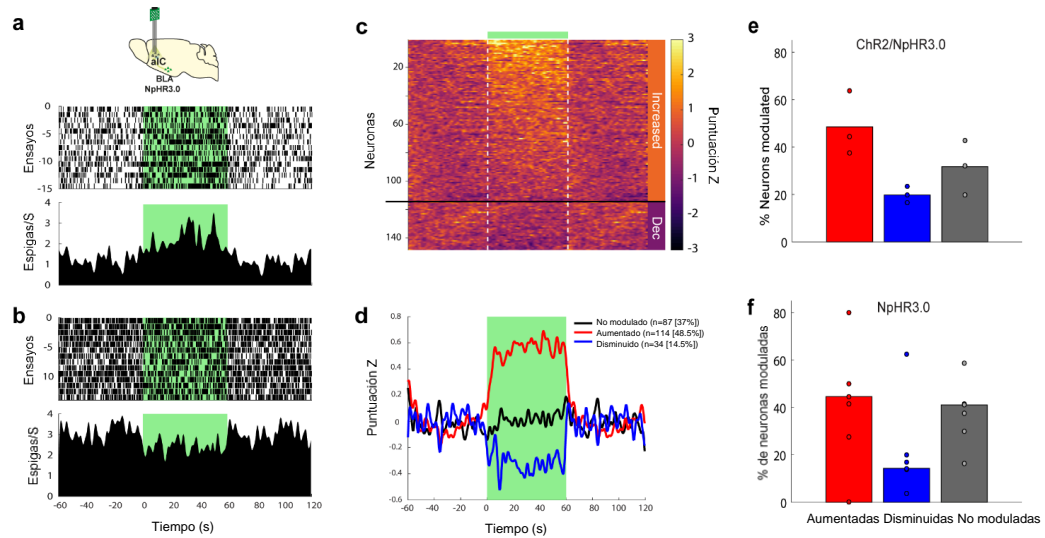
Finalmente, en un grupo de ratones ChR2/NpHR3.0 sin entrenamiento e implantados con un optrodo en la aIC encontramos que los somas de las neuronas de la BLA que expresan NpHR3.0 envían fibras de proyección hacia la aIC (Fig. 7a y 7b). También se demostró que 1 minuto de inhibición optogenética continua en las proyecciones glutamatérgicas de la BLA hacia la aIC moduló robustamente la actividad basal de las neuronas en la aIC. Además, se muestran dos ejemplos de neuronas en la aIC, una muestra excitación (Fig. 7c) y la otra inhibición (Fig. 7d) de respuestas neuronales provocadas por la inhibición optogenética con el láser verde de las proyecciones de la BLA hacia la aIC. Alrededor del 48.5% (130/268) de las neuronas en la aIC exhibieron una tasa de actividad aumentada, mientras que el 19.8% (53/268) exhibieron una tasa de actividad reducida durante la inhibición optogenética de las fibras glutamatérgicas que proyectan desde la BLA hacia la aIC (Fig. 7e y 7f). Por lo tanto, la inhibición optogenética de las proyecciones glutamatérgicas de la BLA hacia la aIC da como resultado un aumento en la actividad neuronal de los circuitos corticales locales en la aIC.



**Figura 7. La inhibición optogenética de las proyecciones glutamatérgicas de la BLA hacia la aIC aumenta la actividad neuronal de los circuitos corticales locales en la aIC. a)** Diagrama de infección y difusión del virus en todo el eje anteroposterior de la BLA. **b)** Imágenes representativas de inmunofluorescencia doble para eYFP (verde) y diclorhidrato de 4', 6-diamidina-2'-fenilindol (DAPI; azul) en los somas de amígdala basolateral (BLA) (paneles izquierdos) y axones de la corteza insular anterior (aIC) (paneles derechos). La barra de escala representa 100  $\mu\text{m}$ . AICd, corteza insular agranular dorsal; AICv, corteza insular agranular ventral. **c)** Arriba, se muestra el esquema del protocolo experimental. Gráfico de trama y PSTH correspondiente (debajo) de una neurona excitada representativa registrada en la aIC. Las respuestas se alinearon tomando como referencia el inicio de la inhibición optogenética (tiempo=0) durante 1 minuto (mostrado con un rectángulo verde). Los puntos negros indican potenciales de acción. **d)** Neurona representativa de la aIC que exhibe inhibición de la actividad durante la inhibición optogenética. **e)** PSTH codificada por color de las neuronas normalizadas con la puntuación Z de las respuestas evocadas aumentadas o disminuidas registradas en la aIC, mientras que las fibras glutamatérgicas de la BLA hacia la aIC fueron inhibidas optogenéticamente. Las líneas discontinuas verticales blancas representan el inicio y el final de la inhibición optogenética del láser verde. El color rojo indica un aumento en la tasa de disparo, mientras que la disminución de la respuesta se representa con el color azul. **f)** Media de puntuaciones Z de las poblaciones neuronales clasificadas por aumento significativo, disminución o ningún efecto durante la fotoinhibición.

También, se obtuvieron resultados similares en los ratones que fueron registrados en la aIC y solo expresaban NpHR3.0 en la BLA en ausencia de Chr2 en el VTA (Fig. 8a), lo que sugiere que no hay interferencia entre las opsinas. En general, estos resultados resaltan la importancia de la modulación glutamatérgica de la BLA sobre la actividad neuronal en la aIC durante el mantenimiento de la memoria adictiva dependiente de contexto.





**Figura 8. La expresión de NpHR en la BLA provoca la desinhibición de los circuitos corticales locales en la aIC.** **a)** Diagrama del protocolo experimental. Las neuronas de la BLA fueron infectadas con un virus adenoasociado que expresa la bomba NpHR3.0 en neuronas glutamatérgicas y la inhibición optogenética se realizó en la aIC. **b)** Gráficos de trama y PSTH codificada por color normalizada con Z-Score de todas las neuronas excitadas (a) e inhibidas (b) registradas en la aIC durante la inhibición optogenética de las proyecciones glutamatérgicas de la BLA en la aIC. **c)** Mapa de calor de la tasa de disparo de las neuronas en la IC. Los colores cálidos indican una mayor tasa de disparo, mientras que los colores oscuros representan menor tasa de disparo. Las líneas discontinuas verticales blancas representan el inicio y el final de la fotoinhibición del láser verde, que se pulsó constantemente a 12-14 mW y 532 nm. **d)** Z-score del promedio poblacional de la tasa de disparo para neuronas clasificadas por tipo de respuesta ante la inhibición optogenética en la BLA (aumentada, disminuida, no modulada) durante la fotoinhibición. **e)** Porcentaje de neuronas moduladas en la aIC durante la inhibición optogenética de la BLA en ratones con doble infección (ChR2 / NpHR3.0). **f)** Porcentaje de neuronas moduladas en la aIC durante la inhibición optogenética en ratones infectados con NpHR3.0 en la BLA. Cada punto representa el porcentaje de neuronas moduladas en un individuo.

## 7. DISCUSIÓN

El circuito neuronal que participa en la adicción se conoce como el sistema mesolímbico dopaminérgico que se origina en el VTA, estructura que envía proyecciones dopaminérgicas hacia otras estructuras cerebrales como: el NAc, la corteza prefrontal, el tubérculo olfatorio, la amígdala, el hipocampo (Wise, 2002; Nestler, 2013; Nieh et al., 2013), la IC, entre otras (Ohara et al., 2003). Se ha reportado que la estimulación fásica de las neuronas dopaminérgicas en el VTA es suficiente para establecer un condicionamiento de preferencia acoplado a la estimulación optogenética (CPL) robusto (Tsai et al., 2009), generando un modelo conductual que se ha utilizado para medir la asociación de la recompensa con el contexto (Mueller et al., 2002). La estimulación optogenética del VTA permite el control preciso, temporal y espacial de la actividad de las neuronas dopaminérgicas. En consecuencia, el uso de este modelo permite examinar la interacción del VTA con otras áreas cerebrales que participan en el mantenimiento y la extinción del CPL. La vía dopaminérgica que estudiamos primero fue VTA→IC debido a que nos interesaba saber si esta conexión era responsable de formar y mantener la memoria adictiva dependiente de contexto. Para esto, infectamos las neuronas TH+ del VTA y activamos optogenéticamente las terminales TH+ de la aIC. Encontramos que los ratones ChR2 no desarrollaron preferencia por el lugar asociado a la estimulación optogenética, a pesar de que habíamos demostrado que había liberación de dopamina en la aIC. Sin embargo, cuando los ratones fueron estimulados optogenéticamente en las terminales TH+ de la aIC y simultáneamente administrados por vía intraperitoneal con una dosis baja de cocaína (5 mg/kg) aumentó el tiempo de permanencia en el lugar condicionado. Mientras que, los ratones estimulados optogenéticamente en las terminales TH+ de la corteza medial (mIC) y posterior (pIC) más cocaína, no desarrollaron preferencia por el lugar condicionado. Este resultado es similar con reportes que indican que la aIC participa en el mantenimiento de la adicción de diferentes drogas de abuso (Contreras et al., 2012; Pushparaj et al., 2015; Arguello et al., 2017; Rotge et al., 2017; Haaranen et al., 2020). Mientras que, nuestros resultados indicaron que las terminales dopaminérgicas en la aIC provenientes del VTA eran necesarias, pero no suficientes para establecer un CPL. Por lo tanto, inferimos que la vía dopaminérgica VTA→aIC participaba en la formación de la memoria adictiva, pero existían más estructuras cerebrales implicadas en dicho proceso. En este sentido, se ha demostrado que el NAc, el hipocampo, la corteza cerebral y la amígdala, juegan un papel importante en el condicionamiento de preferencia de lugar (Ferbinteanu & McDonald, 2011; Shinohara et al., 2017; Hitchcock & Lattal, 2018; Wang et al, 2020).

Además, nuestros resultados revelaron que la activación optogenética de las neuronas dopaminérgicas TH+ del VTA moduló débilmente las repuestas neuronales en la aIC, aun cuando la coherencia en las respuestas de las neuronas del VTA al laser fue mayor. Se ha reportado que la activación del receptor dopaminérgico D1 por sí mismo no genera plasticidad sináptica en cortes hipocampales de rata (Mockett et al., 2007), mientras que la potenciación de largo plazo inducida con estimulación de alta frecuencia es facilitado o impedido por agonistas o antagonistas de los receptores de dopamina en el hipocampo y/o la corteza prefrontal (Matsuda et al., 2006; Otani et al., 2015; Shivarama Shetty et al., 2016; Papaleonidopoulos et al., 2018).

Una vez que habíamos encontrado que la participación de la vía dopaminérgica VTA→aIC en la formación de la memoria era débil y dado nuestro interés por estudiar el mantenimiento de la memoria adictiva necesitábamos establecer un CPL robusto. Para esto, decidimos infectar y estimular optogenéticamente las neuronas TH+ del VTA. Ya se había reportado que la estimulación de los somas del VTA permitía establecer un CPL (Tsai et al., 2009). Los resultados indicaron que, a pesar de que el disparo de las neuronas dopaminérgicas del VTA fue coherente con cada pulso de luz emitido por el láser en la misma estructura, una sola sesión de condiionamiento bajo la estimulación optogenética del VTA no fue suficiente para establecer un CPL robusto. Al usar una sesión de condicionamiento con estimulación optogenética del VTA de 20 minutos durante 3 días consecutivos, se estableció un CPL robusto con una duración de 5 días. El mantenimiento del CPL fue proporcional al número de sesiones de condicionamiento. Por lo tanto, estos hallazgos soportan la idea que la estabilidad de la memoria depende de la exposición repetida a los estímulos (Uchida et al., 2017).

Usando microdialisis *in vivo*, observamos que la reexposición de los ratones al contexto en el que fueron condicionados induce una alta liberación de dopamina, noradrenalina y glutamato, lo que sugiere que la exposición al contexto condicionado durante la evocación es el factor detonante de la liberación de estos neurotransmisores en la aIC. Al respecto, los hallazgos obtenidos en experimentos previos usando otras tareas conductuales dependientes de la aIC sugieren que la liberación de catecolaminas y glutamato durante la evocación están involucrados en los procesos de mantenimiento y reconsolidación de las respuestas condicionadas (Guzmán-Ramos et al., 2012; Osorio-Gómez et al., 2017). La reconsolidación es el proceso mediante el cual la evocación induce la desestabilización de la memoria, creando una ventana temporal en la cual las memorias consolidadas son susceptibles a la interferencia mediante aproximaciones farmacológicas o a la actualización con nueva información (Das et al., 2015; Rodríguez-Ortiz &

Bermúdez-Rattoni, 2017). De esta manera, después de la evocación, la nueva información es comparada con las memorias previamente almacenadas, siendo entonces susceptible a ser desestabilizada. Posteriormente, la memoria desestabilizada y la información recientemente adquirida son re-estabilizadas o reconsolidadas en una memoria de largo plazo actualizada (Rodríguez-Ortiz et al., 2005; Rodríguez-Ortiz & Bermúdez-Rattoni, 2017).

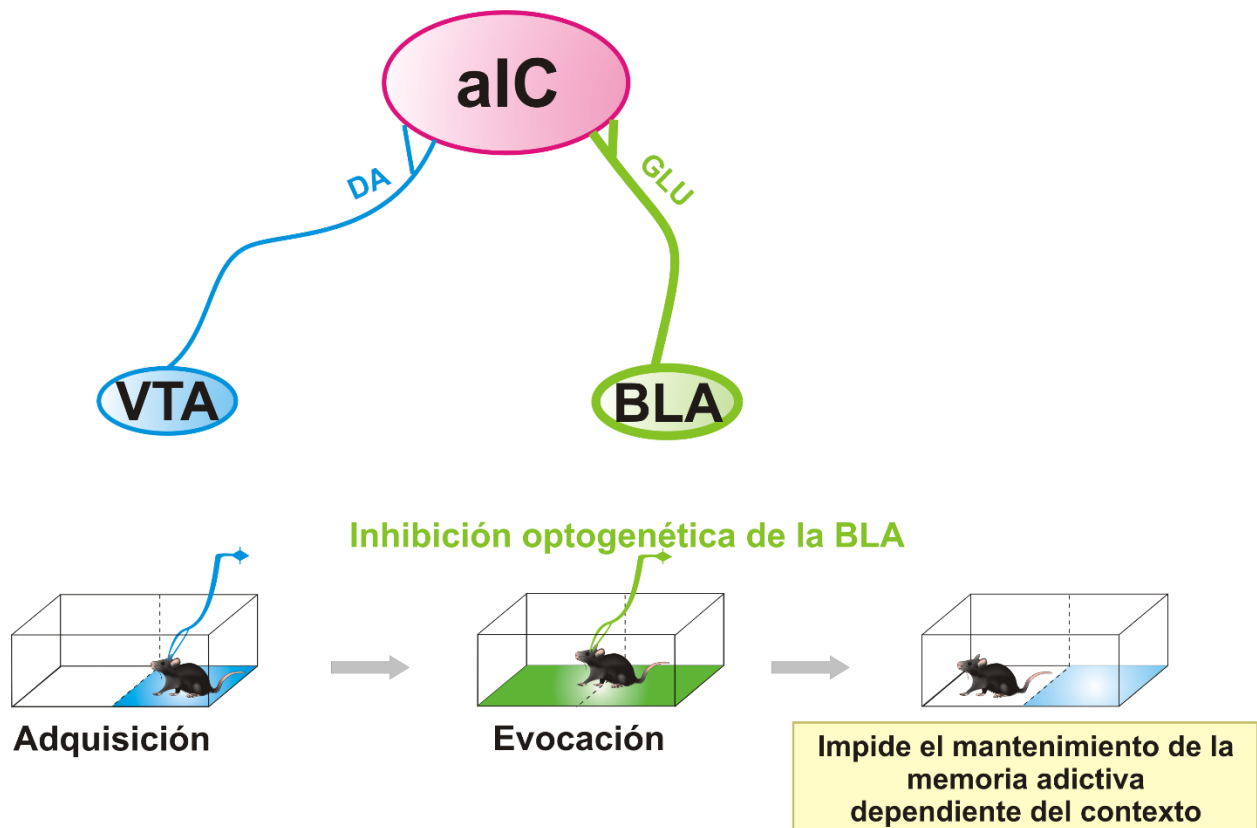
En el modelo de CPL, cuando los ratones son re-expuestos a un nuevo contexto de aprendizaje, el contexto previamente condicionado se vuelve lábil y susceptible a drogas amnésicas como antagonistas de ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), impidiendo la expresión de la memoria consolidada y acelerando la extinción del CPL. Estos mismos resultados han sido reportados en condicionamiento al miedo, memoria de reconocimiento de objetos y el condicionamiento de preferencia de lugar (Santoyo-Zedillo et al., 2014; Wu et al., 2012; Baker & Richardson, 2017). Nosotros encontramos que los receptores NMDA son críticos para el mantenimiento del CPL, mientras que los receptores, ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA), D1 y B-adrenérgicos no parecen participar en dicho proceso. El bloqueo de los receptores NMDA en la aIC puede desestabilizar el trazo de memoria original acelerando la extinción e impidiendo el restablecimiento de nueva información reforzante. Esta posibilidad es soportada por evidencias que sugieren que los mecanismos de reconsolidación en la memoria de reconocimiento requieren la activación de los receptores NMDA (Santoyo-Zedillo et al., 2014). Además, nuestros resultados demuestran que la administración intra-cortical de antagonistas del receptor NMDA impiden el mantenimiento del CPL. Por lo tanto, es posible que la aIC sea una estructura importante que integra la información visceral y contextual relacionada con el mantenimiento de las memorias asociadas con la adicción (Miranda et al., 2002; Contreras et al., 2012).

Muchos reportes sugieren una comunicación importante entre la amígdala y la corteza insular durante la formación de la memoria apetitiva y aversiva (Miranda et al., 2002; Peng et al., 2015; Rodríguez-Durán et al., 2017; Venniro et al., 2017). Por ejemplo, se ha demostrado que la potenciación de largo plazo en la aIC inducida por estimulación eléctrica de alta frecuencia en la BLA, es bloqueada mediante la administración intracortical de antagonistas de NMDA (Escobar et al., 1998a; Jones et al., 1999; Escobar & Bermúdez-Rattoni, 2000). Estos resultados sugieren que la plasticidad cortical inducida por la estimulación de la amígdala es regulada por glutamato a través de la activación de los receptores NMDA en la aIC. Por lo tanto, nosotros hipotetizamos que la vía BLA→aIC estaba involucrada en el mantenimiento de la memoria adictiva dependiente del contexto. Encontramos que, la inhibición optogenética de las proyecciones de la BLA a la aIC

durante la evocación del CPL aceleró el proceso de extinción de la memoria adictiva dependiente del contexto. Sin embargo, la inhibición de las proyecciones de la BLA a la aIC después de la evocación no aceleró la extinción del CPL, por lo tanto, este efecto es dependiente del tiempo, puesto que desestabiliza el trazo de memoria original solamente cuando la memoria está en un estado lábil y es susceptible a interferencia. Este resultado es similar a un reporte previo en el cual microinyecciones en la aIC con un inhibidor de la síntesis proteica inmediatamente después de la reactivación de la memoria provoca una pérdida reversible de la preferencia por el lugar que fue asociado con anfetamina. Sin embargo, cuando se realizan microinyecciones del inhibidor de la síntesis proteica sin reactivación, no cambia la preferencia por el lugar que fue asociado a la droga (Contreras et al., 2012).

Nuestros resultados mostraron un bloqueo de la reconsolidación de la memoria adictiva dependiente de contexto como consecuencia de la inhibición optogenética de las proyecciones de la BLA en la aIC. Sin embargo, no se pueden descartar otros mecanismos alternativos que pudieran estar involucrados. Es posible que la inhibición optogenética de las terminales glutamatérgicas y el bloqueo de los receptores NMDA en la aIC, activen eventos moleculares similares. Estos hallazgos soportan la idea que la señalización glutamatérgica en la aIC constituye un mecanismo importante para el mantenimiento y el re-establecimiento de la memoria adictiva dependiente del contexto. En resumen, mediante el empleo de aproximaciones optogenéticas y farmacológicas, se encontró que la vía dopaminérgica VTA→aIC participa parcialmente durante la formación de la memoria, mientras que la vía glutamatérgica BLA→aIC está involucrada en el mantenimiento de la memoria adictiva dependiente del contexto.

## 8. CONCLUSION



En este trabajo encontramos que la activación de la vía dopaminérgica VTA→aIC es necesaria para la formación de la memoria adictiva dependiente de contexto. Mientras que, la inhibición optogenética de la vía glutamatérgica BLA→aIC durante la evocación de la memoria acelera la extinción e impide el restablecimiento de la memoria adictiva dependiente del contexto. Este hecho también fue observado mediante el bloqueo de los receptores glutamatérgicos NMDA en la aIC. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que la vía glutamatérgica BLA→aIC está involucrada en el mantenimiento de la memoria adictiva dependiente del contexto, a través de la señalización glutamatérgica dependiente de los receptores NMDA.

## 9. REFERENCIAS

- Abdolahi, A., Williams, G. C., Benesch, C. G., Wang, H. Z., Spitzer, E. M., Scott, B. E., Block, R. C. and van Wijnngaarden, E. (2015). Damage to the insula leads to decreased nicotine withdrawal during abstinence. *Addiction* 110, 1994–2003.
- Alberini, C. M., Milekic, M. H. and Tronel, S. (2006). Mechanisms of memory stabilization and destabilization. *Cell Mol Life Sci.* 63:999-1008.
- Aragona, B. J., Liu, Y., Curtis, J. T., Stephan, F. K. and Wang, Z. (2003). A critical role for nucleus accumbens dopamine in partner-preference formation in male prairie voles. *The Journal of Neuroscience*, 23:3483-3490.
- Arguello, A. A., Wang, R., Lyons, C.M., Higginbotham, J. A., Hodges, M. A. and Fuchs, R. A. (2017). Role of the agranular insular cortex in contextual control over cocaine-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology* 234, 2431-2441.
- Augustine, J. R. (1996). Circuitry and functional aspects of the insular lobe in primates including humans. *Brain Res Brain Res Rev.* 22, 229-244.
- Baker, K.D. & Richardson, R. (2017). Pharmacological evidence that a failure to recruit NMDA receptors contributes to impaired fear extinction retention in adolescent rats. *Neurobiol. Learn Mem.* 143, 18-26.
- Baumeister, R. F., Heatherton, T. F. and Tice, D.M. (1994). *Losing Control: How and Why People Fail at Self-Regulation*. San Diego, Academic Press.
- Belin-Rauscent, A., Daniel, M. L., Puaud, M., Jupp, B., Sawiak, S., Howett, D., McKenzie, C., Caprioli, D., Besson, M., Robbins, T. W., Everitt, B. J., Dalley, J. W. and Belin, D. (2016). From impulses to maladaptive actions: the insula is a neurobiological gate for the development of compulsive behavior. *Mol Psychiatry.* 21:491-499.
- Ben Mamou, C., Gamache, K. and Nader, K. (2006). NMDA receptors are critical for unleashing consolidated auditory fear memories. *Nat. Neurosci.*, 9, 1237–1239.
- Benjamin, R. M. & Golden, G. T. (1985). Extent and organization of opossum prefrontal cortex defined by anterograde and retrograde transport methods. *The Journal of Comparative Neurology*, 238(1), 77–91.
- Berlin, G. S. & Hollander, E. (2014). Compulsivity, impulsivity, and the DSM-5 process. *CNS Spectr*; 19: 62–68.
- Bermúdez-Rattoni, F. (2004). Molecular mechanisms of taste-recognition memory. *Nature Reviews. Neuroscience*, 5(3), 209–217.
- Bermudez-Rattoni, F. (2014). The forgotten insular cortex: its role on recognition memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 109:207-216.
- Bernstein, J. G. & Boyden, E. S. (2011). Optogenetic tools for analyzing the neural circuits of behavior. *Trends in Cognitive Sciences*, 15:592-600.
- Berridge, K. C. & Kringelbach, M. L. (2008). Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. *Psychopharmacology (Berl)*. 199:457-480.
- Berridge, K. C. & Robinson, T. E. (1995). The mind of an addicted brain: Neural sensitization of wanting versus liking. *Curr Direct Psychol Sci* 4: 71–75.
- Böning, J. (2009). Addiction memory as a specific, individually learned memory imprint. *Pharmacopsychiatry*, 1:S66-68.
- Bouton, M. E. Context and behavioral processes in extinction. *Learn Mem.* 2004 Sep-Oct;11(5):485-94.
- Bozarth, M. A., Murray, A. and Wise, R. A. (1989). Influence of housing conditions on the acquisition of intravenous heroin and cocaine self-administration in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 33:903-907.

- Britt, J. P. & Bonci, A. (2013). Optogenetic interrogations of the neural circuits underlying addiction. *Curr Opin Neurobiol.* 23:539-545.
- Brown, T. E., Lee, B. R. and Sorg, B. A. (2008). The NMDA antagonist MK-801 disrupts reconsolidation of a cocaine-associated memory for conditioned place preference but not for self-administration in rats. *Learn. Mem.*, 15, 857–865.
- Calipari, E. S., Juarez, B., Morel, C., Walker, D. M., Cahill, M. E., Ribeiro, E., Roman-Ortiz, C., Ramakrishnan, C., Deisseroth, K., Han, M. H. and Nestler, E. J. (2017). Dopaminergic dynamics underlying sex-specific cocaine reward. *Nat Commun.* 10 8:13877.
- Camí, J. & Farré, M. (2003). Drug addiction. *N Engl J Med* 349: 975–986.
- Campbell, E. J., Flanagan, J. P. M., Walker, L. C., Hill, M. K. R. I., Marchant, N. J. and Lawrence, A. J. (2019). Anterior Insular Cortex is Critical for the Propensity to Relapse Following Punishment-Imposed Abstinence of Alcohol Seeking. *J Neurosci.* 39:1077-1087.
- Chen, B. T., Bowers, M. S., Martin, M., Hopf, F. W., Guillory, A. M., Carelli, R. M., Chou, J. K., and Bonci, A. (2008). Cocaine but not natural reward self-administration nor passive cocaine infusion produces persistent LTP in the VTA. *Neuron* 59, 288-297.
- Christie, M. J., Summers, R. J., Stephenson, J. A., Cook, C. J. and Beart, P. M. (1987). Excitatory amino acid projections to the nucleus accumbens septi in the rat: a retrograde transport study utilizing D[3H]aspartate and [3H]GABA. *Neuroscience* 22: 425–439.
- Contreras, M., Billeke, P., Vicencio, S., Madrid, C., Perdomo, G., González, M. and Torrealba, F. (2012). A role for the insular cortex in long-term memory for context-evoked drug craving in rats. *Neuropsychopharmacology* 37, 2101–2108.
- Cornish, J. L. & Kalivas, P. W. (2000). Glutamate transmission in the nucleus accumbens mediates relapse in cocaine addiction. *J Neurosci.* 20(15):RC89.
- Cosme, C. V., Gutman, A. L. and LaLumiere, R. T. (2015). The dorsal agranular insular cortex regulates the cued reinstatement of cocaine-seeking, but not food-seeking, behavior in rats. *Neuropsychopharmacology* 40, 2425–2433.
- Craig, A. (2009). How do you feel—now? The anterior insula and human awareness. *Nat Rev Neurosci.* 10:59–70.
- Das, R.K., Lawn, W. and Kamboj, S. K. (2015). Rewriting the valuation and salience of alcohol-related stimuli via memory reconsolidation. *Transl. Psychiatry* 5, e645.
- Di Chiara, G. (1999). Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. *Eur J Pharmacol* 375: 13–30.
- Di Pietro, N. C., Mashhoon, Y., Heaney, C., Yager, L. M. and Kantak, K. M. (2008). Role of dopamine D1 receptors in the prefrontal dorsal agranular insular cortex in mediating cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology* 200, 81–91.
- Droutman, V., Read, S. J. and Bechara, A. (2015). Revisiting the role of the insula in addiction. *Trends Cogn Sci.* 19:414-420.
- Duvarci, S. & Nader, K. (2004). Characterization of fear memory reconsolidation. *The Journal of Neuroscience*, 24:9269-9275.
- Escobar, M. L. & Bermúdez-Rattoni, F. (2000). Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res.* 852, 208–212.
- Escobar, M.L., Alcocer, I. and Chao, V. (1998a). The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long-term potentiation in vivo. *Brain Res.* 812, 246 -251.
- Escobar, M.L., Chao, V., and Bermúdez-Rattoni, F. (1998b). In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain Res.* 779, 314-319.
- Everitt, B. J. & Robbins, T. W. (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nature Neuroscience*, 8:1481-1489.



- Everitt, B. J., Giuliano, C. and Belin, D. (2018). Addictive behaviour in experimental animals: prospects for translation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 19: 373.
- Feltenstein, M. W., See, R. E. and Fuchs, R. A. (2021). Neural Substrates and Circuits of Drug Addiction. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 11(4):a039628.
- Ferbinteanu, J. & McDonald, R. J. (2011). Dorsal/ventral hippocampus, fornix, and conditioned place preference. *Hippocampus*.11:187-200.
- Ferreira, G., Miranda, M.I., De la Cruz, V., Rodriguez-Ortiz, C.J., and Bermúdez-Rattoni, F. (2005). Basolateral amygdala glutamatergic activation enhances taste aversion through NMDA receptor activation in the insular cortex. *Eur. J. Neurosci*. 22, 596-604.
- Finnie, P. S. & Nader, K. (2012). The role of metaplasticity mechanisms in regulating memory destabilization and reconsolidation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 36:1667-1707.
- Forget, B., Pushparaj, A. and Le Foll, B. (2010). Granular insular cortex inactivation as a novel therapeutic strategy for nicotine addiction. *Biol. Psychiatry*. 68, 265-271.
- Franklin, T. R., Acton, P. D., Maldjian, J. A., Gray, J. D., Croft, J. R., Dackis, C. A., O'Brien, C. P. and Childress, A. R. (2002). Decreased gray matter concentration in the insular, orbitofrontal, cingulate, and temporal cortices of cocaine patients. *Biol Psychiatry* 51: 134–142.
- Fuchs, R. A., Bell, G. H., Ramirez, D. R., Eaddy, J. L. and Su, Z. I. (2009). Basolateral amygdala involvement in memory reconsolidation processes that facilitate drug context-induced cocaine seeking. *The European journal of neuroscience*, 30(5), 889–900.
- Fudge, J. L., Kelly, E. A., Pal, R., Bedont, J. L., Park, L. and Ho, B. (2017). Beyond the Classic VTA: Extended Amygdala Projections to DA-Striatal Paths in the Primate. *Neuropsychopharmacology*. 42:1563-1576.
- Gardner, E. L. (2011). Introduction: Addiction and Brain Reward and Anti-Reward Pathways. *Adv Psychosom Med*, 30: 22–60.
- Geisler, S., Derst, C., Veh, R. W. and Zahm, D. S. (2007). Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat. *J Neurosci*. 27:5730-5743.
- Goldstein, R. Z. & Volkow, N. D. (2002). Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *Am J Psychiatry* 159: 1642–1652.
- Groenewegen, H. J., Wright, C. I., Beijer, A. V. and Voorn, P. (1999). Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. *Ann N Y Acad Sci*. 29:49-63.
- Guzmán-Ramos, K., Moreno-Castilla, P., Castro-Cruz, M., McGaugh, J. L., Martínez-Coria, H. LaFerla, F. M. and Bermúdez-Rattoni, F. (2012). Restoration of dopamine release deficits during object recognition memory acquisition attenuates cognitive impairment in a triple transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Learn Mem*. 19, 453–460.
- Haaranen, M., Schäfer, A., Järvi, V. and Hyytiä, P. (2020). Chemogenetic Stimulation and Silencing of the Insula, Amygdala, Nucleus Accumbens, and Their Connections Differentially Modulate Alcohol Drinking in Rats. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 14, 580849.
- Heidbreder, C. A., Thompson, A. C. and Shippenberg, T. S. (1996). Role of extracellular dopamine in the initiation and long-term expression of behavioral sensitization to cocaine. *J Pharmacol Exp Ther*. 278:490-502.
- Heikkila, R. E., Orlansky, H. and Cohen, G. (1975). Studies on the distinction between uptake inhibition and release of (3H) dopamine in rat brain tissue slices. *Biochem Pharmacol* 24:847–852.

- Heimer, L., Alheid, G. F., de Olmos, J. S., Groenewegen, H. J., Haber, S. N., Harlan, R. E. and Zahm, D. S. (1997). The accumbens: beyond the core-shell dichotomy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 9:354-381.
- Hitchcock, L. N. & Lattal, K. M. (2018). Involvement of the dorsal hippocampus in expression and extinction of cocaine-induced conditioned place preference. *Hippocampus.* 28:226-238.
- Hnasko, T. S., Hjelmstad, G. O., Fields, H. L. and Edwards, R. H. (2012). Ventral tegmental area glutamate neurons: electrophysiological properties and projections. *J Neurosci.* 32:15076-15085.
- Holmes, A. & Quirk, G. J. (2010). Pharmacological facilitation of fear extinction and the search for adjunct treatments for anxiety disorders – the case of yohimbine. *Trends in Pharmacological Sciences,* 31, 2–7.
- Huang, K. W., Ochandarena, N. E., Philson, A. C., Hyun, M., Birnbaum, J. E., Cicconet, M. and Sabatini, B. L. (2019). Molecular and anatomical organization of the dorsal raphe nucleus. *Elife.* 8:e46464.
- Hyman, S. E. & Malenka, R. C. (2001). Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev* 2: 695–703.
- Ikemoto, S. (2010). Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. *Neurosci Biobehav Rev.* 35:129-150.
- Itzhak, Y. (2008) Role of the NMDA receptor and nitric oxide in memory reconsolidation of cocaine-induced conditioned place preference in mice. *Ann. N Y Acad. Sci.,* 1139, 350–357.
- Jentsch, J. D & Taylor, J. R. (1999). Impulsivity resulting from frontostriatal dysfunction in drug abuse: implications for the control of behavior by reward-related stimuli. *Psychopharmacology (Berl)* 146: 373–390.
- Jones, M. W., French, P. J., Bliss, T. V. and Rosenblum, K. (1999). Molecular mechanisms of long-term potentiation in the insular cortex in vivo. *J. Neurosci.* 19, 36.
- Kapasova, Z. & Szumlinski, K. K. (2008). Strain differences in alcohol-induced neurochemical plasticity: a role for accumbens glutamate in alcohol intake. *Alcohol Clin Exp Res.* 32:617-631.
- Kelley, J.B., Anderson, K.L. & Itzhak, Y. (2007) Long-term memory of cocaine-associated context: disruption and reinstatement. *Neuroreport,* 18, 777–780.
- Koob, G. F. (2009). Dynamics of neuronal circuits in addiction: reward, antireward, and emotional memory. *Pharmacopsychiatry. Suppl 1(Suppl 1):*S32-41.
- Koob, G. F. (2021). Drug Addiction: Hyperkatifeia/Negative Reinforcement as a Framework for Medications Development. *Pharmacol Rev.* 73:163-201.
- Koob, G. F. & Le Moal, M. (1997). Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science;* 278: 52–58.
- Koob, G. F. & Le Moal, M. (2008). Addiction and the brain antireward system. *Annual Review Psychology,* 59:29-53.
- Koob, G. F. & Volkow, N. D. (2016). Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry,* 3:760-773.
- Koob, G. F., Ahmed, S. H., Boutrel, B., Chen, S. A., Kenny, P. J., Markou, A., O'Dell, L. E., Parsons, L. H. and Sanna, P. P. (2004). Neurobiological mechanisms in the transition from drug use to drug dependence. *Neurosci Biobehav Rev.* 27:739-749.
- Kozak, A. T. & Fought, A. (2011). Beyond alcohol and drug addiction. Does the negative trait of low distress tolerance have an association with overeating? *Appetite.* (3):578-581.
- Kurth, F., Zilles, K., Fox, P. T., Laird, A. R. and Eickhoff, S. B. (2010). A link between the systems: Functional differentiation and integration within the human insula revealed by meta-analysis. *Brain Structure & Function,* 214(5–6), 519–534.

- Lapish, C. C., Seamans, J. K. and Chandler, L. J. (2006). Glutamate-dopamine cotransmission and reward processing in addiction. *Alcohol Clin Exp Res.* 30:1451-1465.
- Lee, J. L. (2008). Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nature Neuroscience*, 11:1264-1266.
- Lee, J. L., Di Ciano, P., Thomas, K. L. and Everitt, B. J. (2005). Disrupting reconsolidation of drug memories reduces cocaine-seeking behavior. *Neuron.* 47:795-801.
- Luo, F., Li, S. H., Tang, H., Deng, W. K., Zhang, Y. and Liu, Y. (2015). Phenylephrine enhances glutamate release in the medial prefrontal cortex through interaction with N-type Ca<sup>2+</sup> channels and release machinery. *J Neurochem.* 132:38-50.
- Maldonado, R., Valverde, O. and Berrendero, F. (2006). Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci.* 29:225-232.
- Matsuda, Y., Marzo, A. and Otani, S. (2006). The presence of background dopamine signal converts long-term synaptic depression to potentiation in rat prefrontal cortex. *J. Neurosci.* 26, 4803-4810.
- Mello, N. K. (1972). "Behavioral studies of alcoholism" in *Biology of Alcoholism*, eds B.Kissin and H.Begleiter (New York: Plenum Press), 210–219.
- Miller, C. A. & Marshall, J. F. (2005). Molecular substrates for retrieval and reconsolidation of cocaine-associated contextual memory. *Neuron.* 47:873-884.
- Milton, A. L., Lee, J. L. C., Butler, V. J., Gardner, R. J. and Everitt, B. J. (2008) Intra-amygdala and systemic antagonism of NMDA receptors prevents the reconsolidation of drug-associated memory and impairs subsequently both novel and previously acquired drug-seeking behaviors. *J. Neurosci.*, 28, 8230–8237.
- Milton, A.L. & Everitt, B.J. (2010). The psychological and neurochemical mechanisms of drug memory reconsolidation: implications for the treatment of addiction. *Eur. J. Neurosci.* 31, 2308–2319.
- Miranda, M. I. & McGaugh, J. L. (2004). Enhancement of Inhibitory avoidance and conditioned taste aversion memory with insular cortex infusions of 8-Br-cAMP: involvement of the basolateral amygdala. *Learn Mem.* 11, 312-317.
- Miranda, M.I., Ferreira G., Ramírez-Lugo L., y Bermúdez-Rattoni F. (2002). Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 11417-11422.
- Mockett, B. G., Guévremont, D., Williams, J.M. and Abraham, W.C. (2007). Dopamine D1/D5 receptor activation reverses NMDA receptor-dependent long-term depression in rat hippocampus. *J. Neurosci.* 27, 2918-2926.
- Moeller, F. G., Barratt, E. S., Dougherty, D. M., Schmitz, J. M. and Swann, A. C. (2001). Psychiatric aspects of impulsivity. *Am J Psychiatry*, 158: 1783–1793.
- Mueller, D., Perdikaris, D. and Stewart, J. (2002). Persistence and drug-induced reinstatement of a morphine-induced conditioned place preference. *Behav. Brain Res.* 136, 389-397.
- Müller, C. P. (2013). Episodic memories and their relevance for psychoactive drug use and addiction. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7:34.
- Myers, K. M., Ressler, K. J. and Davis, M. (2006). Different mechanisms of fear extinction dependent on length of time since fear acquisition. *Learn Mem.* 13:216-223.
- Nader, K., Schafe, G. E. and Ledoux, J. E. (2000). The labile nature of consolidation theory. *Nat. Rev. Neurosci.* 1, 216–219.

- Naqvi, N. H., & Bechara, A. (2010). The insula and drug addiction: an interoceptive view of pleasure, urges, and decision-making. *Brain. Struct. Funct.* 214, 435–450.
- Naqvi, N. H., Gaznick, N., Tranel, D. and Bechara, A. (2014). The insula: critical neural substrate for craving and drug seeking under conflict and risk. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1316, 53-70.
- Naqvi, N. H., Rudrauf, D., Damasio, H. and Bechara, A. (2007). Damage to the insula disrupts addiction to cigarette smoking. *Science* 315, 531-534.
- Naqvi, N.H. & Bechara, A. (2009). The hidden island of addiction: the insula. *Trends Neurosci.* 32, 56–67.
- Nestler, E. J. (2002). Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiol. Learn Mem.* 78, 637-647.
- Nestler, E. J. (2013). Cellular basis of memory for addiction. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 15:431-43.
- Nieh, E.H., Kim, S., Namburi, P. and Tye, K. M. (2013). Optogenetic dissection of neural circuits underlying emotional valence and motivated behaviors. *Brain Research*, 1511: 73–92.
- Ntamati, N. R. & Lüscher, C. (2016). VTA Projection Neurons Releasing GABA and Glutamate in the Dentate Gyrus. *eNeuro*, 3(4).
- Ohara, P. T., Granato, A., Moallem, T. M., Wang, B. R., Tillet, Y. and Jasmin, L. (2003). Dopaminergic input to GABAergic neurons in the rostral agranular insular cortex of the rat. *Journal of Neurocytology* 32, 131-1341.
- Omelchenko, N. & Sesack, S. R. (2009). Ultrastructural analysis of local collaterals of rat ventral tegmental area neurons: GABA phenotype and synapses onto dopamine and GABA cells. *Synapse (New York, N.Y.)*, 63(10), 895–906.
- Osorio-Gómez, D., Guzmán-Ramos, K. and Bermúdez-Rattoni F. (2017). Memory trace reactivation and behavioral response during retrieval are differentially modulated by amygdalar glutamate receptors activity: interaction between amygdala and insular cortex. *Learn Mem.* 24,14-23.
- Osorio-Gómez, D., Guzmán-Ramos, K. and Bermúdez-Rattoni, F. (2016). Differential involvement of glutamatergic and catecholaminergic activity within the amygdala during taste aversion retrieval on memory expression and updating. *Behavioural Brain Research*, 307:120-125.
- Otani, S., Bai, J. and Blot, K. (2015). Dopaminergic modulation of synaptic plasticity in rat prefrontal neurons. *Neurosci. Bull.* 3,183-190.
- Papaleonidopoulos, V., Kouvaros, S., Papatheodoropoulos, C. (2018). Effects of endogenous and exogenous D1/D5 dopamine receptor activation on LTP in ventral and dorsal CA1 hippocampal synapses. *Synapse* 72, e22033.
- Pelloux, Y., Murray, J. E. and Everitt, B. J. (2013). Differential roles of the prefrontal cortical subregions and basolateral amygdala in compulsive cocaine seeking and relapse after voluntary abstinence in rats. *Eur J Neurosci* 38:3018–3026.
- Peng, Y., Gillis-Smith, S., Jin, H., Tränkner, D., Ryba, N.J., Zuker, C.S. (2015). Sweet and bitter taste in the brain of awake behaving animals. *Nature* 527, 512-515.
- Pierce, R. C. & Kumaresan, V. (2006). The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neurosci Biobehav Rev.* 30:215-238.
- Prado, L., Luis-Islas, J., Sandoval, O.I., Puron, L., Gil, M.M., Luna, A., Arias-García, M.A., Galarraga, E., Simon, S.A., Gutierrez, R. (2016). Activation of glutamatergic fibers in the anterior NAc shell modulates reward activity in the aNAcSh, the lateral hypothalamus, and medial prefrontal cortex and transiently stops feeding. *J Neurosci*, 36, 12511-12529.

- Puig, M. V., Antzoulatos, E. G., and Miller, E. K. (2014). Prefrontal dopamine in associative learning and memory. *Neuroscience*, 282: 217–229.
- Pulvirenti, L. & Diana, M. (2001). Drug dependence as a disorder of neural plasticity: focus on dopamine and glutamate. *Rev Neurosci*. 12:141-158.
- Pushparaj, A., Kim, A. S., Musiol, M., Trigo, J.M. and Le Foll, B. (2015). Involvement of the rostral agranular insular cortex in nicotine self-administration in rats. *Behav. Brain Res*. 290, 77-83.
- Rivera-Olvera, A., Nelson-Mora, J., Gonsebatt, M.E. and Escobar, M.L. (2018). Extinction of aversive taste memory homeostatically prevents the maintenance of in vivo insular cortex LTP: Calcineurin participation. *Neurobiol. Learn Mem*. 154, 54-61.
- Robinson, T. E. & Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev*. 18:247-291.
- Robinson, T. E. & Berridge, K. C. (2008). The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363: 3137–3146.
- Rodríguez-Durán, L.F., Martínez-Moreno, A. and Escobar, M.L. (2017). Bidirectional modulation of taste aversion extinction by insular cortex LTP and LTD. *Neurobiol. Learn Mem*. 142, 85-90.
- Rodríguez-Ortiz, C. J. & Bermúdez-Rattoni, F. (2017). Determinants to trigger memory reconsolidation: The role of retrieval and updating information. *Neurobiol. Learn Mem*. 142, 4-12.
- Rodríguez-Ortiz, C. J., De la Cruz, V., Gutiérrez, R. and Bermúdez-Rattoni, F. (2005). Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learn Mem*. 12, 533-537.
- Rotge, J. Y., Cocker, P. J., Daniel, M. L., Belin-Rauscent, A., Everitt, B. J., and Belin, D. (2017). Bidirectional regulation over the development and expression of loss of control over cocaine intake by the anterior insula. *Psychopharmacology*, 234(9-10), 1623–1631.
- Rudbeck, L. and Dissing, J. (1998). Rapid, simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. *BioTechniques* 25, 588–592.
- Russo, S. J. & Nestler, E. J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature reviews. Neuroscience* 14, 609–625.
- Sadler, R., Herzig, V. and Schmidt, W.J. (2007). Repeated treatment with the NMDA antagonist MK-801 disrupts reconsolidation of memory for amphetamine-conditioned place preference. *Behav. Pharmacol.*, 18, 699–703.
- Sakurai, S., Yu, L. and Tan, S.E. (2007). Roles of hippocampal N-methyl-d-aspartate receptors and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in amphetamine-produced conditioned place preference in rats. *Behav. Pharmacol.*, 18, 497–506.
- Santoyo-Zedillo, M., Rodríguez-Ortiz, C. J., Chavez-Marchetta, G., Bermudez-Rattoni, F. and Balderas, I. (2014). Retrieval is not necessary to trigger reconsolidation of object recognition memory in the perirhinal cortex. *Learn Mem*. 21, 452-456.
- Sara, S. (2009). The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nat Rev Neurosci* 10, 211–223.
- Sara, S. J. (2000). Retrieval and reconsolidation: toward a neurobiology of remembering. *Learning & Memory*, 7:73-84.

- Scherf, T. & Angenstein, F. (2017). Hippocampal CA3 activation alleviates fMRI-BOLD responses in the rat prefrontal cortex induced by electrical VTA stimulation. *PLoS One*. 27;12:e0172926.
- Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación; 2001. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación de México. Estados Unidos Mexicanos.
- Sharma, S., Rakoczy, S. and Brown-Borg, H. (2010). Assessment of spatial memory in mice. *Life Sciences*, 87: 521-536.
- Shinohara, F., Kamii, H., Minami, M. and Kaneda, K. (2017). The Role of Dopaminergic Signaling in the Medial Prefrontal Cortex for the Expression of Cocaine-Induced Conditioned Place Preference in Rats. *Biol Pharm Bull*. 40:1983-1989.
- Shivarama Shetty, M., Gopinadhan, S. and Sajikumar, S. (2016). Dopamine D1/D5 receptor signaling regulates synaptic cooperation and competition in hippocampal CA1 pyramidal neurons via sustained ERK1/2 activation. *Hippocampus* 26, 137-150.
- Sorg, B. A. (2012). Reconsolidation of drug memories. *Neurosci Biobehav Rev* 36: 1400–1417.
- Squire, L. R. & Zola, S. M. (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:13515-13522.
- Stefanik, M. T. & Kalivas, P. W. (2013). Optogenetic dissection of basolateral amygdala projections during cue-induced reinstatement of cocaine seeking. *Front. Behav. Neurosci*. 7, 213.
- Tang, W., Kochubey, O., Kintscher, M. and Schneggenburger, R. (2020). A VTA to Basal Amygdala Dopamine Projection Contributes to Signal Salient Somatosensory Events during Fear Learning. *J Neurosci*. 40:3969-3980.
- Taylor, J. R., Olausson, P., Quinn, J. J. and Torregrossa, M. M. (2009). Targeting extinction and reconsolidation mechanisms to combat the impact of drug cues on addiction. *Neuropharmacology* 56: 186–195.
- Taylor, S. R., Badurek, S., Dileone, R. J., Nashmi, R., Minichiello, L. and Picciotto, M. R. (2014). GABAergic and glutamatergic efferents of the mouse ventral tegmental area. *J Comp Neurol*. 522:3308-3334.
- Thompson, A. M., Swant, J., Gosnell, B. A. and Wagner, J. J. (2004). Modulation of long-term potentiation in the rat hippocampus following cocaine self-administration. *Neuroscience*. 127:177-1785.
- Torregrossa, M. M. & Taylor, J. R. (2012). Learning to forget: manipulating extinction and reconsolidation processes to treat addiction. *Psychopharmacology*, 226: 659-672.
- Torregrossa, M. M. & Taylor, J. R. (2016). Neuroscience of learning and memory for addiction medicine: from habit formation to memory reconsolidation. *Progress in Brain Research*, 223:91-113.
- Tritsch, N. X., Ding, J. B. and Sabatini, B. L. (2012). Dopaminergic neurons inhibit striatal output through non-canonical release of GABA. *Nature*. 490:262-266.
- Tronson, N. C. & Taylor, J. R. (2007). Molecular mechanisms of memory reconsolidation. *Nature Reviews*, 8:262-275.
- Tsai, H. C., Zhang, F., Adamantidis, A., Stuber, G. D., Bonci, A., De Lecea, L. and Deisseroth, K. (2009). Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. *Science* 324, 1080-1084.
- Uchida, S., Teubner, B.J.W., Hevi, C., Hara, K., Kobayashi, A., Dave, R.M., Shintaku, T., Jaikhan, P., Yamagata, H., Suzuki, T., Watanabe, Y., Zakharenko, S.S. and Shumyatsky, G.P.

- (2017). CRTC1 Nuclear Translocation Following Learning Modulates Memory Strength via Exchange of Chromatin Remodeling Complexes on the Fgf1 Gene. *Cell Rep.* 18, 352-366.
- Venniro, M., Caprioli, D., Zhang, M., Whitaker, L. R., Zhang, S., Warren, B. L., Cifani, C., Marchant, N. J., Yizhar, O., Bossert, J. M., Chiamulera, C., Morales, M. and Shaham, Y. (2017). The anterior insular cortex→central amygdala glutamatergic pathway is critical to relapse after contingency management. *Neuron* 96, 414-427.
- Volkow, N. D. & Morales, M. (2015). The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. *Cell.* 162, 712-725.
- Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G. J, Goldstein, R. Z. (2002). Role of dopamine, the frontal cortex and memory circuits in drug addiction: insight from imaging studies. *Neurobiol Learn Mem.* 78:610-624.
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Telang, F., Fowler, J. S., Logan, J., Childress, A. R, Jayne, M., Ma, Y. and Wong C. Cocaine cues and dopamine in dorsal striatum: mechanism of craving in cocaine addiction. *J Neurosci* 26: 6583–6588 (2006).
- Von Der Goltz, C., Vengeliene, V., Bilbao, A., Perreau-Lenz, S., Pawlak, C.R., Kiefer, F. and Spanagel, R. (2009). Cue-induced alcohol seeking behaviour is reduced by disrupting the reconsolidation of alcohol-related memories. *Psychopharmacology*, 205, 389–397.
- Wang, R. C., Xiao, L. F., Zhang, C., Sun, T. and Sun, K. S. (2020). Intra-nucleus accumbens shell injection of baclofen blocks the reconsolidation of conditioned place preference in morphine-addicted mice. *Sheng Li Xue Bao.* 72:255-261.
- Wassum, K. M. & Izquierdo, A. (2015). The basolateral amygdala in reward learning and addiction. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 57, 271-283.
- Wikler, A. Dynamics of drug dependence: Implications of a conditioning theory for research and treatment. *Arch Gen Psychiatry* 28: 611–616 (1973).
- Wise, R. A. (1980). Action of drugs of abuse on brain reward systems. *Pharmacol Biochem Behav* 13: 213–223.
- Wise, R. A. (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nature*, 5:1-12.
- Wise, R. A. & Bozarth, M. A. (1984). Brain reward circuitry: four circuit elements "wired" in apparent series. *Brain Res Bull.* 12:203-208.
- Wise, R. A. & Bozarth, M. A. (1987). A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev.* 94(4):469-492.
- Wise, R. A. (2002). Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron* 36: 229–240.
- Wise, R. A. & Bozarth, M. A. (1982). Action of drugs of abuse on brain reward systems: an update with specific attention to opiates. *Pharmacol Biochem Behav.* 17:239-343.
- Wu, Y., Li, Y., Gao, J. and Sui, N. (2012). Differential effect of NMDA receptor antagonist in the nucleus accumbens on reconsolidation of morphine-related positive and aversive memory in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 674, 321-326.
- Yousefzadeh-Fard, Y., Gharedaghi, M. H., Esmaeili, S., Pourbakhtyaran, E., Sadaghiani, M. S., Ghorbani, A. and Sahraian, M. A. (2013). Stroke modifies drug consumption in opium addicts: role of the insula. *Basic and clinical neuroscience*, 4, 307–314.
- Zhai, H., Wu, P., Chen, S., Li, F., Liu, Y. and Lu, L. (2008) Effects of scopolamine and ketamine on reconsolidation of morphine conditioned place preference in rats. *Behav. Pharmacol.*, 19, 211–216.

## 10. ANEXO I



ARTICLE



<https://doi.org/10.1038/s42003-020-0862-z>

OPEN

# Glutamatergic basolateral amygdala to anterior insular cortex circuitry maintains rewarding contextual memory

Elvi Gil-Lievana<sup>1</sup>, Israela Balderas<sup>1</sup>, Perla Moreno-Castilla<sup>1,4</sup>, Jorge Luis-Islas<sup>2</sup>, Ross A. McDevitt<sup>3</sup>, Fatuel Tecuapetla<sup>1</sup>, Ranier Gutierrez<sup>2</sup>, Antonello Bonci<sup>4</sup> & Federico Bermúdez-Rattoni<sup>1</sup>✉

Findings have shown that anterior insular cortex (aIC) lesions disrupt the maintenance of drug addiction, while imaging studies suggest that connections between amygdala and aIC participate in drug-seeking. However, the role of the BLA → aIC pathway in rewarding contextual memory has not been assessed. Using a cre-recombinase under the tyrosine hydroxylase (TH+) promoter mouse model to induce a real-time conditioned place preference (rtCPP), we show that photoactivation of TH+ neurons induced electrophysiological responses in VTA neurons, dopamine release and neuronal modulation in the aIC. Conversely, memory retrieval induced a strong release of glutamate, dopamine, and norepinephrine in the aIC. Only intra-aIC blockade of the glutamatergic N-methyl-D-aspartate receptor accelerated rtCPP extinction. Finally, photoinhibition of glutamatergic BLA → aIC pathway produced disinhibition of local circuits in the aIC, accelerating rtCPP extinction and impairing reinstatement. Thus, activity of the glutamatergic projection from the BLA to the aIC is critical for maintenance of rewarding contextual memory.

<sup>1</sup>División de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México City, Mexico. <sup>2</sup>Departamento de Farmacología, Centro de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, 07360 México City, Mexico. <sup>3</sup>Present address: Intramural Research Program, National Institute on Aging, National Institutes of Health, Baltimore, MD 21224, USA. <sup>4</sup>Present address: Global Institutes on Addiction, 1221 Brickell Ave, Miami FL33131, USA. ✉email: [fbermude@ifc.unam.mx](mailto:fbermude@ifc.unam.mx)



The insular cortex (IC) is a region located in the temporal lobe of the brain that has been linked to the salience of stimuli<sup>1,2</sup>, visceral control<sup>3</sup>, recognition memory<sup>4</sup>, and drug addiction<sup>5,6</sup>. It has been reported that human anterior IC (aIC) lesions completely suppress smoking addiction without relapse<sup>7–10</sup>. In addition, studies in rodents have demonstrated the participation of the aIC in the maintenance of drug addiction<sup>11–16</sup>, although the cellular mechanisms underlying this process remain elusive.

Drugs of abuse are addictive due to the rewarding effects mediated by dopamine, a neurotransmitter released by ventral tegmental area (VTA) neurons that project to aIC and basolateral amygdala (BLA), among other areas<sup>17–19</sup>. However, it also has been postulated that the brain's reward circuitry is not only driven by dopaminergic neurotransmission; additional mechanisms, such as glutamatergic neurotransmission are involved in rewarding behavior<sup>20,21</sup>. Glutamatergic synaptic plasticity in addiction shares the same molecular mechanisms involved in learning and memory processes<sup>20,22,23</sup>. For example, tetanic stimulation of BLA induces long-term potentiation (LTP) in the IC, in an N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR)-dependent manner<sup>24–26</sup>. Moreover, the glutamatergic communication between the BLA and IC participates in the consolidation of several forms of memories like conditioned taste aversion<sup>27,28</sup>. Other studies have suggested that the BLA and the aIC are structures involved in rewarding behavior<sup>29–32</sup> and a magnetic resonance imaging study in humans has corroborated these findings<sup>33</sup>. However, the role of the BLA → aIC interaction in the maintenance and reinstatement of rewarding memory has not been described. This led us to hypothesize that the aIC glutamatergic afferents from the BLA are involved in the maintenance of rewarding contextual memory.

To this end, we optogenetically stimulated VTA dopamine neurons in a real-time conditioned place preference (rtCPP) paradigm, a behavioral model used to study the association of rewarding stimuli with contextual cues<sup>34–37</sup>. We found that optogenetic stimulation of tyrosine hydroxylase-expressing (TH+) VTA cell bodies produced electrophysiological responses in VTA neurons and mild but reliable modulation of aIC neuronal responses. *In vivo* microdialysis revealed a strong dopamine release in the aIC during VTA photoactivation. In addition, during rtCPP retrieval, we observed glutamate, dopamine and noradrenaline release in the aIC. Thus, we tested the role of these neurotransmitters during reconsolidation of the rtCPP memory. Several studies have suggested that consolidated memories may undergo a labile process during and after retrieval (updating), which destabilizes the original memory trace and makes it susceptible to being affected by amnesic agents, a process named reconsolidation<sup>38,39</sup>. Interestingly, disrupting the reconsolidation of memories associated with drugs of abuse has been identified as a potential clinical target for the treatment of addiction<sup>40,41</sup>. Accordingly, pharmacological manipulations revealed that only blockade of NMDA receptors in the aIC after the retrieval session accelerated rtCPP extinction and impaired rtCPP reinstatement. Moreover, photoinhibition of the glutamatergic BLA → aIC afferent fibers during retrieval accelerated rtCPP extinction and impaired subsequent reinstatement. Taken together, these results demonstrate that the glutamatergic BLA → aIC projection is necessary for the maintenance of rewarding contextual memories.

## Results

### Cortical modulation by photoactivation of VTA TH+ neurons.

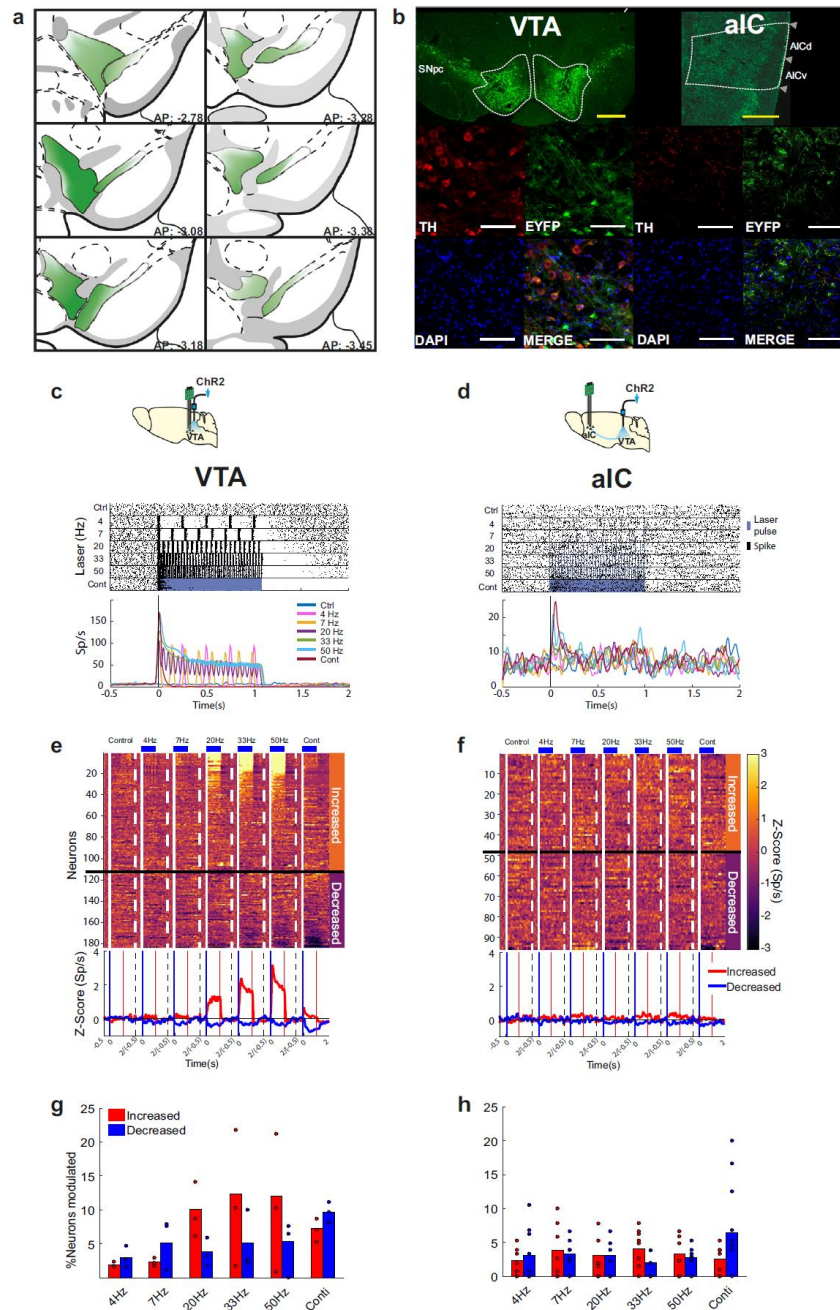
To target midbrain dopamine neurons, we injected TH-cre mice bilaterally into VTA tissue with a virus encoding cre-dependent channelrhodopsin-2 (ChR2-eYFP). First, we characterized the expression of eYFP protein in VTA neurons and inputs from VTA into aIC of ChR2 mice to corroborate the presence of a

dopaminergic VTA → aIC pathway. To this end, coronal VTA brain slices were analyzed. We observed that VTA neurons with endogenous tyrosine hydroxylase (TH) immunoreactivity were positive for eYFP near the viral injection site. Similarly, in coronal aIC slices, eYFP expression co-localized with TH+ terminals from VTA (Fig. 1a, b). Then, to characterize the functional modulation of the VTA → aIC circuit, we performed electrophysiological recordings in VTA or aIC in freely moving naïve mice during VTA TH+ neuron photoactivation. Figure 1c depicts a raster plot and peri-stimulus time histogram of a representative single neuron recorded in the VTA that increased its firing rate after each light pulse. This VTA neuron could follow frequencies up to 20 Hz. At higher frequencies and continuous stimulation, it exhibited an initial rapid peak followed by a gradual decay of the activity (Fig. 1c). The inhibitory component was more evident at continuous stimulation, suggesting that VTA TH+ neurons underwent strong negative control feedback at higher frequencies. The same modulatory pattern was observed at the population activity level (Fig. 1e). Briefly, 23.7% (111 out of 468) of neurons exhibited higher firing rates, whereas 15.3% (72/468) showed lower responses during, at least, in one laser frequency relative to activity in control trials (Fig. 1e, g). In contrast, aIC neurons responded with slight modulation during photoactivation of TH+ neurons in the VTA (Fig. 1d, f, h); 12.3% increased (48/390) whereas 12% decreased (47/390), which affected fewer aIC neurons than those modulated in VTA (Fig. 1h and Supplementary Fig. 1). In sum, electrophysiological recordings revealed that 20 Hz (5 ms width, 12–14 mW and 473 nm) was the optimal stimulation frequency for our preparation; therefore, we used it for all subsequent behavioral experiments.

**Activation of VTA TH+ neurons induces rtCPP.** To test the participation of the aIC in the extinction of rewarding contextual memory, we first characterized the rtCPP induced by optogenetic stimulation of VTA TH+ neurons (Fig. 2a). We found that ChR2 mice trained in a single 5- or 20-min session developed a mild place preference (Fig. 2b). However, ChR2 mice trained for three 20-min sessions on 3 consecutive days (one session per day) developed a strong conditioned preference for the side paired with optogenetic stimulation (Fig. 2c, e). The robust place preference was maintained for five continuous extinction sessions (one per day) until the conditioned preference disappeared completely. To establish whether a reinstatement stimulation could restore the rtCPP conditioning after almost complete extinction, photoactivation was applied to ChR2 mice during a reinstatement session (ChR2/with reinstatement) in the previously conditioned side following the acquisition protocol, but in a single 5 min session (Fig. 2d). Interestingly, the magnitude of place preference displayed by ChR2/with reinstatement mice in subsequent extinction sessions was much greater than that of ChR2/without reinstatement mice. These results show that once a contextual memory is extinguished, brief photoactivation of VTA TH+ neurons is sufficient to restore the preference for the conditioned side.

### rtCPP retrieval induces neurotransmitters release in the aIC.

We tested the neurochemical response in the aIC due to the photoactivation of the VTA in naïve unconditioned mice and, separately, as a consequence of the rtCPP memory retrieval (post-conditioning) session in previously conditioned mice. We used *in vivo* microdialysis in freely moving mice coupled with electrophoresis detection to determine the extracellular concentration of dopamine, noradrenaline, glutamate, and gamma-aminobutyric acid. During the photoactivation of VTA

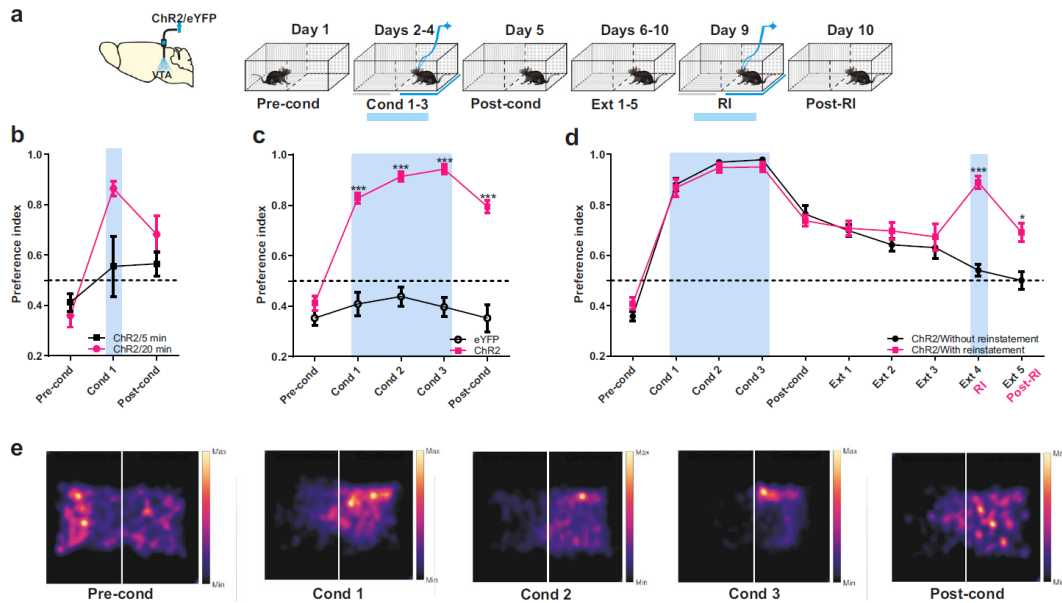


TH+ neurons in unconditioned mice (Fig. 3a), biochemical analysis revealed a strong increase of extracellular dopamine concentration (Fig. 3b). During the post-conditioning session, in the absence of the VTA TH+ neurons photoactivation (Fig. 3c), there was an increase of extracellular dopamine, noradrenaline, and glutamate concentrations (Fig. 3d). Dopamine was released during the photoactivation of the VTA TH+ neurons and during the post-conditioning session, whereas glutamate and

noradrenaline were only released during the post-conditioning session, indicating that these three neurotransmitters could be involved in the retrieval of a rewarding contextual memory.

**Cortical NMDA-receptor blockade accelerates rtCPP extinction.** Since the extracellular concentrations of dopamine, noradrenaline, and glutamate increased in the aIC during the post-rtCPP conditioning session, we administered intra-aIC injections

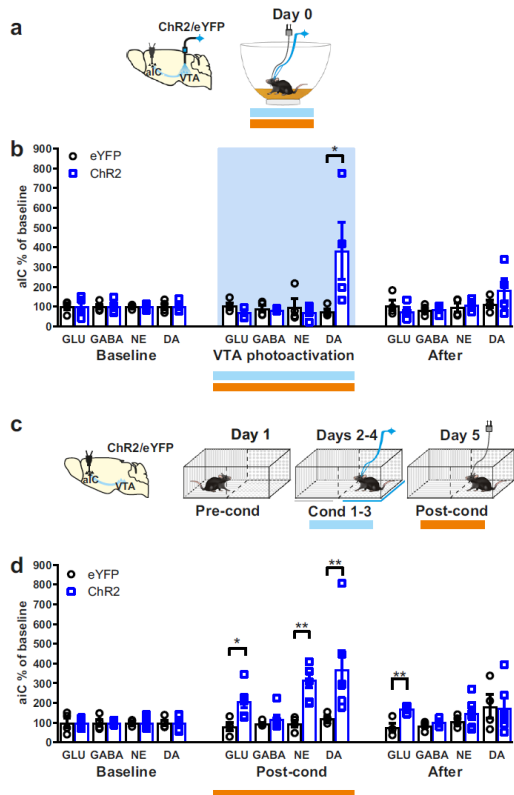
**Fig. 1 Photoactivation of VTA TH<sup>+</sup> somas evokes a neuromodulatory response in the aIC.** **a** Diagram of virus infection and diffusion throughout anteroposterior extent of TH (red), 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, blue), and eYFP (green) in somas at the VTA injection site (left panels) and in corresponding axons with VTA tissue. **b** Representative images of triple immunofluorescence in the aIC (right panels). Yellow scale bar represents 500  $\mu$ m and white scale bar represents 100  $\mu$ m. SNpc substantia nigra pars compacta, AICd agranular insular cortex dorsal, AICv agranular insular cortex ventral. **c** Raster plot and corresponding peri-stimulus time histogram (PSTH) (below, Sp/s, Spikes/s) of a VTA neuron recorded with an optrode (see scheme above). Responses were aligned to onset laser (time = 0); black ticks indicate a single action potential, whereas blue lines indicate laser pulses. **d** A representative neuron recorded in the aIC after photoactivation of VTA TH<sup>+</sup> neurons (see scheme above). **e** Heat map of neuronal population responses recorded in VTA normalized to z-scores as a function of laser frequency. Neurons were sorted according to its modulatory pattern either increased or decreased firing rates relative to activity in control trials (Kruskal–Wallis test). Below, corresponding population PSTHs; red lines represent neurons with increased and blue with decreased responses in response to laser. **f** All neurons recorded with an electrode in aIC and photostimulation of VTA neurons. **g** Percentage of neurons modulated in the VTA during photostimulation of VTA somas at different frequencies. **h** Percentage of neurons modulated in aIC during photostimulation of VTA somas. In **g, h** each dot represents an individual mouse.



**Fig. 2 Photoactivation of VTA TH<sup>+</sup> induces strong rtCPP.** **a** Diagram of virus infection, photoactivation of VTA TH<sup>+</sup> neurons and time course of behavioral procedures. The preference of the compartments was determined during the pre-conditioning (Pre-cond). Optogenetic stimulation was performed in the least preferred place. Blue bars show photoactivation of VTA at 20 Hz (5 ms width), 12–14 mW and 473 nm. In the post-conditioning (Post-cond), preference of the compartments was tested after optogenetic stimulation conditioning. **b** Mice were conditioned during a single session (Cond 1) for 5 ( $n = 5$ ) or 20 min ( $n = 6$ ). Two-way repeated measures ANOVA with Greenhouse–Geisser correction factor showed no group effect:  $F_{1,9} = 3.341$ ,  $P = 0.1008$ , time effect:  $F_{1,237,11,14} = 15.47$ ,  $P = 0.0015$ , and interaction:  $F_{2,18} = 4.480$ ,  $P = 0.0264$ . **c** Mice with ChR2 ( $n = 15$ ) or eYFP ( $n = 13$ ) expression in VTA were conditioned for three sessions (Cond 1–3) of 20 min. Two-way repeated measures ANOVA with Greenhouse–Geisser correction factor showed main group effect:  $F_{1,26} = 187.8$ ,  $P < 0.0001$ , time effect:  $F_{2,976,77,38} = 34.80$ ,  $P < 0.0001$ , and interaction effect:  $F_{4,104} = 21.81$ ,  $P < 0.0001$ . Post hoc Bonferroni test eYFP vs. ChR2 for Cond 1–3 and Post-cond  $P < 0.0001$ . **d** Extinction rate for five sessions of 20 min of conditioning place preference (Ext 1–5) (ChR2/Without reinstatement group,  $n = 8$ ) and place preference reinstatement (Post-RI) after 5 min optogenetic stimulation (RI) (ChR2/With reinstatement group,  $n = 8$ ). Two-way repeated measures ANOVA with Greenhouse–Geisser correction factor showed main group effect:  $F_{1,14} = 12.64$ ,  $P = 0.0032$ , time effect:  $F_{4,852,67,93} = 79.80$ ,  $P < 0.0001$ , and interaction effect:  $F_{9,126} = 9.385$ ,  $P < 0.0001$ . Post hoc Bonferroni test ChR2/Without reinstatement vs. ChR2/With reinstatement for Ext 4/RI  $P < 0.0001$  and for Ext5/Post-RI  $P = 0.0246$ . **e** Representative heat maps of rtCPP phases. All data are shown as mean  $\pm$  SEM. Dashed horizontal lines indicate no preference. \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.0001$ .

of antagonists for dopamine, noradrenaline, or glutamate receptors after rtCPP retrieval session (Fig. 4a). We observed that administration of the D1-like receptor antagonist SCH23390 or the  $\beta$ -adrenergic receptor antagonist propranolol did not affect maintenance of rtCPP (Fig. 4b). In contrast, intra-aIC injection of AP5, an NMDA-receptor antagonist, accelerated rtCPP extinction. Interestingly, rtCPP was re-established after a reinstatement session in the ChR2/vehicle group but not in the ChR2/AP5 group (Fig. 4c). In contrast, intra-aIC injections of cyanquinoxaline

(CNQX), a glutamate  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) receptor antagonist, did not affect the maintenance of rtCPP (Fig. 4c). In order to know whether blockade of the NMDA receptors in the aIC after retrieval would have permanent nonspecific effects on rtCPP, we performed a reversal conditioning (Rcond 1–3) procedure. We observed that a previous blockade of NMDA receptors in the aIC did not impair the subsequent formation of new conditioning (Supplementary Fig. 2).



**Fig. 3** Photoactivation of VTA TH<sup>+</sup> neurons induces dopamine release, whereas rtCPP retrieval induces dopamine, noradrenaline, and glutamate release in aIC. **a** Diagram of virus infection, photoactivation of VTA TH<sup>+</sup> neurons, and microdialysis guide cannula implantation into aIC. **b** Relative extracellular concentration of neurotransmitters compared with the baseline before, during, and after the photoactivation of VTA (blue bar) in eYFP ( $n = 4$ ) and Chr2 ( $n = 4$ ) mice. Horizontal blue bars indicate photoactivation of VTA. In vivo microdialysis (orange bar) revealed that extracellular concentration of dopamine (DA) increased during the VTA stimulation in Chr2 mice. For DA, Mann-Whitney test showed difference between eYFP vs. Chr2 during VTA stimulation  $U$  value = 0,  $P = 0.0286$ . Noradrenaline (NA), Glutamate (GLU), and gamma-aminobutyric acid (GABA) did not show statistically significant changes. **c** Diagram of virus infection, microdialysis guide cannula implantation into aIC and real-time conditioning place preference (rtCPP). **d** Relative extracellular concentration of neurotransmitters compared with the baseline before, during (Post-cond) and after the rtCPP retrieval in eYFP ( $n = 4$ ) and Chr2 ( $n = 6$ ) mice. In vivo microdialysis (orange bar) revealed increased extracellular concentrations of DA, NE, and GLU due to the context exposure during rtCPP retrieval in Chr2 mice. For GLU, Mann-Whitney test showed difference between eYFP vs. Chr2 during Post-cond  $U$  value = 1,  $P = 0.0190$  and after rtCPP  $U$  value = 0,  $P = 0.0095$ . For NA, Mann-Whitney test showed difference between eYFP vs. Chr2 during Post-cond  $U$  value = 0,  $P = 0.0095$ . For DA, Mann-Whitney test showed difference between eYFP vs. Chr2 during Post-cond  $U$  value = 0,  $P = 0.0095$ . All data are shown as mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ .

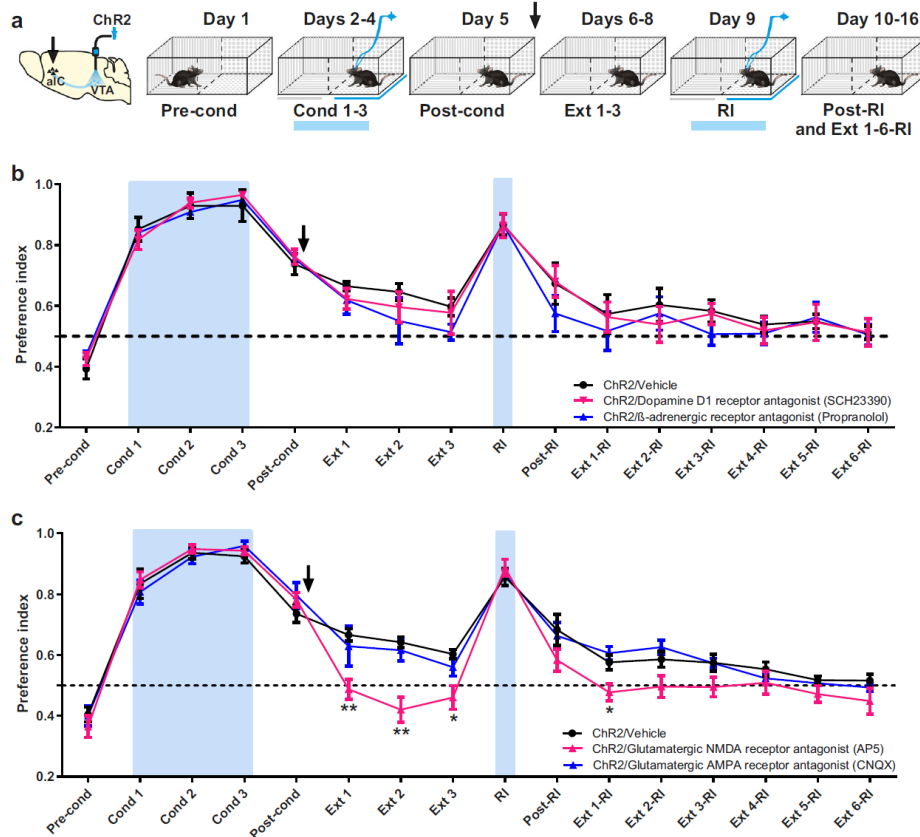
**Inhibition of BLA  $\rightarrow$  aIC pathway accelerates rtCPP extinction.** Several studies have linked the stimulation of the BLA  $\rightarrow$  IC pathway with plastic changes in the IC that are related to memory consolidation and extinction<sup>42,43</sup>. Similarly, high-frequency

stimulation of the BLA induces long-term facilitation in the IC and produces a more prolonged extinction of aversive memories<sup>25</sup>. In addition, microinjections of NMDA antagonists into the IC occlude changes in synaptic plasticity and long-term behavior<sup>26,44–46</sup>. Altogether, these data suggest that the fibers coming from the BLA to the IC are glutamatergic and could modulate memory consolidation.

To evaluate whether silencing glutamatergic afferent fibers from the BLA to the aIC could accelerate rtCPP extinction, we performed photoinhibition of the BLA  $\rightarrow$  aIC fibers during or after rtCPP retrieval in Chr2/NpHR3.0 and Chr2/eYFP mice (Fig. 5a). We photo-stimulated aIC tissue with green light (12–14 mW, 532 nm) throughout the entire post-conditioning session, regardless of the side visited by the mouse. We found that inhibition of glutamatergic afferent inputs from BLA into aIC during the post-conditioning session accelerated the extinction process (Fig. 5b). Likewise, the CPP was restored after a reinstatement session in the Chr2/eYFP but not in the Chr2/NpHR3.0 group. However, when applied after termination of a post-conditioning session, photoinhibition did not affect the maintenance or extinction of rtCPP (Fig. 5c), suggesting the existence of a critical window where BLA  $\rightarrow$  aIC inputs are necessary for maintenance of the rewarding contextual memory. Finally, in a different group of naïve Chr2/NpHR3.0 mice implanted with an optrode in aIC, we found that the somata of BLA neurons expressing NpHR3.0 send projection fibers to aIC (Fig. 6a, b). We then demonstrated that 1 min of continuous photoinhibition of glutamatergic BLA  $\rightarrow$  aIC fibers resulted in a robust modulation of spontaneous activity in the aIC. Figure 6c, d shows two neurons recorded in aIC: one exhibiting excitation (panel c) and the other suppression (panel d) of neuronal responses evoked by green laser photoinhibition of BLA  $\rightarrow$  aIC terminals. Around 48.5% (130/268) of aIC neurons exhibited an increased firing rate, whereas 19.8% (53/268) exhibited a reduced firing rate during photoinhibition of BLA  $\rightarrow$  aIC glutamatergic afferent fibers (Fig. 6e, f). Thus, photoinhibition of glutamatergic BLA  $\rightarrow$  aIC afferent fibers results in a disinhibition of local cortical circuits in the aIC. Similar results were obtained in mice that only expressed NpHR3.0 in BLA in the absence of Chr2 in VTA (Supplementary Fig. 3), suggesting a lack of crosstalk between opsins. All in all, these results highlight the importance of BLA glutamatergic modulation upon aIC activity in the maintenance of rewarding contextual memory.

## Discussion

There is extensive evidence that the mesolimbic dopaminergic system is involved in substance use disorders as well as in many forms of addiction. This system is mainly formed by dopaminergic neurons in the VTA that project to many other forebrain regions<sup>47</sup>, including the aIC<sup>17</sup>. Stimulation of VTA dopaminergic neurons induces behavioral and cellular hallmarks of addiction, indicating sufficiency for the induction and progression of the disease<sup>48</sup>. Phasic stimulation produces action potentials of dopaminergic neurons in the VTA that are sufficient to establish a reliable rtCPP<sup>34</sup>, used to measure the association of contextual reward<sup>49</sup>. Optogenetic stimulation of the VTA allows for precise control of the temporal and spatial activity of dopaminergic neurons. Consequently, by using this model we were able to examine the interaction of the VTA with other relevant brain circuits participating in maintenance and extinction of rtCPP. Our findings indicate that although the firing of VTA neurons clearly covaries with each photoactivation pulse in the same structure, one conditioning session under photoactivation was not sufficient to induce a reliable rtCPP. Three conditioning

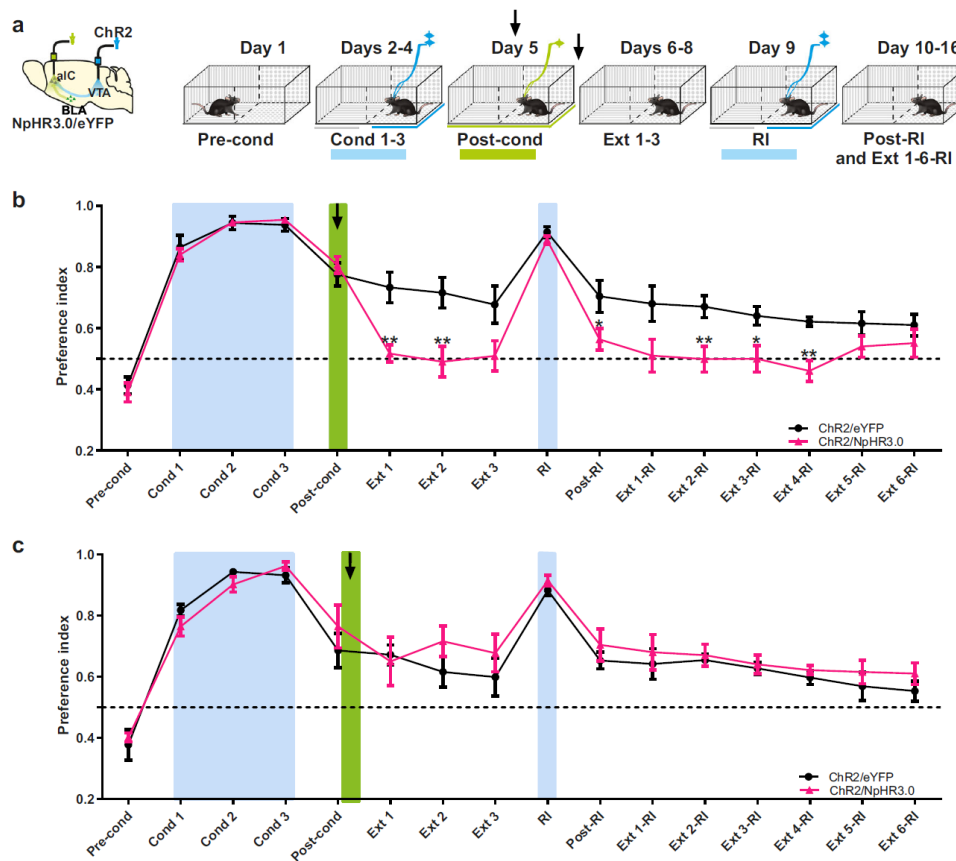


**Fig. 4** Post-conditioning microinjections of NMDA but not AMPA-receptor antagonist accelerate rtCPP extinction. **a** Diagram of virus infection, photoactivation of VTA TH<sup>+</sup> neurons, and timeline of behavioral procedures. The preference of the compartments was determined during the pre-conditioning (Pre-cond). Mice were conditioned during three sessions 20 min of photoactivation of VTA TH<sup>+</sup> neurons (Cond 1-3). Blue bars show photoactivation of VTA. In the post-conditioning (Post-cond), preference of the compartments was tested after optogenetic stimulation conditioning. **b** Microinjections of dopamine D1 (SCH23390) and  $\beta$ -adrenergic receptor antagonist (propranolol) into aIC after post-conditioning did not affect the maintenance (Ext 1-3) nor the reinstatement (Post-RI) of the rtCPP induced by photoactivation of 5 min (RI) of the VTA. ChR2/vehicle ( $n = 7$ ), ChR2/SCH23390 ( $n = 7$ ), and ChR2/Propranolol ( $n = 6$ ). Two-way repeated measures ANOVA with Greenhouse–Geisser correction factor showed no group effect:  $F_{2,17} = 0.3844$ ,  $P = 0.6866$ , time effect:  $F_{5,830,89.76} = 59.05$ ,  $P < 0.0001$ , and no interaction:  $F_{30,255} = 0.5162$ ,  $P = 0.9840$ . **c** Microinjections of NMDA (AP5) but not the AMPA (CNQX) receptor antagonists into the aIC after post-conditioning accelerated rtCPP extinction (Ext 1-3) and blocked the reinstatement (Post-RI) of rtCPP (Ext 1-6-RI) induced by 5-min photoactivation of the VTA (RI). ChR2/vehicle ( $n = 7$ ), ChR2/AP5 ( $n = 7$ ), and ChR2/CNQX ( $n = 7$ ). Two-way repeated measures ANOVA with Greenhouse–Geisser correction factor showed main group effect:  $F_{2,18} = 9.099$ ,  $P = 0.0019$ , time effect:  $F_{5,830,104.9} = 103.7$ ,  $P < 0.0001$ , and interaction:  $F_{30,270} = 2.216$ ,  $P = 0.0005$ . Post hoc Tukey test ChR2/Vehicle vs. ChR2/AP5 for Ext 1  $P = 0.0025$ , Ext 2  $P = 0.0028$ , Ext 3  $P = 0.0234$ , Ext 1-RI  $P = 0.0103$ . All data are shown as mean  $\pm$  SEM. The arrow indicates the time of administration of the drugs. Dashed horizontal lines indicate no preference. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

sessions of 20 min with 20 Hz photoactivation of VTA TH<sup>+</sup> neurons were required to produce a reliable and durable rtCPP. Likewise, we found that the maintenance of rtCPP was proportional to the duration of conditioning sessions. These findings give further support to the idea that memory stability relies on repeated exposure to stimuli<sup>50</sup>. In addition, our data uncovered that photoactivation of VTA TH<sup>+</sup> neurons plays a weak neuro-modulatory role in aIC neural responses in comparison with that of VTA stimulation. Accordingly, it has been reported that activation of the D1 receptor by itself does not elicit synaptic plasticity in rat hippocampus slices<sup>51</sup>, whereas high-frequency-induced LTP is facilitated or impaired by agonists or antagonist of dopamine receptors in the hippocampus and/or prefrontal cortex<sup>52–55</sup>.

Using *in vivo* microdialysis, we observed that re-exposure of mice to the conditioning context during a post-conditioning session induced strong release of dopamine, noradrenaline, and glutamate. These results suggest that exposure to the conditioned context during retrieval could be the triggering factor for the release of glutamate, dopamine, and noradrenaline in the aIC. In this regard, findings obtained in experiments using other aIC-dependent behavioral tasks suggest that the release of catecholamines and glutamate during retrieval is involved in the reconsolidation and maintenance of the conditioned responses<sup>28,56</sup>.

The phenomenon of reconsolidation posits that retrieval induces memory destabilization, creating a window in which consolidated memories are susceptible to pharmacological interference or updating with new information<sup>39,57</sup>. In this way, after

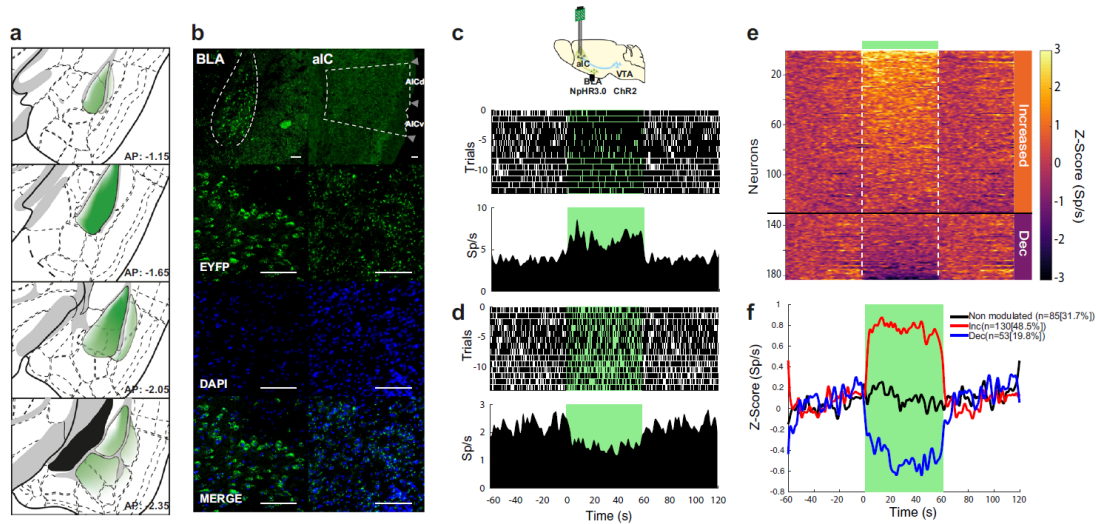


**Fig. 5** Photoinhibition of inputs from the BLA to the aIC accelerate rTCP extinction. **a** Diagram of virus infection into VTA TH<sup>+</sup> neurons, photoinhibition of BLA neurons, and timeline of behavioral procedures. The preference of the compartments was determined during the pre-conditioning (Pre-cond). Mice were conditioned during three sessions 20 min of photoactivation of VTA TH<sup>+</sup> neurons (Cond 1-3). Blue bars indicate photoactivation of VTA; green bar indicates photoinhibition of aIC. **b** Photoinhibition of the aIC during the post-conditioning (Post-cond) accelerated extinction in the ChR2/NpHR3.0 ( $n = 9$ ) but not in the ChR2/eYFP ( $n = 7$ ) group. Green bar shows photoinhibition of the aIC. The green laser was constantly pulsed at 12–14 mW and 532 nm. Two-way repeated measures ANOVA with Greenhouse-Geisser correction factor showed main group effect:  $F_{1,14} = 7.266$ ,  $P = 0.0174$ , time effect:  $F_{4,704,65.85} = 62.50$ ,  $P < 0.0001$ , and interaction:  $F_{15,210} = 4.406$ ,  $P < 0.0001$ . Post hoc Bonferroni ChR2/eYFP vs. ChR2/NpHR3.0 for Ext 1  $P = 0.0042$ , Ext 2  $P = 0.0068$ , Post-RI  $P = 0.0483$ , Ext 2-RI  $P = 0.0082$ , Ext 3-RI  $P = 0.0206$ , Ext 4-RI  $P = 0.0013$ . **c** Photoinhibition of the aIC after post-cond did not affect the maintenance of the rTCP in any of the two groups, NpHR3.0 ( $n = 7$ ) and eYFP ( $n = 7$ ). Two-way repeated measures ANOVA with Greenhouse-Geisser correction factor showed no group effect:  $F_{1,12} = 1.178$ ,  $P = 0.229$ , time effect:  $F_{5,815,69.78} = 29.01$ ,  $P < 0.0001$ , and no interaction:  $F_{15,180} = 0.6331$ ,  $P = 0.8450$ . All data are shown as mean  $\pm$  SEM. The arrow indicates the time of inhibition of BLA  $\rightarrow$  aIC circuitry. Dashed horizontal lines indicate no preference. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ .

retrieval, new information is compared with the already stored memories, which can thus be destabilized. Subsequently, both the destabilized memory and the incoming information are re-stabilized or reconsolidated into an updated long-term memory<sup>39,58</sup>. In the rTCP model, when mice are re-exposed to the learning environment a labile conditioned memory could be affected by amnesic drugs such as NMDA antagonists, impairing previous memory, and accelerating rTCP extinction. Such results have been reported with fear conditioning, object recognition memory, and traditional CPP<sup>59–61</sup>. We found that NMDA receptors are critical for maintaining rTCP, whereas D1,  $\beta$ -adrenergic, and AMPA receptors do not appear to participate in the maintenance of rTCP memory. Blockade of NMDA receptors in the aIC may destabilize the original memory trace, thereby accelerating extinction and impairing reinstatement to allow the acquisition of new reinforcement learning. This possibility is

supported by evidence showing that reconsolidation mechanisms in recognition memory require the activation of NMDA but not AMPA receptors<sup>59</sup>. Our results further demonstrate that intra-aIC administration of NMDA-receptor antagonists produced a reliable and long-lasting impairment of rTCP maintenance. Therefore, it is possible that the aIC could be an important hub that links contextual and visceral information related to the maintenance of memories associated with addictive drugs<sup>13,62</sup>.

Findings of several experiments suggest important communication between the amygdala and the IC during appetitive and aversive memory formation<sup>26,62–64</sup>. For example, a reliable LTP in the aIC was induced by high-frequency stimulation in the BLA, which was blocked by intracortical administration of an NMDA antagonist<sup>24,25,45</sup>. These results suggest that cortical plasticity induced by amygdala stimulation could be regulated by glutamate through activation of NMDA receptors in the aIC. Therefore, we



**Fig. 6** Continuous photoinhibition of glutamatergic BLA → aIC fibers provoke disinhibition of local cortical circuits in the aIC. **a** Diagram of virus infection and diffusion throughout BLA anteroposterior axis. **b** Representative images of double immunofluorescence for eYFP (green) and 4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI; blue) in basolateral amygdala (BLA) somas (left panels) and anterior insular cortex (aIC) axons (right panels). White scale bar represents 100  $\mu$ m. AICd agranular insular cortex dorsal, AICv agranular insular cortex ventral. **c** Raster plot and corresponding PSTH (below) of a representative excited neuron recorded in aIC. Responses were aligned (time = 0) to onset of photoinhibition for 1 min (shown by green rectangle). Black ticks indicate action potentials. Top, scheme of the experimental protocol. **d** Representative aIC neuron exhibiting suppression during photoinhibition. **e** Z-score normalized color-coded PSTH of neurons with either increased (Inc) or decreased (Dec) evoked responses recorded in the aIC while the glutamatergic BLA → aIC fibers were opto-inhibited. Red color indicates higher firing rates, whereas blue color inhibitory responses. Lines depict the start and the end of photoinhibition of green laser. **f** Mean Z-scores of neuronal populations categorized by significant increase (inc), decrease (dec), or no effect during photoinhibition.

hypothesized that BLA → aIC pathway could be involved in the maintenance of a rewarding contextual memory. We found that the photoinhibition of BLA projections to the aIC during rCPP retrieval accelerated the extinction process of a rewarding contextual memory. However, the inhibition of BLA projections to the aIC post-retrieval did not accelerate rCPP extinction. This effect is time-dependent, because it destabilizes the original memory trace only when the memory is in a labile state and susceptible to interference. We interpret these results to mean that optogenetic inhibition of BLA projections to the aIC impairs reconsolidation of rewarding contextual memory, but we cannot rule out that other alternative mechanisms are involved. The cellular mechanisms mediating the effects of photoinhibition of glutamatergic terminals and NMDA-receptor antagonists remain to be determined. It is possible that these two interventions unleash similar molecular events. These findings support the idea that glutamatergic signaling in the aIC constitutes an important mechanism for the maintenance and the re-establishment of rewarding contextual memory.

In summary, by employing optogenetic and behavioral approaches, we report that inhibition of the BLA → aIC pathway accelerates the extinction and impairs the re-establishment of a rewarding contextual memory. We observed a similar behavioral pattern by the pharmacological blockade of NMDA receptors in the aIC. Our data strongly suggest that the BLA → IC pathway is centrally involved in the maintenance of rewarding contextual memory through NMDAR-dependent glutamatergic signaling.

## Methods

**Animals.** TH-Cre mice (TH, F112 line) express Cre-recombinase protein under control of the endogenous TH promoter. Breeder mice were kindly donated by Dr Rui M. Costa from the Champalimaud (Center for the Unknown) and crossed onto C57BL/6J mice for at least six generations. Male and female experimental TH-Cre mice were 3 to 4 months old (23–35 g body weight) at the initiation of

experiments. No differences were found between male and female TH-Cre mice in any of the experiments performed. Mice were individually housed with food and water available ad libitum in a light/dark cycle room (12:12 h) with temperature of  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  and relative humidity of  $50 \pm 5\%$ . The behavioral tests were carried out during the light phase of the cycle. All procedures were approved by the Instituto de Fisiologia Celular (FBR125-18) Institutional Animal Care and Use Committee and complied with the guidelines established in the Official Mexican Standard (NOM-062-ZOO-1999).

**Genotyping.** We used the HotSHOT method<sup>65</sup> for DNA extraction. The method consists of the lysis of 1 mm of a tail snip in an alkaline reagent (NaOH 25 mM, diodium EDTA 0.2 mM) under heat conditions ( $95^\circ\text{C}$ , 1 h) and further neutralization with a suitable buffer (Tris-HCl 1 M at pH 7.5). After centrifugation at 2500 rpm by 2 min, the supernatant containing the DNA was recovered. This DNA was used for amplification through polymerase chain reaction (PCR) with the QIAGEN kit. The primers used for PCR were Cre Reverse 5'GGTTTCCCGCA GAACCTGAA and Cre Forward 5'AGCCTGTTTTGCACGTTTACC.

**Viral vector.** The Cre-inducible adeno-associated virus (AAV) was obtained from the University of North Carolina (UNC) Gene Therapy Center Vector Core. The viral concentration was  $5.2 \times 10^{12}$  virus molecules  $\text{ml}^{-1}$  for rAAV5/Efla-DIO-hChr2(H134R)-eYFP (Chr2),  $6.0 \times 10^{12}$  virus molecules  $\text{ml}^{-1}$  for rAAV5/Efla-DIO-eYFP (eYFP),  $5.2 \times 10^{12}$  virus molecules  $\text{ml}^{-1}$  for rAAV5-CamKIIa-eYFP/eYFP (eNpHR3.0), and  $5.1 \times 10^{12}$  virus molecules  $\text{ml}^{-1}$  for rAAV5-CamKIIa-eYFP (eYFP). Viruses were subdivided into aliquots stored at  $-80^\circ\text{C}$  until use.

**Stereotaxic surgery.** Mice were anesthetized with isoflurane (induction 3%, maintenance 1–1.5%, ViP 3000 Matrix). The microinjection needles (29-G) were connected to a 10  $\mu$ l Hamilton syringe and filled with AAV. For all experiments, the mice were bilaterally injected with AAV (0.5  $\mu$ l) at a rate of 0.1  $\mu$ l  $\text{min}^{-1}$  with additional 5 min for a complete diffusion and implanted with 200  $\mu$ m core optic fibers through 1.25-mm-wide zirconia ferrules in each hemisphere. The Chr2 or eYFP vectors were injected into the VTA (from Bregma (mm):  $-3.08$  AP,  $\pm 0.60$  ML, and  $-4.80$  DV). The NpHR3.0 or eYFP vectors were injected into the BLA (from Bregma (mm):  $-2.05$  AP,  $\pm 3.40$  ML, and  $-5.30$  DV). The optic fibers were implanted above the VTA (from Bregma (mm):  $-3.08$  AP,  $\pm 1.20$  ML, and  $-4.30$  DV at  $10^\circ$  angle) or the aIC (1.70 AP,  $\pm 2.60$  ML, and  $-2.75$  DV). For microdialysis experiments, the mice were implanted unilaterally with a guide cannula (CMA/7:

CMA Microdialysis) aimed at the aIC (from Bregma (mm): +1.40 AP,  $\pm$ 3.30 ML, and  $-3.5$  DV). For pharmacological experiments, the mice were implanted with bilateral guide cannulas (C316G-24 ga, Plastics One) into the IC (from Bregma (mm): +1.40 AP,  $\pm$ 3.30 ML, and  $-3.0$  DV). Coordinates were taken from Allen's reference atlas of the mouse brain<sup>66</sup>.

**General procedures.** The behavioral experiments began 3–4 weeks after surgery for the groups injected in the VTA to allow sufficient expression of opsins. They received optogenetic stimulation in the VTA or aIC through optical tethers, which consisted of a diode-pumped solid-state blue (473 nm) and green (532 nm) laser (150 mW; OEM Laser Systems) coupled to 62.5  $\mu$ m core, 0.22 NA standard multimode hard-cladding optical fiber (Thorlabs) that passed through a single-channel optical rotary joint (Doric Lenses) prior to being split 50:50 with a fused optical coupler. The intensity of light output was 12–15 mW per split fiber for all experiments. The mice were connected to the laser just before starting each behavioral or microdialysis session. For pharmacological studies, DL-2-amino-5-phosphopentanoic acid (10 mg ml<sup>-1</sup>, DL-AP5, #0105 Tocris Bioscience), an N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist; cyanquinoxaline (1 mg ml<sup>-1</sup>, CNQX disodium salt hydrate, #C239 Sigma-Aldrich), an  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) receptor antagonist; halobenzazepine (2 mg ml<sup>-1</sup>, SCH23390 hydrochloride, #D054 Sigma-Aldrich), a dopamine D1 receptor antagonist and DL-Propripranolol hydrochloride (5 mg ml<sup>-1</sup>, #P0884, Sigma-Aldrich), a  $\beta$ -adrenergic receptor antagonist, were dissolved in 0.9% saline solution. All drugs were injected into aIC immediately after the post-conditioning session at a rate of 0.25  $\mu$ l min<sup>-1</sup>. A video camera was mounted above the conditioned place preference compartments and the time spent in each compartment was tracked with Debut Video Capture-NCH computer software version 5.73.

**Real-time conditioned place preference (rtCPP).** The rtCPP apparatus (20  $\times$  20  $\times$  42 cm) consisted of an acrylic arena half divided with two different visual cues. One side had black/white stripes and the other side had black/white circles allowing mice freely to cross between sides. The position of the visual cues was counter-balanced in the experimental room. Mice were always free to explore the acrylic arena. During the pre-conditioning session (day 1), mice explored the arena for 10 min. The mice were conditioned in the side where they spent less time (less preferred) during the pre-conditioning session. During the 20-min conditioning sessions (day 2–4), the mice were photoactivated into VTA while they were in the conditioned side. The blue laser (473 nm) was pulsed at 20 Hz (5 ms width), 12–14 mW. ChR2 mice that spent at least 75% out of the total time during the third conditioning session in the conditioned side were included for all the experiments. During the post-conditioning session (day 5), ChR2 and eYFP mice explored the arena for 10 min without photostimulation. On the other hand, the mice injected in the BLA with NpHR3.0 (and corresponding eYFP control mice) received photoinhibition with the green laser into aIC throughout the entire post-conditioning session (day 5). The green laser (532 nm) was constantly pulsed at 12–14 mW. For all mice, extinction (days 6–8) and post-reinstatement sessions (days 10–16) were performed in the acrylic arena for 10 min. The reinstatement session of 5 min (day 9) consisted of photoactivation of the VTA while mice were in the previously conditioned side, using the same stimulation parameters as the conditioning sessions. The reversal conditioning (days 11–13) was performed through photoactivation of the VTA in the unconditioned side in free-moving mice after 5 extinction sessions (days 6–10). The preference index in the conditioned side was calculated by dividing the time spent in the conditioned side by the total time of exploration.

**Microdialysis.** Dialysis procedures began by connecting the probe inlet (dialysis probes CMA/7 from CMA Microdialysis, with a 2 mm total length of membrane) to the microinfusion pump system (CMA/Microdialysis), which infused continuously Ringer solution (NaCl 144 mM, KCl 4.8 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.2 mM, and CaCl<sub>2</sub> 1.7 mM) at a rate of 0.25  $\mu$ l min<sup>-1</sup>. The first 60 min of sampling were taken as a stabilization period. Through the microdialysis membrane, a total of six consecutive samples were collected in fractions of 16 min (4  $\mu$ l) in vials containing 1  $\mu$ l of an antioxidant mixture (0.25 nM ascorbic acid, Na<sub>2</sub>EDTA 0.27 mM, and 0.1 M acetic acid). The stabilization period was performed in a wooden box (30  $\times$  17  $\times$  19 cm) with two side gates. The wooden box was inside the rtCPP apparatus or microdialysis chamber (diameter 30 cm  $\times$  height 30 cm). Three samples were taken as a baseline. Once sample 3 was fully collected, the side gates were opened, and the wooden box was removed after the mouse left it. ChR2 and eYFP mice in the rtCPP apparatus were previously conditioned and sample 4 was collected during the post-conditioning session. ChR2 and eYFP naïve mice remained in the microdialysis chamber and sample 4 was collected during photoactivation of the VTA. Two more samples were recollected after the stimulus. The samples were stored at  $-80$  °C until analyzed with the capillary electrophoresis method (see below).

**Neurotransmitters analysis.** Neurotransmitter concentration was determined as previously described<sup>67</sup>. Briefly, samples were derivatized with 5-furoylquinoxaline-3-carbaldehyde (FQ) and analyzed by a Capillary Electrophoresis system (Beckman-Coulter PACE/MDQ, Glycoprotein System) with laser-induced fluorescence detection. Derivatization reaction: 4  $\mu$ l of a sample was spiked with 1  $\mu$ l internal

standard (1 mg/ml, O-methyl-L-threonine), mixed with 6  $\mu$ l of FQ (16.67 mM) and 2  $\mu$ l of KCN (25 mM). The mixture reacted in the dark (65 °C) for 15 min and the reaction was stopped with ice. The identification of neurotransmitters is based on the retention time in a micellar electrokinetic chromatography buffer system that includes borates 35 mM, sodium dodecyl sulfate 25 mM, and 13% methanol, at pH 9.5. The samples were injected hydro-dynamically at 0.5 psi for 5 s; then the separation was performed at 20 kV. While the molecules migrate inside the capillary they move through a window where an argon-ion laser excites them at 488 nm. Then fluorescence was filtered by a band-pass interference filter at 590 nm and detected by a photomultiplier tube. The signal was translated into peaks that form an electropherogram where they can be analyzed by comparing the area under the curve (AUC) of the unknown sample with the AUC of a known internal standard. Data were analyzed using the Karat System Gold (Beckman Coulter) version 5.0. All results were converted into a percentage of baseline release (% baseline = neurotransmitter concentration  $\times$  100/mean of the three first samples).

**Immunofluorescence.** Mice were sacrificed with sodium pentobarbital (75 mg/kg), perfused with 0.9% saline solution and fixed with 4% paraformaldehyde solution. Brain was quickly removed and stored in 4% paraformaldehyde solution. Leica CM520 cryostat was used to obtain 40  $\mu$ m coronal slices. Free-floating sections were incubated with rabbit polyclonal anti-TH primary antibody (Pel-Freez, Rogers, AR) dissolved in 5% bovine serum albumin buffer (NaCl 150 mM, Triton X-100 0.1%, trizma base 100 mM, pH 7.4) at a dilution of 1:1000 overnight. Sections were washed with Tris-buffered saline and incubated with goat anti-rabbit IgG conjugated to CY3 secondary antibody (Millipore, Darm-Stadt, Germany) dissolved in 5% bovine serum albumin buffer at a dilution of 1:250 for 2 h. Sections were mounted in Dako fluorescence mounting medium with 4',6-diamidino-2-phenylindol. Immunofluorescence was observed using a ZEISS LSM 800 confocal microscope.

**Optrode recordings during photoactivation of VTA neurons.** TH-Cre mice (ChR2,  $n = 11$ ) were injected with ChR2 bilaterally into the VTA (from Bregma (mm):  $-3.0$  AP,  $\pm$ 0.60 ML, and  $-4.80$  DV) and 3 weeks of recovery were allowed for ChR2 expression. After this time, eight mice were implanted bilaterally with optic fibers at VTA (from Bregma (mm):  $-3.0$  AP,  $\pm$ 1.20 ML, and  $-4.30$  DV,  $10^\circ$  angle) as described above, but in this case, an array of 16 tungsten wires was implanted unilaterally in the aIC (from Dura (mm): +1.4 AP,  $\pm$ 3.30 ML,  $-3.20$  DV). Another group of mice ( $n = 3$ ) were implanted with a homemade optrode (16 tungsten wires, 35  $\mu$ m each), surrounding the optic fiber<sup>21</sup> in the VTA (from Dura (mm):  $-3.0$  AP,  $\pm$ 0.60 ML, and  $-4.0$  DV). Mice were allowed 1 additional week to recover. Mice were recorded in a scanner laser frequency task<sup>21</sup>, where they received a random frequency of stimulation during 1 s on, followed by 2 s off, and the next frequency was randomly chosen. The frequencies of stimulation were: control (no stimulation), 4, 7, 20, 33, 50 Hz (5 ms pulse width), and a 1 s continuous pulse. The task was carried out for 20 min. Mice were recorded in maximum of nine consecutive sessions.

**Optrode recordings during photoinhibition of BLA  $\rightarrow$  aIC fibers.** One group of TH-Cre mice (NpHR3.0/ChR2,  $n = 3$ ) were injected with ChR2 bilaterally into the VTA (from Bregma (mm):  $-3.08$  AP,  $\pm$ 0.60 ML, and  $-4.80$  DV), NpHR3.0 bilaterally into the BLA (from Bregma (mm):  $-2.05$  AP,  $\pm$ 3.40 ML, and  $-5.30$  DV), and 3 weeks of recovery were allowed for ChR2 and NpHR expression. After that, an optrode was implanted unilaterally in the aIC (from Dura (mm): +1.4 AP,  $\pm$ 3.30 ML, and  $-3.20$  DV). Another group of TH-Cre mice (NpHR3.0,  $n = 5$ ) were injected only with NpHR3.0 bilaterally into the BLA (from Bregma (mm):  $-2.0$  AP,  $\pm$ 3.40 ML, and  $-5.30$  DV), and an optrode was implanted in aIC (from Dura (mm): +1.4 AP,  $\pm$ 3.30 ML, and  $-3.20$  DV) after 3 weeks. After surgery, mice were allowed 1 additional week for recovery. Then both groups of mice were recorded and photoinhibited into aIC during an open-loop task that consisted of blocks of 1 min laser on and 1 min off for 30 min (constant pulsed at 12–14 mW and 532 nm), in seven consecutive sessions.

**Extracellular recordings.** Neural activity was recorded using a Multichannel Acquisition Processor system (Plexon, Dallas, TX) interfaced with a Med Associates conditioning side of the rtCPP to record behavioral events simultaneously. Extracellular voltage signals were first amplified  $\times 1$  by an analog headstage (Plexon HST/16025-GEN2-18P-2GP-G1), then amplified ( $\times 1000$ ) and sampled at 40 kHz. Raw signals were band-pass filtered from 154 to 8.8 kHz and digitalized at 12 bits resolution. Only single neurons with action potentials with a signal-to-noise ratio of 3:1 were analyzed<sup>68</sup>. The action potentials were isolated on-line using voltage-time threshold windows and three principal components contour templates algorithm. A cluster of waveforms was assigned to a single unit if two criteria were met: inter-spike intervals were larger than the refractory period set to 1 ms, and if a visible ellipsoid cloud composed of the 3-D projections of the first three principal component analysis of spike waveform shapes was formed. Spikes were sorted using Offline Sorter software (Plexon, Dallas, TX)<sup>68</sup>. Only time stamps from offline-sorted waveforms were analyzed. All electrophysiological data were analyzed using MATLAB (The MathWorks Inc., Natick, MA).



CMA Microdialysis) aimed at the aIC (from Bregma (mm): +1.40 AP,  $\pm$ 3.30 ML, and  $-3.5$  DV). For pharmacological experiments, the mice were implanted with bilateral guide cannulas (C316G-24 ga, Plastics One) into the IC (from Bregma (mm): +1.40 AP,  $\pm$ 3.30 ML, and  $-3.0$  DV). Coordinates were taken from Allen's reference atlas of the mouse brain<sup>66</sup>.

**General procedures.** The behavioral experiments began 3–4 weeks after surgery for the groups injected in the VTA to allow sufficient expression of opsins. They received optogenetic stimulation in the VTA or aIC through optical tethers, which consisted of a diode-pumped solid-state blue (473 nm) and green (532 nm) laser (150 mW; OEM Laser Systems) coupled to 62.5  $\mu$ m core, 0.22 NA standard multimode hard-cladding optical fiber (Thorlabs) that passed through a single-channel optical rotary joint (Doric Lenses) prior to being split 50:50 with a fused optical coupler. The intensity of light output was 12–15 mW per split fiber for all experiments. The mice were connected to the laser just before starting each behavioral or microdialysis session. For pharmacological studies, DL-2-amino-5-phosphopentanoic acid (10 mg ml<sup>-1</sup>, DL-AP5, #0105 Tocris Bioscience), an N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist; cyanquinoxaline (1 mg ml<sup>-1</sup>, CNQX disodium salt hydrate, #C239 Sigma-Aldrich), an  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) receptor antagonist; halobenzazepine (2 mg ml<sup>-1</sup>, SCH23390 hydrochloride, #D054 Sigma-Aldrich), a dopamine D1 receptor antagonist and DL-Propranolol hydrochloride (5 mg ml<sup>-1</sup>, #P0884, Sigma-Aldrich), a  $\beta$ -adrenergic receptor antagonist, were dissolved in 0.9% saline solution. All drugs were injected into aIC immediately after the post-conditioning session at a rate of 0.25  $\mu$ l min<sup>-1</sup>. A video camera was mounted above the conditioned place preference compartments and the time spent in each compartment was tracked with Debut Video Capture-NCH computer software version 5.73.

**Real-time conditioned place preference (rtCPP).** The rtCPP apparatus (20  $\times$  20  $\times$  42 cm) consisted of an acrylic arena half divided with two different visual cues. One side had black/white stripes and the other side had black/white circles allowing mice freely to cross between sides. The position of the visual cues was counter-balanced in the experimental room. Mice were always free to explore the acrylic arena. During the pre-conditioning session (day 1), mice explored the arena for 10 min. The mice were conditioned in the side where they spent less time (less preferred) during the pre-conditioning session. During the 20-min conditioning sessions (day 2–4), the mice were photoactivated into VTA while they were in the conditioned side. The blue laser (473 nm) was pulsed at 20 Hz (5 ms width), 12–14 mW. ChR2 mice that spent at least 75% out of the total time during the third conditioning session in the conditioned side were included for all the experiments. During the post-conditioning session (day 5), ChR2 and eYFP mice explored the arena for 10 min without photostimulation. On the other hand, the mice injected in the BLA with NpHR3.0 (and corresponding eYFP control mice) received photoinhibition with the green laser into aIC throughout the entire post-conditioning session (day 5). The green laser (532 nm) was constantly pulsed at 12–14 mW. For all mice, extinction (days 6–8) and post-reinstatement sessions (days 10–16) were performed in the acrylic arena for 10 min. The reinstatement session of 5 min (day 9) consisted of photoactivation of the VTA while mice were in the previously conditioned side, using the same stimulation parameters as the conditioning sessions. The reversal conditioning (days 11–13) was performed through photoactivation of the VTA in the unconditioned side in free-moving mice after 5 extinction sessions (days 6–10). The preference index in the conditioned side was calculated by dividing the time spent in the conditioned side by the total time of exploration.

**Microdialysis.** Dialysis procedures began by connecting the probe inlet (dialysis probes CMA/7 from CMA Microdialysis, with a 2 mm total length of membrane) to the microinfusion pump system (CMA/Microdialysis), which infused continuously Ringer solution (NaCl 144 mM, KCl 4.8 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.2 mM, and CaCl<sub>2</sub> 1.7 mM) at a rate of 0.25  $\mu$ l min<sup>-1</sup>. The first 60 min of sampling were taken as a stabilization period. Through the microdialysis membrane, a total of six consecutive samples were collected in fractions of 16 min (4  $\mu$ l) in vials containing 1  $\mu$ l of an antioxidant mixture (0.25 nM ascorbic acid, Na<sub>2</sub>EDTA 0.27 mM, and 0.1 M acetic acid). The stabilization period was performed in a wooden box (30  $\times$  17  $\times$  19 cm) with two side gates. The wooden box was inside the rtCPP apparatus or microdialysis chamber (diameter 30 cm  $\times$  height 30 cm). Three samples were taken as a baseline. Once sample 3 was fully collected, the side gates were opened, and the wooden box was removed after the mouse left it. ChR2 and eYFP mice in the rtCPP apparatus were previously conditioned and sample 4 was collected during the post-conditioning session. ChR2 and eYFP naïve mice remained in the microdialysis chamber and sample 4 was collected during photoactivation of the VTA. Two more samples were recollected after the stimulus. The samples were stored at  $-80$  °C until analyzed with the capillary electrophoresis method (see below).

**Neurotransmitters analysis.** Neurotransmitter concentration was determined as previously described<sup>67</sup>. Briefly, samples were derivatized with 5-furoylquinoxaline-3-carbaldehyde (FQ) and analyzed by a Capillary Electrophoresis system (Beckman-Coulter PACE/MDQ, Glycoprotein System) with laser-induced fluorescence detection. Derivatization reaction: 4  $\mu$ l of a sample was spiked with 1  $\mu$ l internal

standard (1 mg/ml, O-methyl-L-threonine), mixed with 6  $\mu$ l of FQ (16.67 mM) and 2  $\mu$ l of KCN (25 mM). The mixture reacted in the dark (65 °C) for 15 min and the reaction was stopped with ice. The identification of neurotransmitters is based on the retention time in a micellar electrokinetic chromatography buffer system that includes borates 35 mM, sodium dodecyl sulfate 25 mM, and 13% methanol, at pH 9.5. The samples were injected hydro-dynamically at 0.5 psi for 5 s; then the separation was performed at 20 kV. While the molecules migrate inside the capillary they move through a window where an argon-ion laser excites them at 488 nm. Then fluorescence was filtered by a band-pass interference filter at 590 nm and detected by a photomultiplier tube. The signal was translated into peaks that form an electropherogram where they can be analyzed by comparing the area under the curve (AUC) of the unknown sample with the AUC of a known internal standard. Data were analyzed using the Karat System Gold (Beckman Coulter) version 5.0. All results were converted into a percentage of baseline release (% baseline = neurotransmitter concentration  $\times$  100/mean of the three first samples).

**Immunofluorescence.** Mice were sacrificed with sodium pentobarbital (75 mg/kg), perfused with 0.9% saline solution and fixed with 4% paraformaldehyde solution. Brain was quickly removed and stored in 4% paraformaldehyde solution. Leica CM520 cryostat was used to obtain 40  $\mu$ m coronal slices. Free-floating sections were incubated with rabbit polyclonal anti-TH primary antibody (Pel-Freez, Rogers, AR) dissolved in 5% bovine serum albumin buffer (NaCl 150 mM, Triton X-100 0.1%, trizma base 100 mM, pH 7.4) at a dilution of 1:1000 overnight. Sections were washed with Tris-buffered saline and incubated with goat anti-rabbit IgG conjugated to CY3 secondary antibody (Millipore, Darm-Stadt, Germany) dissolved in 5% bovine serum albumin buffer at a dilution of 1:250 for 2 h. Sections were mounted in Dako fluorescence mounting medium with 4',6-diamidino-2-phenylindol. Immunofluorescence was observed using a ZEISS LSM 800 confocal microscope.

**Optrode recordings during photoactivation of VTA neurons.** TH-Cre mice (ChR2,  $n = 11$ ) were injected with ChR2 bilaterally into the VTA (from Bregma (mm):  $-3.0$  AP,  $\pm$ 0.60 ML, and  $-4.80$  DV) and 3 weeks of recovery were allowed for ChR2 expression. After this time, eight mice were implanted bilaterally with optic fibers at VTA (from Bregma (mm):  $-3.0$  AP,  $\pm$ 1.20 ML, and  $-4.30$  DV,  $10^\circ$  angle) as described above, but in this case, an array of 16 tungsten wires was implanted unilaterally in the aIC (from Dura (mm): +1.4 AP,  $\pm$ 3.30 ML,  $-3.20$  DV). Another group of mice ( $n = 3$ ) were implanted with a homemade optrode (16 tungsten wires, 35  $\mu$ m each), surrounding the optic fiber<sup>21</sup> in the VTA (from Dura (mm):  $-3.0$  AP,  $\pm$ 0.60 ML, and  $-4.0$  DV). Mice were allowed 1 additional week to recover. Mice were recorded in a scanner laser frequency task<sup>21</sup>, where they received a random frequency of stimulation during 1 s on, followed by 2 s off, and the next frequency was randomly chosen. The frequencies of stimulation were: control (no stimulation), 4, 7, 20, 33, 50 Hz (5 ms pulse width), and a 1 s continuous pulse. The task was carried out for 20 min. Mice were recorded in maximum of nine consecutive sessions.

**Optrode recordings during photoinhibition of BLA  $\rightarrow$  aIC fibers.** One group of TH-Cre mice (NpHR3.0/ChR2,  $n = 3$ ) were injected with ChR2 bilaterally into the VTA (from Bregma (mm):  $-3.08$  AP,  $\pm$ 0.60 ML, and  $-4.80$  DV), NpHR3.0 bilaterally into the BLA (from Bregma (mm):  $-2.05$  AP,  $\pm$ 3.40 ML, and  $-5.30$  DV), and 3 weeks of recovery were allowed for ChR2 and NpHR expression. After that, an optrode was implanted unilaterally in the aIC (from Dura (mm): +1.4 AP,  $\pm$ 3.30 ML, and  $-3.20$  DV). Another group of TH-Cre mice (NpHR3.0,  $n = 5$ ) were injected only with NpHR3.0 bilaterally into the BLA (from Bregma (mm):  $-2.0$  AP,  $\pm$ 3.40 ML, and  $-5.30$  DV), and an optrode was implanted in aIC (from Dura (mm): +1.4 AP,  $\pm$ 3.30 ML, and  $-3.20$  DV) after 3 weeks. After surgery, mice were allowed 1 additional week for recovery. Then both groups of mice were recorded and photoinhibited into aIC during an open-loop task that consisted of blocks of 1 min laser on and 1 min off for 30 min (constant pulsed at 12–14 mW and 532 nm), in seven consecutive sessions.

**Extracellular recordings.** Neural activity was recorded using a Multichannel Acquisition Processor system (Plexon, Dallas, TX) interfaced with a Med Associates conditioning side of the rtCPP to record behavioral events simultaneously. Extracellular voltage signals were first amplified  $\times 1$  by an analog headstage (Plexon HST/16025-GEN2-18P-2GP-G1), then amplified ( $\times 1000$ ) and sampled at 40 kHz. Raw signals were band-pass filtered from 154 to 8.8 kHz and digitalized at 12 bits resolution. Only single neurons with action potentials with a signal-to-noise ratio of 3:1 were analyzed<sup>68</sup>. The action potentials were isolated on-line using voltage-time threshold windows and three principal components contour templates algorithm. A cluster of waveforms was assigned to a single unit if two criteria were met: inter-spike intervals were larger than the refractory period set to 1 ms, and if a visible ellipsoid cloud composed of the 3-D projections of the first three principal component analysis of spike waveform shapes was formed. Spikes were sorted using Offline Sorter software (Plexon, Dallas, TX)<sup>68</sup>. Only time stamps from offline-sorted waveforms were analyzed. All electrophysiological data were analyzed using MATLAB (The MathWorks Inc., Natick, MA).

**Statistics and reproducibility.** Behavioral and microdialysis data were analyzed in GraphPad Prism 8. When the data were normally distributed according to the Kolmogorov–Smirnov test, a repeated measure two-way ANOVA was used with the Geisser–Greenhouse correction for sphericity. Bonferroni and Tukey’s multiple comparisons test was performed when appropriate. Non-normally distributed data were analyzed using Mann–Whitney test. All data are showed as mean  $\pm$  SEM.  $\alpha$  was always set  $p < 0.05$ . All statistical tests used were two-tail tests. The electrophysiological analysis was performed using Matlab 2015a. In the case of electrophysiological recordings, the firing rate was compared using a nonparametric Kruskal–Wallis test followed by a Tukey–Kramer post hoc. Neurons whose firing rates were significantly different ( $p < 0.05$ ) from the control trial during the laser “on” period at any laser frequency were categorized as modulated. The difference between firing rates during laser stimulation vs. control trials determined the sign of the modulation (i.e., increased or decreased).

For behavioral experiments, sample size was the minimum necessary to get an effect size threshold of 0.5 using the Cohen’s  $d$  test dividing the difference between the means and the pooled standard deviation. Due to our previous experience in microdialysis studies, we used the minimal number of mice to get a statistical significance using nonparametric analysis. For electrophysiological recordings our sample size was based on similar previous studies and all groups were replicated independently. Data analysis was performed by blind observers, that is, mice were identified only after getting the behavioral, electrophysiological or microdialysis parameters.

**Reporting summary.** Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

#### Data availability

The datasets and codes generated during and/or analyzed during the current study are available in the Figshare repository, <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.11418195.v1>.

#### Code availability

Code was written in Matlab 2015a and it is available upon request from the corresponding author.

Received: 26 September 2019; Accepted: 24 February 2020;

Published online: 20 March 2020

#### References

- Chen, T., Cai, W., Ryali, S., Supekar, K. & Menon, V. Distinct global brain dynamics and spatiotemporal organization of the salience network. *PLoS Biol.* **14**, e1002469 (2016).
- Fonseca, E., de Lafuente, V., Simon, S. A. & Gutierrez, R. Sucrose intensity coding and decision-making in rat gustatory cortices. *Elife* **19**, pii: e41152 (2018).
- Wu, Y. et al. The anterior insular cortex unilaterally controls feeding in response to aversive visceral stimuli in mice. *Nat. Commun.* **11**, 640 (2020).
- Bermúdez-Rattoni, F. The forgotten insular cortex: its role on recognition memory formation. *Neurobiol. Learn Mem.* **109**, 207–216 (2014).
- Forget, B., Pushparaj, A. & Le Foll, B. Granular insular cortex inactivation as a novel therapeutic strategy for nicotine addiction. *Biol. Psychiatry* **68**, 265–271 (2010).
- Cisler, J. M. et al. Altered functional connectivity of the insular cortex across prefrontal networks in cocaine addiction. *Psychiatry Res.* **213**, 39–46 (2013).
- Naqvi, N. H., Rudrauf, D., Damasio, H. & Bechara, A. Damage to the insula disrupts addiction to cigarette smoking. *Science* **315**, 531–534 (2007).
- Naqvi, N. H. & Bechara, A. The insula and drug addiction: an interoceptive view of pleasure, urges, and decision-making. *Brain Struct. Funct.* **214**, 435–450 (2010).
- Naqvi, N. H., Gaznick, N., Tranel, D. & Bechara, A. The insula: critical neural substrate for craving and drug seeking under conflict and risk. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1316**, 53–70 (2014).
- Abdolahi, A. et al. Damage to the insula leads to decreased nicotine withdrawal during abstinence. *Addiction* **110**, 1994–2003 (2015).
- Di Pietro, N. C., Mashhoon, Y., Heaney, C., Yager, L. M. & Kantak, K. M. Role of dopamine D1 receptors in the prefrontal dorsal agranular insular cortex in mediating cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology* **200**, 81–91 (2008).
- Contreras, M., Ceric, F. & Torrealba, F. Inactivation of the interoceptive insula disrupts drug craving and malaise induced by lithium. *Science* **318**, 655–658 (2007).
- Contreras, M. et al. A role for the insular cortex in long-term memory for context-evoked drug craving in rats. *Neuropsychopharmacology* **37**, 2101–2108 (2012).
- Cosme, C. V., Gütman, A. L. & LaLumiere, R. T. The dorsal agranular insular cortex regulates the cued reinstatement of cocaine-seeking, but not food-seeking, behavior in rats. *Neuropsychopharmacology* **40**, 2425–2433 (2015).
- Pushparaj, A., Kim, A. S., Musiol, M., Trigo, J. M. & Le Foll, B. Involvement of the rostral agranular insular cortex in nicotine self-administration in rats. *Behav. Brain Res.* **290**, 77–83 (2015).
- Arguello, A. A. et al. Role of the agranular insular cortex in contextual control over cocaine-seeking behavior in rats. *Psychopharmacology* **234**, 2431–2441 (2017).
- Ohara, P. T. et al. Dopaminergic input to GABAergic neurons in the rostral agranular insular cortex of the rat. *J. Neurocytol.* **32**, 131–1341 (2003).
- Naqvi, N. H. & Bechara, A. The hidden island of addiction: the insula. *Trends Neurosci.* **32**, 56–67 (2009).
- Han, X. et al. Role of dopamine projections from ventral tegmental area to nucleus accumbens and medial prefrontal cortex in reinforcement behaviors assessed using optogenetic manipulation. *Metab. Brain Dis.* **32**, 1491–1502 (2017).
- Russo, S. J. & Nestler, E. J. The brain reward circuitry in mood disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 609–625 (2013).
- Prado, L. et al. Activation of glutamatergic fibers in the anterior NAc shell modulates reward activity in the aNacSh, the lateral hypothalamus, and medial prefrontal cortex and transiently stops feeding. *J. Neurosci.* **36**, 12511–12529 (2016).
- Chen, B. T. et al. Cocaine but not natural reward self-administration nor passive cocaine infusion produces persistent LTP in the VTA. *Neuron* **59**, 288–297 (2008).
- Volkow, N. D. & Morales, M. The brain on drugs: from reward to addiction. *Cell* **162**, 712–725 (2015).
- Jones, M. W., French, P. J., Bliss, T. V. & Rosenblum, K. Molecular mechanisms of long-term potentiation in the insular cortex in vivo. *J. Neurosci.* **19**, 36 (1999).
- Escobar, M. L. & Bermúdez-Rattoni, F. Long-term potentiation in the insular cortex enhances conditioned taste aversion retention. *Brain Res.* **852**, 208–212 (2000).
- Rodríguez-Durán, L. F., Martínez-Moreno, A. & Escobar, M. L. Bidirectional modulation of taste aversion extinction by insular cortex LTP and LTD. *Neurobiol. Learn Mem.* **142**, 85–90 (2017).
- Osorio-Gómez, D., Guzmán-Ramos, K. & Bermúdez-Rattoni, F. Corrigendum to “differential involvement of glutamatergic and catecholaminergic activity within the amygdala during taste aversion retrieval on memory expression and updating”. *Behav. Brain Res.* **307**, 120–125 (2016).
- Osorio-Gómez, D., Guzmán-Ramos, K. & Bermúdez-Rattoni, F. Memory trace reactivation and behavioral response during retrieval are differentially modulated by amygdalar glutamate receptors activity: interaction between amygdala and insular cortex. *Learn Mem.* **24**, 14–23 (2017).
- Parke, S. L. & Balleine, B. W. Incentive memory: evidence the basolateral amygdala encodes and the insular cortex retrieves outcome values to guide choice between goal-directed actions. *J. Neurosci.* **33**, 8753–8863 (2013).
- Stefanik, M. T. & Kalivas, P. W. Optogenetic dissection of basolateral amygdala projections during cue-induced reinstatement of cocaine seeking. *Front. Behav. Neurosci.* **7**, 213 (2013).
- Wassum, K. M. & Izquierdo, A. The basolateral amygdala in reward learning and addiction. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **57**, 271–283 (2015).
- Warlow, S. M., Robinsin, M. J. F. & Berridge, K. C. Optogenetic central amygdala stimulation intensifies and narrows motivation for cocaine. *J. Neurosci.* **37**, 8330–8348 (2017).
- Sutherland, M. T. et al. Down-regulation of amygdala and insula functional circuits by varenicline and nicotine in abstinent cigarette smokers. *Biol. Psychiatry* **74**, 538–546 (2013).
- Tsai, H. C. et al. Phasic firing in dopaminergic neurons is sufficient for behavioral conditioning. *Science* **324**, 1080–1084 (2009).
- McDevitt, R. A. et al. Serotonergic versus nonserotonergic dorsal raphe projection neurons: differential participation in reward circuitry. *Cell Rep.* **8**, 1857–1869 (2014).
- Qi, J. et al. A glutamatergic reward input from the dorsal raphe to ventral tegmental area dopamine neurons. *Nat. Commun.* **5**, 5390 (2014).
- Wang, H. L., Qi, J., Zhang, S., Wang, H. & Morales, M. Rewarding effects of optical stimulation of ventral tegmental area glutamatergic neurons. *J. Neurosci.* **35**, 15948–15954 (2015).
- Nader, K., Schafe, G. E. & Ledoux, J. E. The labile nature of consolidation theory. *Nat. Rev. Neurosci.* **1**, 216–219 (2000).
- Rodríguez-Ortiz, C. J. & Bermúdez-Rattoni, F. Determinants to trigger memory reconsolidation: The role of retrieval and updating information. *Neurobiol. Learn Mem.* **142**, 4–12 (2017).
- Milton, A. L. & Everitt, B. J. The psychological and neurochemical mechanisms of drug memory reconsolidation: implications for the treatment of addiction. *Eur. J. Neurosci.* **31**, 2308–2319 (2010).
- Taubenfeld, S. M., Muravieva, E. V., Garcia-Osta, A. & Alberini, C. M. Disrupting the memory of places induced by drugs of abuse weakens motivational withdrawal in a context-dependent manner. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 12345–12350 (2010).

42. Miranda, M. I. & McGaugh, J. L. Enhancement of Inhibitory avoidance and conditioned taste aversion memory with insular cortex infusions of 8-Br-cAMP: involvement of the basolateral amygdala. *Learn Mem.* **11**, 312–317 (2004).
43. Rivera-Olvera, A., Nelson-Mora, J., Gonsebatt, M. E. & Escobar, M. L. Extinction of aversive taste memory homeostatically prevents the maintenance of in vivo insular cortex LTP: calcineurin participation. *Neurobiol. Learn Mem.* **154**, 54–61 (2018).
44. Escobar, M. L., Alcocer, I. & Chao, V. The NMDA receptor antagonist CPP impairs conditioned taste aversion and insular cortex long-term potentiation in vivo. *Brain Res.* **812**, 246–251 (1998).
45. Escobar, M. L., Chao, V. & Bermúdez-Rattoni, F. In vivo long-term potentiation in the insular cortex: NMDA receptor dependence. *Brain Res.* **779**, 314–319 (1998).
46. Ferreira, G. et al. Basolateral amygdala glutamatergic activation enhances taste aversion through NMDA receptor activation in the insular cortex. *Eur. J. Neurosci.* **22**, 596–2604 (2005).
47. Nestler, E. J. Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiol. Learn Mem.* **78**, 637–647 (2002).
48. Pascoli, V., Terrier, J., Hiver, A. & Lüscher, C. Sufficiency of mesolimbic dopamine neuron stimulation for the progression to addiction. *Neuron* **88**, 1054–1066 (2015).
49. Mueller, D., Perdikaris, D. & Stewart, J. Persistence and drug-induced reinstatement of a morphine-induced conditioned place preference. *Behav. Brain Res.* **136**, 389–397 (2002).
50. Uchida, S. et al. CRTCI nuclear translocation following learning modulates memory strength via exchange of chromatin remodeling complexes on the Fgf1 gene. *Cell Rep.* **18**, 352–366 (2017).
51. Mockett, B. G., Guévrement, D., Williams, J. M. & Abraham, W. C. Dopamine D1/D5 receptor activation reverses NMDA receptor-dependent long-term depression in rat hippocampus. *J. Neurosci.* **27**, 2918–2926 (2007).
52. Matsuda, Y., Marzo, A. & Otani, S. The presence of background dopamine signal converts long-term synaptic depression to potentiation in rat prefrontal cortex. *J. Neurosci.* **26**, 4803–4810 (2006).
53. Otani, S., Bai, J. & Blot, K. Dopaminergic modulation of synaptic plasticity in rat prefrontal neurons. *Neurosci. Bull.* **3**, 183–190 (2015).
54. Shivarama Shetty, M., Gopinadhan, S. & Sajikumar, S. Dopamine D1/D5 receptor signaling regulates synaptic cooperation and competition in hippocampal CA1 pyramidal neurons via sustained ERK1/2 activation. *Hippocampus* **26**, 137–150 (2016).
55. Papaleonidopoulos, V., Kouvaros, S. & Papatheodoropoulos, C. Effects of endogenous and exogenous D1/D5 dopamine receptor activation on LTP in ventral and dorsal CA1 hippocampal synapses. *Synapse* **72**, e22033 (2018).
56. Guzmán-Ramos, K. et al. Restoration of dopamine release deficits during object recognition memory acquisition attenuates cognitive impairment in a triple transgenic mice model of Alzheimer's disease. *Learn Mem.* **19**, 453–460 (2012).
57. Das, R. K., Lawn, W. & Kamboj, S. K. Rewriting the valuation and salience of alcohol-related stimuli via memory reconsolidation. *Transl. Psychiatry* **5**, e645 (2015).
58. Rodríguez-Ortiz, C. J., De la Cruz, V., Gutiérrez, R. & Bermúdez-Rattoni, F. Protein synthesis underlies post-retrieval memory consolidation to a restricted degree only when updated information is obtained. *Learn Mem.* **12**, 533–537 (2005).
59. Santoyo-Zedillo, M., Rodríguez-Ortiz, C. J., Chavez-Marchetta, G., Bermúdez-Rattoni, F. & Balderas, I. Retrieval is not necessary to trigger reconsolidation of object recognition memory in the perirhinal cortex. *Learn Mem.* **21**, 452–456 (2014).
60. Wu, Y., Li, Y., Gao, J. & Sui, N. Differential effect of NMDA receptor antagonist in the nucleus accumbens on reconsolidation of morphine-related positive and aversive memory in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **674**, 321–326 (2012).
61. Baker, K. D. & Richardson, R. Pharmacological evidence that a failure to recruit NMDA receptors contributes to impaired fear extinction retention in adolescent rats. *Neurobiol. Learn Mem.* **143**, 18–26 (2017).
62. Miranda, M. I., Ferreira, G., Ramírez-Lugo, L. & Bermúdez-Rattoni, F. Glutamatergic activity in the amygdala signals visceral input during taste memory formation. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 11417–11422 (2002).
63. Peng, Y. et al. Sweet and bitter taste in the brain of awake behaving animals. *Nature* **527**, 512–515 (2015).
64. Venniro, M. et al. The anterior insular cortex → central amygdala glutamatergic pathway is critical to relapse after contingency management. *Neuron* **96**, 414–427 (2017).
65. Rudbeck, L. & Dissing, J. Rapid, simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. *BioTechniques* **25**, 588–592 (1998).
66. Dong, H. W. Allen Reference Atlas: A Digital Color Brain Atlas of the C57BL/6J Male Mouse (John Wiley & Sons Inc, 2008).
67. Guzmán-Ramos, K., Osorio-Gómez, D., Moreno-Castilla, P. & Bermúdez-Rattoni, F. Off-line concomitant release of dopamine and glutamate involvement in taste memory consolidation. *J. Neurochem.* **114**, 226–236 (2010).
68. Gutierrez, R., Simon, S. A. & Nicolelis, M. A. Licking-induced synchrony in the taste-reward circuit improves cue discrimination during learning. *J. Neurosci.* **30**, 287–303 (2010).

### Acknowledgements

We would like to dedicate this work to Dr I.B., who unfortunately passed away very young. We would also thank Dr Rui M. Costa for the TH-Cre mice; Dr James McGaugh, and Dr Carlos Rodríguez-Ortiz for their comments on an earlier version of the manuscript; Dr Luis Rodríguez Durán for technical assistance; M.C. Oscar Giovanni Urrego Morales for helpful discussions and M.C. Gerardo Ramirez Mejia for pictures design assistance. We also thank the Unidad de Imagenología of the Instituto de Fisiología Celular, UNAM for the image processing, especially to Dr Abraham Rosas Arellano. E.G.L. is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received the fellowship 573989 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México. This work was supported by the CONACYT grant 250870, CONACYT grant FOINS 474, and DGAPA-PAPIIT-UNAM grant IN212919.

### Author contributions

E.G.-L., I.B., F.T., R.G., A.B., R.A.McD. and F.B.-R. designed the research. E.G.-L., I.B., and P.M.-C. performed in vivo microdialysis, behavioral, and optogenetic experiments. E.G.-L. and J.L.-I. performed in vivo optrode electrophysiological experiments. E.G.-L. and I.B. performed imaging analysis. E.G.-L., R.G., A.B., R.A.McD. and F.B.-R. wrote the paper. E.G.-L. created the mice, boxes, and brain images. All experiments were done in Mexico City labs. All mice and boxes elements were created by E.G.-L., brain images were vectorized using a public domain sagittal brain image as template, and coronal brain pictures were modified from Allen's reference atlas of the mouse brain.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.

### Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0862-z>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to F.Bód-R.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020