



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“ALGORITMO DE SEGUIMIENTO DE OBJETOS
PARA LA DETERMINACIÓN DE PREFERENCIA DE
LUGAR ASOCIADA AL CONSUMO DE SUSTANCIAS
HEDÓNICAS EN RATONES C57BL6”**

TESIS

Que para obtener el título de
CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A

Mayra Alejandra López Diego

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Isaac Obed Pérez Martínez



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 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.

Agradecimientos

Agradezco al PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA (PAPIIT) por el financiamiento otorgado al proyecto IN219729 titulado “Búsqueda de los sustratos neuronales que modulan la inhibición de la nocicepción térmica inducida por la ingesta de sustancias hedónicas”.

Agradezco al Dr. Isaac Obed Pérez Martínez, por darme la oportunidad de explorar otras áreas en la odontología y expandir mis conocimientos e intereses. Por ver en mí un potencial para iniciar mi camino por la investigación. Gracias por dirigir el presente trabajo y por el apoyo y guía en mi formación académica.

A mis compañeros del Laboratorio de Neurobiología de las sensaciones y movimientos orales, por su siempre cálido apoyo, me han enseñado lo que es trabajar en equipo y crecer en conjunto.

A mis padres, que siempre han sido mi más grande ejemplo y motor para cumplir mis sueños. Gracias por siempre estar conmigo y darme todo de ustedes. Nunca encontraré forma de agradecer todo lo que han hecho por mí. Son mi más grande inspiración.

A mi hermana, por siempre sacarme una sonrisa, por echarme porras cuando lo más necesito, pero, sobre todo, por ser mi más grande cómplice. A mi abuelita por siempre demostrarme que las cosas que uno quiere se logran con esfuerzo y con amor.

A mi familia, por todo su amor y apoyo incondicional.

Índice

Resumen	5
Abstract	6
Abreviaturas	7
1. Introducción.....	8
2. Antecedentes.....	9
2.1 Aprendizaje pavloviano y condicionamiento instrumental. Relación con la CPP	9
2.2 Preferencia de lugar condicionada como método para evaluar las propiedades recompensantes de las sustancias hedónicas	11
2.3 Neurobiología del paradigma de CPP	15
3. Justificación	23
4. Pregunta de investigación	23
5. Hipótesis.....	23
6. Objetivo general.....	24
7. Objetivos particulares	24
8. Material y métodos.....	25
8.1 Sujetos de estudio.....	25
8.2 Aparato CPP.....	25
8.3 Protocolo de comportamiento.....	25
Habitación.....	25
Condicionamiento.....	26
Pruebas.....	26
8.4 Procedimientos experimentales.....	26
Prueba de atropina.....	26
Sin manipulación.....	26
8.5 Análisis estadístico	26
9. Resultados	27
9.1 Los ratones presentan una respuesta condicionada en relación con la sacarosa	27
9.2 Comportamientos involucrados en la búsqueda del consumo de sacarosa posterior al entrenamiento.....	28
9.3 La atropina no afectó la adquisición de la preferencia de lugar de sacarosa ...	30
10. Discusión.....	32

11.	Conclusión	38
12.	Glosario	39
13.	Referencia Bibliográficas	41

Resumen

El paradigma de preferencia de lugar condicionado (CPP) es un procedimiento comúnmente utilizado para estudiar los efectos gratificantes de las drogas de abuso. El CPP se ha convertido en una herramienta preclínica básica para evaluar comportamientos relacionados con la recompensa. En la actualidad, se sabe que la analgesia inducida por sacarosa está relacionada con el valor de recompensa asociado con su sabor dulce ya que los sabores dulces se utilizan en el manejo del dolor y el estrés en varios procedimientos clínicos realizados en humanos. Se ha buscado la forma de contrastar dichos conocimientos y utilizarlos para la evaluación de la relación entre el dolor y el paradigma de CPP con la elaboración de experimentos conductuales, sin embargo, el análisis de datos resulta un problema, debido a que, aunque existen múltiples softwares para realizar estos procesos, se desconoce bien su funcionalidad y algunos de ellos son extremadamente costosos. Por esa misma razón en este trabajo, desarrollamos un algoritmo de programación de fácil uso y bajo costo que resuelva los retos en el uso de softwares de análisis de datos. **Objetivo:** Analizar el potencial gratificante de sustancias hedónicas en la prueba de preferencia de lugar en ratones C57BL/6 mediante la creación de un algoritmo por programación. **Diseño de investigación:** Se realizó un estudio observacional descriptivo, en donde se analizó el paradigma de preferencia de lugar condicionado a través de videograbaciones del comportamiento de 12 ratones macho de la cepa C57BL/6. Con ayuda del programa Matlab se obtuvo un algoritmo de seguimiento de objetos para poder analizar imágenes y videos y obtener variables necesarias para el estudio de comportamientos adquiridos en el paradigma de preferencia de lugar. **Resultados:** Con ayuda del algoritmo desarrollado, es posible interpretar de una forma sencilla los comportamientos desarrollados por los ratones después del condicionamiento con sacarosa, por ejemplo, el índice de preferencia de lugar, la búsqueda de la sustancia hedónica reflejada en un aumento de distancia y velocidad con la que se mueven en la caja y un mayor número de cruces a través de todos los compartimientos. El modelo de conducta de preferencia de lugar condicionado (CPP) es eficaz para estudiar los efectos gratificantes de sustancias hedónicas en roedores. Este sistema experimental brinda un amplio campo de estudio para diferentes pruebas de recompensa con diversas sustancias y/o fármacos que involucren conductas como la adicción y trastornos del comportamiento. Una de las ventajas al utilizar el modelo de CPP, es que su metodología puede manipularse a las necesidades del experimentador. Por otro lado, el algoritmo elaborado, será de gran ayuda para futuros experimentos, ya que brinda una guía rápida para la obtención de variables necesarias para el análisis de datos obtenidos con el paradigma de CPP. Es de suma importancia la obtención de variables que ayuden a respaldar la teoría de preferencia de lugar, para analizar de una mejor manera el comportamiento de búsqueda que desarrollan los ratones después de ser expuestos a estímulos

gratificantes. Es necesario implementar nuevas estrategias como la administración de atropina en los ratones para poder inducir una alteración en el sistema de recompensa y lograr de esta forma revertir el comportamiento de preferencia de lugar asociado a sacarosa, como parte del estudio de los mecanismos fisiológicos del dolor crónico.

Abstract

The conditioned place preference paradigm (CPP) is a commonly used procedure to study the rewarding effects of drugs of abuse. The CPP has become a basic preclinical tool used tool for assessing reward-related behaviors. It is now known that sucrose-induced analgesia is related to the reward value associated with its sweet tastes are used in pain and stress management in various clinical procedures performed in humans. A way has been sought to contrast said knowledge and use it for the evaluation of a relationship between pain and the CPP paradigm with the development of behavioral experiments, however, data analysis is a problem, because although there are multiple softwares to perform these processes, their functionality is not well known and some of them are extremely expensive. For that reason, in this work, we develop an easy to use and low-cost programming algorithm that solves the challenges in the use of data analysis software. **Aim:** To analyze the rewarding potential of hedonic substances in the place preference test in C57BL/6 mice by creating an algorithm by programming. **Research design:** A descriptive observational study was carried out, where the conditional place preference paradigm was analyzed through video recordings of the behavior of 12 male mice of the C57BL/6 strain. With the help of Matlab program, an object tracking algorithm was obtained in order to analyze images and videos and obtain variables necessary for the study of behaviors acquired in the place preference paradigm. **Results:** With the help of the algorithm developed, it is possible to interpret in a simple way the behaviors developed by the mice after conditioning with sucrose, for example, the place preference index, the search for the hedonic substance reflected in an increase of distance and speed with which the move in the box and a greater number of crossings through all the compartments. The conditioned place preference (CPP) behavior model effectively studies the rewarding effects of hedonic substances in rodents. This experimental system provides a broad field to study for different reward tests with various substances and/or drugs involving behaviors such as addiction and behavioral disorders. One of the advantages of using the CPP model is that its methodology can be manipulated to the need of the experimenter. On the other hand, that algorithm developed will be of great help for future experiments, since it provides a quick guide for obtaining the variables necessary for the analysis of data obtained with the CPP paradigm. It is necessary to implement new strategies such as the administration of atropine in mice in order to induce an alteration in the reward

system and thus reverse the place preference behavior associated of the physiological mechanisms of chronic pain.

Abreviaturas

- ACC: Corteza cingulada anterior
- AMG: Amígdala
- CPA: Aversión al lugar condicionado
- CPP: Preferencia de lugar condicionada
- CS: Estímulo condicionado
- DA: Dopamina
- HIP: Hipocampo
- IP: Intra-peritoneal
- LHb: Habénula lateral
- LTDg: Núcleo tegmental laterodorsal
- mPFC: Corteza prefrontal media
- NAc: Núcleo Accumbens
- OFC: Corteza orbitofrontal
- PIT: Transferencia instrumental pavloviana
- PFC: Corteza prefrontal
- PPTg: Núcleo tegmental pedunculopontino
- RC: Respuesta condicionada
- VP: Palladium ventral
- VS: Estriado ventral
- VTA: Área tegmental ventral

1. Introducción

Los modelos animales utilizados en experimentos han contribuido de una manera significativa al entendimiento de los comportamientos relacionados con la recompensa, como la investigación del trastorno por uso de sustancias. Uno de los paradigmas más utilizados hasta la fecha es la preferencia de lugar condicionada (CPP) (McKendrick, 2020) .

La CPP consta de emparejamientos repetidos de un estímulo, comúnmente una droga, con un contexto que tiene características distintas, y si el estímulo es gratificante, los sujetos elegirán pasar más tiempo en ese contexto cuando se les dé acceso abierto a todas las cámaras. El paradigma de CPP se usa ampliamente en el campo de uso y abuso de drogas ya que resalta la importancia de las señales y contextos ambientales para los comportamientos continuos similares a la adicción (Bevins, 2002).

En modelos experimentales, el procedimiento de CPP ha demostrado ser una vía útil y económica para evaluar las propiedades gratificantes de una manera rápida, ya que los animales no requieren ser sometidos a procesos quirúrgicos o entrenamientos exhaustivos (Feltenstein, 2008).

El paradigma de CPP da la oportunidad a los experimentadores de estudiar la memoria de recompensa dependiente del contexto y el valor gratificante de los estímulos naturales y de drogas. El paradigma proporciona un sistema eficaz para examinar los procesos de recompensa sin la necesidad de inducir comportamientos adictivos sustanciales, y al mismo tiempo, brinda información sobre procesos que podrían precederlo (Patel, 2020).

Aunque es un modelo de comportamiento ampliamente utilizado, la CPP es una conducta compleja que incorpora el aprendizaje pavloviano, la memoria y los comportamientos motivados. Debido a su dificultad, los hallazgos de CPP a menudo son complejos de comprender e interpretar (McKendrick, 2020).

Por lo que el presente trabajo tiene como objetivo principal, analizar con ayuda de un algoritmo de seguimiento de objetos, el potencial gratificante de sustancias hedónicas mediante un paradigma conductual de CPP en ratones C57BL/6. Se busca que este algoritmo pueda funcionar como una guía práctica que sea de gran utilidad para llevar a cabo la lectura de los resultados. El algoritmo ayuda a la obtención de variables vinculadas al estudio conductual de sustancias hedónicas como el índice de preferencia, el número de cruces por caja, la distancia recorrida y la velocidad de desplazamiento. Para validar el algoritmo, se desarrollaron experimentos que evalúan el papel de la atropina en la atenuación de la preferencia de lugar asociada a la sacarosa mediante el establecimiento de CPP.

2. Antecedentes

El paradigma de preferencia de lugar condicionado (CPP) es un modelo de comportamiento preclínico estándar que se utiliza para estudiar los efectos gratificantes y aversivos (Prus, 2009) de una variedad de fármacos y sustancias (Bardo, 2000) en muchos organismos, incluidos roedores, moscas, primates, entre otros (McKendrick, 2020).

2.1 Aprendizaje pavloviano y condicionamiento instrumental. Relación con la CPP

La CPP se basa esencialmente en el condicionamiento de fármacos o sustancias naturales que se pueden utilizar para estudiar y comprender mejor el proceso de condicionamiento y su influencia en el comportamiento (Childs, 2016). CPP consiste en emparejamientos repetidos de un estímulo, típicamente una droga, con un contexto que tiene características distintas y, si ese estímulo es gratificante, los sujetos elegirán pasar tiempo en ese contexto cuando se les dé acceso libre a todos los compartimientos de la caja (McKendrick, 2020). Las respuestas que se obtienen en estos entrenamientos tienen una evidencia anatómica, pero también funcional; en este sentido, hay dos corrientes que han sido ampliamente discutidas, por un lado, hay evidencia conductual de manipulaciones específicas que influyen en acciones instrumentales y por el otro, evidencia de formas de comportamiento condicionado (Bradfield, 2013).

Tommie en 1996 fue uno de los primeros en describir las similitudes entre el comportamiento pavloviano de seguimiento de signos y los síntomas del abuso de drogas (Flagel, 2009). El condicionamiento pavloviano es un mecanismo de aprendizaje fundamental que permite a un animal predecir y adaptarse a eventos futuros basándose en experiencias previas (Everitt, 2001), lo que se puede traducir en una función evolutiva, dando lugar a la supervivencia. El aprendizaje pavloviano nos prepara tanto para el peligro como para las recompensas; usando los efectos gratificantes de una droga como ejemplo, se esperaría que emparejar repetidamente los efectos gratificantes de la droga (estímulo incondicionado, usando la terminología de Pavlov) con ciertos estímulos (es decir, aquellos contenidos dentro de un ambiente) se induciría una sensación hedónica de placer (es decir, una respuesta incondicionada) (McKendrick, 2020). En términos de trastornos por uso de sustancias, el aprendizaje pavloviano es de vital importancia para la recaída inducida por el contexto, donde la reexposición a entornos asociados a las drogas evoca un fuerte deseo por las sustancias. A pesar de esta respuesta conductual aparentemente sencilla, puede haber muchos factores subyacentes adicionales que contribuyan a la CPP inducida por fármacos (McKendrick, 2020).

Por el contrario, el condicionamiento instrumental implica que el animal aprenda a realizar (o retener) una acción que depende de sus consecuencias (Bradfield, 2013). En esta respuesta conductual, se habla de la acción motivada, proceso mediante el cual los animales alteran su comportamiento cuando existe una contingencia entre

su comportamiento y un resultado de refuerzo. Las ratas y los humanos exhiben una acción dirigida a un objetivo, que se basa en el conocimiento de la contingencia entre las acciones de uno y sus resultados, y el conocimiento del valor de esos resultados. Sorprendentemente, este sistema de valores 'cognitivo' que gobierna las acciones dirigidas a un objetivo (a veces denominado valor de incentivo instrumental) se puede distinguir y disociar del proceso de valoración que determina nuestras reacciones cuando realmente experimentamos un objetivo como la comida, denominado 'agrado', 'reacciones hedónicas' o simplemente 'placer', aunque en circunstancias normales los dos valores se reflejan entre sí y cambian juntos. No todas las acciones están dirigidas a objetivos; con el tiempo y la formación, las acciones pueden volverse habituales, es decir, provocada en situaciones relevantes por mecanismos directos de estímulo-respuesta (Cardinal, 2004).

Hay dos criterios que distinguen las asociaciones instrumentales de las respuestas condicionadas (RC) pavlovianas. Específicamente, mientras un agente debería poder retener y/o alterar de manera flexible la dirección de una respuesta instrumental para obtener un resultado, no ocurre lo mismo con las RC pavlovianas ya que estas no están abiertas a tal ajuste, ni se puede retener la respuesta durante el estímulo para obtener la recompensa (Bradfield, 2013).

Los estímulos ambientales tienen efectos más allá de provocar respuestas motoras; los estímulos que predicen la recompensa pueden convertirse en estímulos condicionados (CS) a través del aprendizaje asociativo pavloviano, y los CS pavlovianos pueden motivar el comportamiento directamente y pueden servir como objetivos del comportamiento (Cardinal, 2004). Los CS pueden ser activados por condiciones relativamente comunes, por ejemplo, estímulos visuales, olfativos, gustativos y auditivos, o pueden ser entornos más elaborados que incluyan una combinación de múltiples factores estimulantes que pueden constituir un contexto complejo (Childs, 2013). Robinson y Berridge (Robinson, 1993), a través de su teoría de Sensibilización Incentiva en desarrollo enfatizan el papel de los procesos estímulos-resultados (SO) pavlovianos en la búsqueda de drogas que, pueden tomar tres formas. En primer lugar, las señales asociadas al fármaco pueden provocar respuestas de abordaje pavloviano simples, como las que se manifiestan en los llamados procedimientos de autoformado. En segundo lugar, es igualmente importante que los estímulos asociados a las drogas, al igual que otros CS del apetito, ejercen una influencia motivacional sobre la conducta instrumental, ya sea que esté controlada por el proceso respuesta-resultado o estímulo-respuesta. El procedimiento crítico para demostrar esta influencia motivacional es el diseño de transferencia instrumental-pavloviana (PIT) en el que se evalúa el impacto de un estímulo condicionado entrenado por separado en las respuestas instrumentales que se caracteriza por la formación de un proceso SO-respuesta en el que la

recuperación basada en estímulos de un resultado específico hace que el animal recupere su acción asociada específica. En tercer lugar, los CS asociados a fármacos pueden actuar como reforzadores condicionados para la búsqueda instrumental de fármacos (Everitt, 2001; Bradfield, 2013). Estos ejemplos demuestran que los CR pavlovianos están controlados por relaciones SO. En contraste, la evidencia sugiere que, en el condicionamiento instrumental, el desarrollo de la acción instrumental puede ser controlado por otras dos formas distintas de proceso de aprendizaje. Hay evidencia considerable que sugiere que las acciones instrumentales pueden estar dirigidas a un objetivo y controladas por la codificación de relaciones específicas respuesta-resultado (RO) (Bradfield, 2013)

Esta descripción del condicionamiento pavloviano expresa el aprendizaje como una forma mecanicista de comportamiento estímulo respuesta y no supone necesariamente que se haya adquirido una representación afectiva más compleja del estímulo. Sin embargo, es probable que, en paralelo a una forma mecanicista de aprendizaje asociativo, un animal también desarrolle una representación del valor del resultado predicho. Los estímulos que han adquirido tal valor actuarán como reforzadores condicionados y apoyarán acciones instrumentales dirigidas a objetivos. Por lo tanto, los estímulos condicionados pavlovianos no solo provocan excitación conductual y respuestas de aproximación, sino que, al adquirir estas propiedades se establece una meta u objetivo (Everitt, 2001).

De lo revisado anteriormente, aunque se creía que el modelo de CPP se establecía únicamente a través de los procesos de condicionamiento pavloviano clásicos (Prus, 2009) se puede ver que la adicción a las drogas podría entenderse más bien como el compromiso aberrante entre los efectos gratificantes de la droga que se asocian con un contexto y los procesos de aprendizaje instrumental donde cada respuesta, tiene un objetivo (Cardinal, 2004).

2.2 Preferencia de lugar condicionada como método para evaluar las propiedades recompensantes de las sustancias hedónicas

El paradigma de CPP se utiliza para investigar las asociaciones y efectos motivacionales formadas entre un estímulo gratificante y un entorno contextual (McKendrick, 2020; Itzhak, 2010). Aunque en este modelo se utilizan varios diseños y aparatos diferentes, las características básicas de esta tarea implican la asociación de dos entornos distintos con la administración de un tratamiento farmacológico y un placebo (Prus, 2009; Childs, 2013).

Una variación común de este diseño consiste en una cámara de tres compartimientos, en donde los compartimientos exteriores están diseñados para tener diferentes características (por ejemplo, paredes blancas vs. negras, camas de pino vs. maíz, rejilla horizontal versus pisos de rejilla cruzada). El comportamiento central no tiene características especiales y no está emparejado con un

medicamento, y las puertas entre los compartimientos se pueden abrir para permitir que un animal pase libremente entre ellos (Prus, 2009).

La droga se empareja con un contexto específico en la cámara de CPP (es decir, un estímulo neutro) (Figura 1), que, después del condicionamiento, se convierte en un CS (Prus, 2009, McKendrick, 2020) capaz de producir sensaciones hedónicas de placer (RC) e influir en la conducta en ausencia de la droga, en el caso de la prueba experimental de CPP, la RC se interpreta como un aumento de aproximación y de tiempo pasado en el compartimiento que tiene el contexto emparejado a la droga (Childs, 2013).

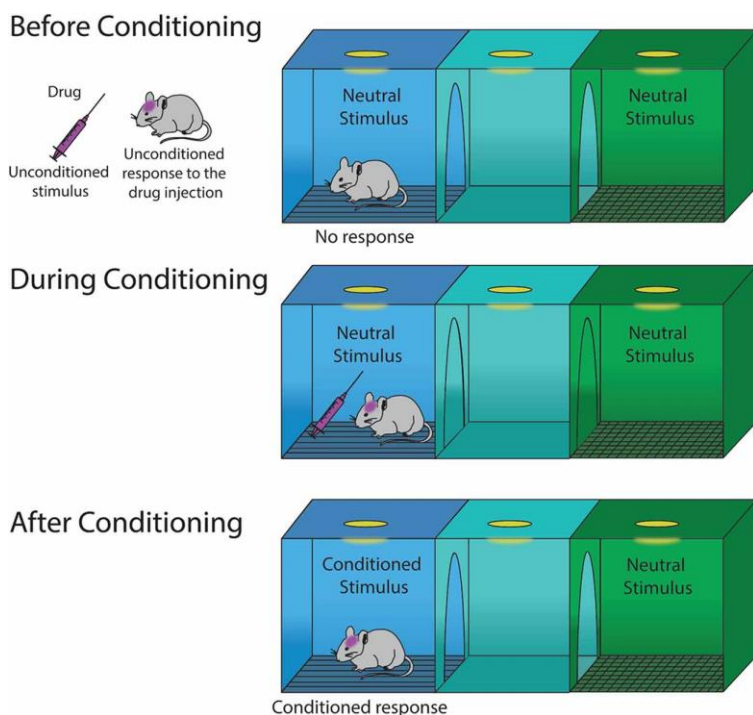


Figura 1. Ilustración del condicionamiento con una droga que provoca sentimientos hedónicos de placer. En el panel superior se ilustra al ratón en la caja de entrenamiento antes del condicionamiento: la inyección de una droga provoca sentimientos hedónicos de placer. En el panel medio, antes del condicionamiento, la inyección de una droga provoca una respuesta incondicional de placer. En el panel inferior, durante el condicionamiento, el estímulo condicionado, da como resultado una respuesta condicionada (Imagen tomada de McKendrick, 2020).

El modelo de CPP consta de tres fases: habituación, condicionamiento y post-condicionamiento (es decir, prueba de CPP). Durante la habituación, los animales tienen acceso libre a todos los compartimientos antes de ser devueltos a su jaula. Las sesiones de habituación tienen dos propósitos. En primer lugar, exponen al animal al aparato, con el objetivo de lograr una habituación con el entorno y, en segundo lugar, estiman el índice de la preferencia inicial de un animal para cada

compartimiento, seleccionando de esta forma, la cámara que se vinculará con el CS, todo esto basado en criterios de exclusión predefinidos (por ejemplo, pasar más del 80% del tiempo en un compartimiento). Sin embargo, la implementación de un diseño sesgado o no sesgado depende del experimentador, ya que la evidencia sugiere, al menos con la morfina, que no hay diferencias en el resultado de la CPP cuando se emplea un enfoque sesgado o no sesgado (McKendrick, 2020).

Las sesiones de condicionamiento o entrenamiento consisten en la inyección de un fármaco con propiedades potencialmente gratificantes o aversivas (administrada por el experimentador) y luego se coloca en uno de los compartimientos exteriores durante varios minutos. Al día siguiente se inyecta al sujeto el vehículo del fármaco y luego se coloca en el compartimiento opuesto (Prus, 2009). Las sesiones control y condicionamiento del fármaco se llevan a cabo el mismo día (separadas por 4-6 horas) o en días alternos. Estos emparejamientos tienen lugar una vez o durante varios días. Durante la sesión de condicionamiento, la asociación del contexto con la droga se adquiere (fase de adquisición) (McKendrick, 2020).

Por último, después de las sesiones de entrenamiento los animales se someten a una prueba de CPP donde nuevamente se coloca al animal en el compartimiento central y luego, se les da acceso libre a todas las cámaras y se mide el tiempo pasado en cada uno de los compartimientos exteriores durante la sesión. Se encuentra una preferencia de lugar condicionada (CPP) si los animales pasan significativamente más tiempo en el compartimiento emparejado con el vehículo (McKendrick, 2020, Prus, 2009).

Por otro lado, si los animales pasan significativamente más tiempo en el compartimiento emparejado con el vehículo que en el compartimiento emparejado con el fármaco, esto se considera una aversión al lugar condicionado (CPA). Por lo general, las drogas de abuso, como la cocaína, producen CPP, y las drogas que provocan efectos aversivos, como el cloruro de litio, producen CPA (Prus, 2009). Si el contexto es aversivo, entonces el aumento inducido por el condicionamiento en la preferencia por ese contexto puede reflejar 'menos aversión' y por lo tanto no mostrar el verdadero valor motivacional positivo de la droga (Napier, 2013). A menudo se asume que un CPP en animales se forma a través de asociaciones contextuales con efectos de fármacos interoceptivos análogos a los efectos de fármacos de recompensa subjetiva en seres humanos (Childs, 2013).

Se puede usar la administración selectiva de compuestos de prueba para evaluar los efectos en diferentes fases de la CPP. En este caso, la administración antes del emparejamiento fármaco-contexto (por ejemplo, fase de condicionamiento) evaluará y medirá los efectos del compuesto de prueba sobre la expresión de CPP (McKendrick, 2020).

La CPP se mide como el tiempo total invertido en cada contexto el día del examen o como una puntuación de CPP. Las puntuaciones de CPP se calculan como: (1) el tiempo en el contexto emparejado con el fármaco el día de la prueba menos el tiempo en el contexto emparejado con el fármaco durante la habituación; o (2) el tiempo en el contexto de emparejamiento de fármacos el día de la prueba menos el tiempo en el contexto de emparejamiento de vehículos el día de la prueba. Si todo esto da como resultado un aumento significativo en el tiempo pasado en el lado emparejado con el fármaco se habrá encontrado una respuesta asociada con las propiedades gratificantes de la sustancia, es decir, una respuesta condicionada. (McKendrick, 2020).

Hay variaciones con respecto a los modelos metodológicos de CPP, por ejemplo, los paradigmas tradicionales de CPP administran fármacos de abuso de forma no contingente a través de una inyección administrada por el experimentador, en contraste, hay otros modelos basados en la autoadministración de fármacos operantes intravenosos u orales en roedores. Otros protocolos introducen la capacidad de formar asociaciones entre la ingestión voluntaria de una droga y un contexto específico, que se puede desarrollar con diferentes especies animales, drogas de abuso y otras investigaciones de comportamientos relacionados con la recompensa. Cabe mencionar, que este método mejora el paradigma, ya que imita más de cerca la condición humana del trastorno por uso de sustancias. El trabajo clínico y preclínico reciente ha destacado que una forma de mejorar los tratamientos actuales es enfatizar el impacto de los contextos ambientales y su contribución a las conductas de búsqueda de drogas (Risca, 2020).

La CPP es un comportamiento aprendido que se muestra en muchos animales y humanos (Huston, 2013). Los procedimientos diseñados para evaluar las preferencias de drogas en los animales se basan en ciertos supuestos implícitos con respecto a los efectos interoceptivos positivos de las drogas. En particular, se asume que las drogas producen estados subjetivos similares en los animales como lo hacen en los humanos. Por tanto, cuando un animal pasa más tiempo en el compartimiento previamente emparejado con el fármaco de la cámara de preferencia de lugar, se infiere que el entorno ha adquirido propiedades "gratificantes" a través de la asociación con los efectos "placenteros" del fármaco. Existe una buena base empírica para la suposición de que los humanos y los animales responden de manera similar a las drogas de abuso. En el caso de los estudios en humanos, se tiene acceso a las drogas de una forma voluntaria, lo que se puede comparar con una autoadministración en modelos con animales de laboratorio, donde se les da libre acceso a consumir sustancias que produzcan efectos placenteros. Tomando estas interacciones como base, se pueden comparar los comportamientos ocasionados por la ingesta de sustancias hedónicas, donde

los efectos “adictivos” de las drogas están vinculados con las sensaciones placenteras que pueden provocar en los sujetos que las ingieren. (Childs, 2009).

Al igual que con otros modelos de comportamiento utilizados en la investigación farmacológica, los efectos de conducta de las sustancias utilizadas en el paradigma de CPP dependen de la especie, la cepa, la vía de administración, el intervalo de tiempo de administración del fármaco, la concentración de la dosis y el aparato de CPP utilizado. Muchas drogas de abuso producen tanto CPP como CPA, dependiendo de la dosis administrada. En animales farmacodependientes, los efectos de abstinencia generalmente producen CPA. Debido a que el paradigma de CPP generalmente proporciona un indicador confiable para estudiar los efectos gratificantes de los medicamentos que requieren relativamente poco entrenamiento en comparación con el paradigma de autoadministración, CPP se ha utilizado comúnmente junto con técnicas estándar de neurociencia para investigar los efectos subjetivos de los medicamentos (Prus, 2009). Aunque la CPP puede aparecer como un comportamiento generado por la conducta operante que prevalece en el sitio de condicionamiento, también puede ser resultado de los efectos del tratamiento condicionado (Huston, 2013).

La evidencia sugiere que una sola asociación de emparejamiento fármaco-contexto o vinculaciones repetidas de fármaco-contexto introduce CPP, pero estos protocolos de exposición variados pueden verse influenciados por diferentes factores subyacentes, incluidas las propiedades gratificantes de la droga, eliminación de un estado aversivo, conductas condicionadas, memoria y/o estados motivados (Patel, 2020).

Primero, una interpretación lógica de la CPP es que está mediada por las propiedades gratificantes del fármaco. Por lo tanto, el animal busca o prefiere el contexto emparejado con el fármaco durante la prueba de CPP porque esta respuesta conductual ha producido un resultado beneficioso y gratificante. Esta es una interpretación validada y respaldada por respuestas neurobiológicas relacionadas con la codificación de recompensas que ocurren durante las sesiones de condicionamiento. Un apoyo adicional para esta teoría proviene de datos en humanos que no solo demuestran que el agrado por la droga predice el nivel de preferencia de gusto por la habitación, sino que también muestra la validez de la CPP como un procedimiento de estudio para la adicción (McKendrick, 2020).

2.3 Neurobiología del paradigma de CPP

La propiedad de atracción y motivación de un estímulo se llama ‘recompensa’, esta induce un comportamiento apetitivo y generalmente crea una experiencia consciente de placer (McKendrick, 2020). Tener una mejor comprensión de la neurobiología de la recompensa y la aversión es fundamental para el tratamiento de trastornos complejos como la adicción (Carlezon, 2009).

Las drogas de abuso impulsan cambios en el comportamiento al alterar la función y la plasticidad de los circuitos relacionados con la recompensa en el cerebro (Deng, 2010). Aunque las drogas de abuso a menudo producen efectos conductuales diferenciales y tienen perfiles farmacológicos diversos, una característica común que comparten es una mejora en la actividad de dopamina (DA) mesocorticolímbica (Feltenstein, 2008). Las señales asociadas con el uso de estas sustancias pueden activar regiones límbicas del cerebro e inducir la búsqueda de drogas. El paradigma de CPP puede estudiarse en ratas de laboratorio como parte del proceso de aprendizaje asociativo, esta respuesta suele ser de una duración prolongada y atribuida a señalizaciones asociadas con las drogas (Voigt, 2011).

La CPP como modelo de comportamiento se ha desarrollado para estudiar los efectos de los tratamientos farmacológicos y no farmacológicos sobre la motivación en animales de experimentación (Ebrahimi, 2021). Los procesos de aprendizaje dependientes del contexto involucrados en el procedimiento de CPP permiten la evaluación de asociaciones condicionadas entre señales ambientales y recompensa de drogas (Nesbit, 2017), lo que puede representar un proceso neurobiológicamente único, lo que hasta ahora ha sido poco estudiado (Napier, 2013).

Los impulsos motivacionales de recompensas naturales están mediados por el circuito clásico mesolímbico (Alhadeff, 2019). Este circuito, se ha implicado ampliamente por su participación en las propiedades gratificantes tanto de los estímulos naturales (por ejemplo, la comida, la bebida y el sexo) como de las drogas adictivas. El circuito clásico mesolímbico consiste en proyecciones de dopamina desde los cuerpos celulares en el área tegmental ventral (VTA) a las estructuras límbicas (es decir, vía mesolímbica, como la amígdala (AMG), el pálido ventral (VP), el hipocampo y el núcleo accumbens (NAc)) y áreas corticales (es decir, vía mesocortical, incluida la corteza prefrontal (PFC), la corteza orbitofrontal (OFC) y la corteza cingulada anterior (ACC)) (Feltenstein, 2008) (Figura 2).

El NAc es uno de los elementos neuronales más importantes en la vía de recompensa que se encuentra dentro del estriado ventral, se proyecta a varias regiones ejecutivas, emocionales y motoras y se considera un regulador maestro del impulso motivacional. Aunque las células de toda la corteza se disparan en respuesta a estímulos gratificantes, las principales áreas corticales asociadas con la recompensa son la ACC y la OFC. Se trata de regiones complejas y heterogéneas, cada una de las cuales se divide en áreas corticales específicas: la ACC incluye las áreas 24, 25 y 32; la OFC se divide en las áreas 11, 12, 13 y 14 (Haber, 2010). La PFC es un componente principal del circuito mesolímbico, que afecta a varias estructuras involucradas en la percepción del dolor, el impulso

motivacional, la búsqueda de sustancias y los estados antidepresivos (Serafini, 2020).

Por su parte, la amígdala es una estructura límbica prominente que juega un papel clave en la codificación emocional de los estímulos ambientales ya que proporciona información contextual que se utiliza para ajustar el nivel motivacional y también posee un papel importante en el procesamiento de la recompensa, en parte a través de las interacciones críticas entre ella y el estriado ventral (VS) para las asociaciones de estímulo-recompensa.

Por otro lado, el VP es un componente importante del circuito de recompensa en el sentido de que las células de esta región del prosencéfalo responden específicamente durante el aprendizaje y la ejecución de conductas de incentivo de recompensa (Haber, 2010). Una de las estructuras cerebrales más importantes en todo este proceso de recompensa, es el VTA, estructura heterogénea con múltiples tipos de células (Bouarab, 2019).

Estudios recientes han demostrado que las áreas del cerebro medio y estriado que están involucradas en la recompensa son más extensas de lo que se pensaba anteriormente (Haber, 2010). Específicamente, el VTA se proyecta al cuerpo estriado dorsal, la PFC, el tálamo y las regiones parietales (sistema DA mesocortical) y al núcleo de las regiones estriales ventrales y límbicas, incluidas la amígdala, la ACC la OFC y el NAc (sistema DA mesolímbico) (Ernst, 2016).

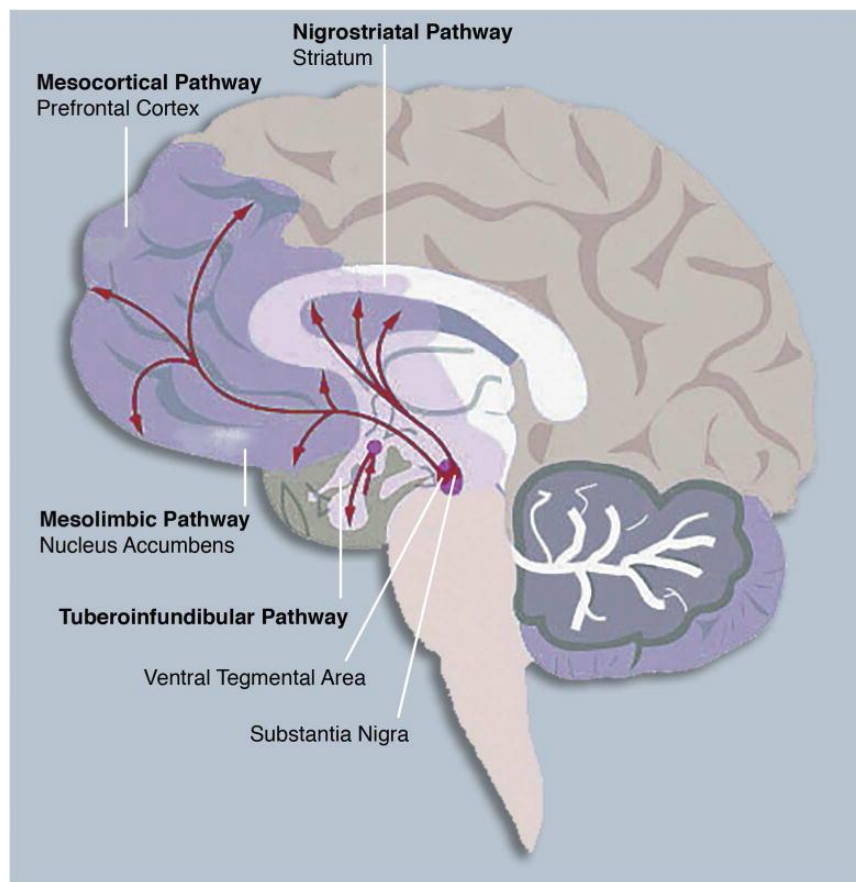


Figura 2. Vías de dopamina. Circuito del sistema nervioso central que surge en el área tegmental ventral (VTA) y en la sustancia negra (SN) del mesencéfalo. Estas vías están implicadas en el procesamiento de recompensas y se ven afectadas por el abuso de sustancias (Imagen tomada de Ernst, 2016).

Durante el condicionamiento conductual, las neuronas VTA DA se activan inicialmente por recompensas primarias, como la sacarosa, pero después de emparejamientos repetidos de señal-recompensa cambia sus patrones de actividad para disparar estas neuronas predominantemente al inicio de estímulos provocados por la recompensa. El alcohol, la nicotina, la cocaína, la morfina y la heroína tienen efectos gratificantes que desempeñan un papel fundamental en el inicio y mantenimiento del hábito de consumir drogas (Ebrahimi, 2021). Además, la exposición a señales que predicen recompensas naturales o drogas de abuso conduce a picos transitorios en la liberación de dopamina en el NAc. Se sabe que la activación fásica directa de las neuronas VTA DA puede inducir un condicionamiento conductual y facilitar el refuerzo positivo, lo que sugiere que la transmisión de DA entre en VTA y el NAc promueve el inicio y mantenimiento del procesamiento de conductas de búsqueda de recompensas (Van Zessen, 2012, Lowes, 2021). Por lo tanto, El control de las actividades de las neuronas DA y los

consiguientes cambios en los niveles de DA en las regiones diana del VTA son importantes para el control del comportamiento (Tan, 2012).

En resumen, el VTA es un centro del circuito mesocorticolímbico que juega un papel importante en la recompensa, la motivación, la cognición y la aversión. Las neuronas dopaminérgicas, que constituyen el 65% de las neuronas en el VTA, han sido el foco principal de investigación en esta región del cerebro (Bouarab, 2019).

El sistema de dopamina mesocorticolímbico se origina en el VTA (región A10 en roedores) (Prus, 2009) e impulsa el comportamiento relacionado con la recompensa. El VTA es un núcleo heterogéneo que contiene neuronas DA (~65%), neuronas GABA (~30%) y neuronas glutamatérgicas (~5%). Algunas neuronas DA codifican valor motivacional, apoyando las redes cerebrales para buscar, evaluar y valorar el aprendizaje. Otros codifican prominencia motivacional, apoyando las redes cerebrales para la orientación, la cognición y la motivación general (Tan, 2012).

El circuito de dopamina tiene su objetivo sináptico en el NAc, la PFC y las estructuras límbicas asociadas. La exposición repetida a psicoestimulantes produce cambios en la plasticidad funcional y estructural de las sinapsis en el cuerpo estriado, y se cree que estas alteraciones contribuyen a la expresión de la sensibilización conductual y a la CPP (Deng, 2010).

La microinyección de agonistas nicotínicos y muscarínicos en el VTA excita las neuronas dopaminérgicas a través de la activación de los receptores colinérgicos locales y dopaminérgicos a través de la activación de dopamina en NAc (Schifirneț, 2014). La abstinencia de la exposición crónica al fármaco provoca una serie de alteraciones en la transmisión glutamatérgica dentro del NAc. Las entradas glutamatérgicas en el NAc se originan en la PFC, el tálamo, la amígdala basolateral (BLA) y el hipocampo. El NAc integra información de estructuras corticales y límbicas para mediar conductas dirigidas a objetivos y es una estructura de entrada importante de los ganglios basales. La plasticidad sináptica alterada en el NAc después de la exposición crónica a varias clases de drogas de abuso permite que las señales asociadas a la droga engendren una motivación patológica para la búsqueda de drogas. Estudios previos han informado que la transmisión del glutamato al NAc juega un papel importante en diferentes fases de recompensa de opioides que incluyen: expresión, extinción y restablecimiento de la CPP inducida por morfina (Ebrahimi, 2021).

Después de la fase de condicionamiento de la CPP, los niveles de DA se elevan en el NAc y la corteza prefrontal medial (mPFC) cuando los roedores se colocan de nuevo en un entorno asociado con psicoestimulantes. Esto es coherente con el aumento de la transmisión de DA en NAc y PFC observado en sujetos humanos

después de la exposición a señales relacionadas con el fármaco (Nesbit, 2017). Curiosamente, estos circuitos corticoestriatolímbicos operan en paralelo, pero pueden tener roles algo diferentes en la adicción. Por ejemplo, mientras que el NAc y el VP parecen estar involucrados en los principales efectos reforzantes de las drogas de abuso, la AMG y el hipocampo (HIP) juegan un papel importante en el aprendizaje condicionado involucrado en el proceso de adicción. En el caso de la AMG y el hipocampo ventral, este aprendizaje implica asociaciones discretas de estímulo-recompensa, mientras que el hipocampo dorsal media asociaciones de estímulo-estímulo que pueden ser particularmente importantes para el aprendizaje contextual. Por otro lado, el PFC, OFC y el cíngulo anterior regulan las respuestas emocionales, el control cognitivo y la función ejecutiva, con exposición repetida a drogas que conduce a adaptaciones celulares de la vía glutamatérgica prefrontal-NAc que contribuyen a conductas adictivas persistentes, incluyendo control cognitivo disminuido e hiperactividad a estímulos asociados a drogas (Figura 3).

Tomados en conjunto, estos hallazgos sugieren que la vía mesolímbica está involucrada en los efectos reforzantes agudos de las drogas y varias respuestas condicionadas relacionadas con el deseo y la recaída, mientras que los cambios en la vía mesocortical median la experiencia consciente de la droga, la ansiedad por la droga y la pérdida de la inhibición conductual relacionada a comportamientos compulsivos de búsqueda y consumo de drogas (Feltenstein, 2008).

Por otro lado, la memoria es otro factor que puede influir en la CPP inducida por fármacos. La motivación también puede contribuir a aumentar el tiempo que se pasa en el compartimiento emparejado con el fármaco durante las pruebas de CPP. La evidencia de esto proviene de un estudio que muestra que un animal hambriento se acercará a contextos previamente asociados con la comida, mientras que el mismo animal, cuando está privado de agua, se acercará a contextos asociados con líquidos (McKendrick, 2020).

Se ha observado la eliminación de un estado aversivo para evocar CPP en animales que expresan dolor crónico, en los que el emparejamiento de un fármaco analgésico con un contexto durante el condicionamiento provoca CPP para el contexto emparejado con fármacos. Además, en animales que expresan dolor crónico, la inhibición de la ACC (una región del cerebro involucradas en la expresión del dolor), durante el emparejamiento de contexto provoca CPP para el contexto emparejado con la inhibición de ACC.

Estos hallazgos sugieren que la eliminación de un estado aversivo como el dolor refuerza la respuesta conductual del animal para preferir el contexto emparejado con la droga. Décadas de investigación preclínica y clínica han demostrado que después de la administración repetida de muchas drogas de abuso, se observan comportamientos asociados con estados negativos durante la abstinencia y el

deseo, pero también psicológicos, como la ansiedad y la depresión, y tanto por separado como combinados, pueden aliviarse mediante la exposición a fármacos durante el condicionamiento facilitando la CPP (McKendrick, 2020).

Dichos descubrimientos son importantes para el campo de conocimiento ya que es necesario utilizar el conocimiento acumulado de décadas de investigación sobre drogas de abuso para avanzar hacia el diseño racional de tratamientos para los trastornos adictivos. El requerimiento de nuevos medicamentos va más allá de la reducción del ansia por las drogas, la búsqueda de drogas u otros comportamientos adictivos. Para ser un tratamiento eficaz, el cerebro adicto debe tolerar un medicamento o el cumplimiento del tratamiento (a veces llamado adherencia) será deficiente. Los métodos para predecir respuestas gratificantes o aversivas en cerebros normales y adictos acelerarían el ritmo del descubrimiento de fármacos, el desarrollo de medicamentos y la recuperación de la adicción (Carlezon, 2009).

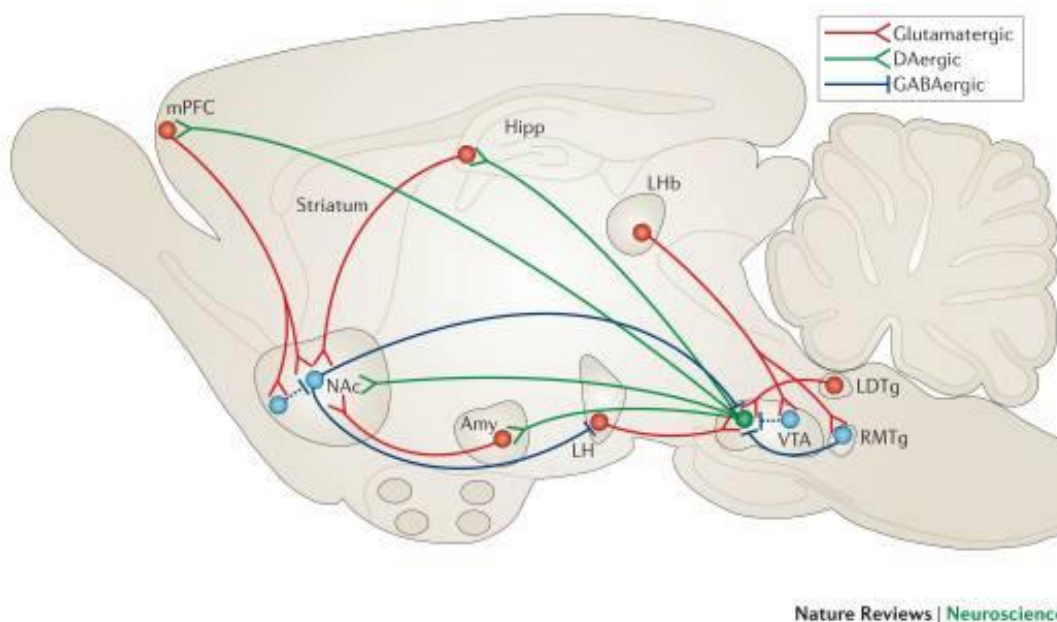


Figura 3. Circuito de recompensa. Un esquema simplificado de las principales conexiones dopaminérgicas, glutamatérgicas y GABAérgicas hacia y desde el área tegmental ventral (VTA) y el núcleo accumbens (NAc) (dopaminérgico:verde; glutamatérgico:rojo; y GABAérgico:azul) en el cerebro del roedor. El circuito de recompensa primario incluye proyecciones dopaminérgicas desde el VTA al NAc, que liberan dopamina en respuesta a estímulos relacionados con la recompensa (y en algunos casos la aversión). Las proyecciones a través de la vía directa (mediadas por neuronas espinosas medianas de tipo D1 [MSN]) inervan directamente el 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 intervinientes en el pálido ventral. El NAc recibe inervación densa de circuitos monosinápticos glutamatérgicos de la corteza prefrontal media (mPFC), hipocampo (HIP) y amígdala (AMG), entre otras regiones. El VTA recibe estas entradas de la Amy, el

tegmento dorsal lateral (LTDg), la habénula lateral (LHb) y el hipotálamo lateral (LH), entre otros. Estas diversas entradas glutamatérgicas controlan aspectos de la percepción y la memoria relacionadas con la recompensa (Russo, 2013).

3. Justificación

La sacarosa posee propiedades “adictivas”, las cuales inducen a los sujetos que la consumen a desarrollar un comportamiento de búsqueda y de preferencia. El procedimiento de CPP ha demostrado ser un medio útil y económico para evaluar las propiedades gratificantes de una manera bastante rápida, ya que los animales no requieren cirugía y un entrenamiento mínimo. La CPP también es ventajosa porque a veces puede establecerse usando un único emparejamiento de fármacos, es sensible a dosis de fármacos relativamente bajas y el animal puede probarse en un estado libre de fármacos (Feltenstein, 2008). Uno de los problemas más comunes del análisis de datos en este tipo de proyectos, es la falta de conocimiento sobre el manejo de softwares que ayuden a la obtención de variables necesarias para una buena lectura de resultados. Por otro lado, existe una literatura todavía pequeña pero creciente sobre el uso de CPP. El desarrollo de un algoritmo para el análisis de datos de experimentos de CPP, así como la validación de éste, nos permitirá determinar su utilidad y eficacia para una rápida obtención de variables involucradas en el estudio de los efectos gratificantes de sustancias hedónicas. Lo anterior, llevará a una comprensión más profunda de la neurobiología básica de los estados de ánimo y la relación que hay entre estos fenómenos de desarrollo de conductas compulsivas de consumo, lo cual facilitará el desarrollo de medicamentos bien tolerados que traten y prevengan la adicción y otras condiciones como, por ejemplo, trastornos de estado de ánimo, dolor crónico, obesidad y otras alteraciones de conducta asociados con la desregulación de los sistemas de motivación cerebral.

4. Pregunta de investigación

¿El desarrollo de un algoritmo mediante un software de inteligencia artificial facilitará la interpretación de comportamientos inducidos por la sacarosa en ratones C57BL/6 entrenados bajo el paradigma de CPP, donde se busca activar al circuito de recompensa y posteriormente interrumpir la señalización a través de una inyección IP de atropina?

5. Hipótesis

El algoritmo de seguimiento de objetos elaborado bajo el sistema de Matlab, es funcional para analizar e interpretar cuantitativamente los comportamientos que desarrollan los ratones cuando son entrenados bajo el paradigma de CPP por sacarosa, de igual manera, facilita la lectura de las variables para identificar si existen interrupciones en la señalización del circuito de recompensa al inyectar atropina.

6. Objetivo general

Analizar el potencial gratificante de sustancias hedónicas en la prueba de preferencia de lugar en ratones C57BL/6 mediante la creación de un algoritmo por programación.

7. Objetivos particulares

- ✓ Determinar las variables típicas y relacionadas al análisis de preferencia de lugar inducida por el consumo de sustancias gratificantes mediante programación y análisis de videos.
- ✓ Analizar el efecto gratificante de la sacarosa en ratones C57BL/6 y su establecimiento de CPP
- ✓ Evaluar el papel de la atropina en la disminución de la preferencia de lugar asociada a la sacarosa

8. Material y métodos

8.1 Sujetos de estudio

Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con las normas del comité de ética de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México. El cuidado de los animales, así como todos los procedimientos para su manejo, se realizaron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), avalados por la Comisión de Bioseguridad y de ética en el oficio CE/FES/022017/1105 como parte del proyecto “Alteraciones emocionales y cognitivas inducidas por el dolor neuropático crónico orofacial” y el Oficio CE/FES/092020/1370 como parte del proyecto “Análisis de la respuesta neuronal en regiones cerebrales a la administración intraoral de etanol en ratones C57BL/6”.

Se utilizaron 12 ratones macho de la cepa C57BL/6, los cuales fueron alojados en cajas de policarbonato en el bioterio del laboratorio de neurobiología de las sensaciones orales de la CUSI-Almaraz. Durante los días en los que se efectuó el experimento, los sujetos tuvieron agua y alimento *ad libitum*, sin embargo, en el proceso de la evaluación de preferencia de sacarosa, los sujetos fueron privados de agua en el tiempo que duró la prueba.

8.2 Aparato CPP

El aparato CPP estaba compuesto por dos compartimientos de plexiglás que estaban conectados por un corredor central. Ambos compartimientos tenían las paredes blancas, pero con figuras negras que diferían entre sí para crear un contexto ambiental desigualitario, uno tenía líneas gruesas verticales y los otros círculos salteados. El pasillo central tenía paredes grises y un piso amarillo. Todas las texturas del piso y la pared fueron consistentes en todos los compartimientos.

8.3 Protocolo de comportamiento

Habitación

El entrenamiento conductual comenzó con una prueba de habitación para determinar la preferencia de lugar. No hubo exposición de los animales con la sacarosa durante la etapa de habitación. Durante la habitación todos los ratones se colocaron en el pasillo central para que el animal tuviera libre acceso a ambos compartimientos durante una sesión completa de 15 minutos, eliminando así la novedad como variable de confusión. En un tercer día se repitió el procedimiento, pero ahora con el objetivo de medir la cantidad de tiempo que el ratón permaneció en cada compartimiento para determinar la preferencia inicial del animal. El compartimiento por el que el ratón no mostró una mayor preferencia inicial se designó como compartimiento emparejado con sacarosa durante los ensayos de condicionamientos posteriores.

Condicionamiento

Los ratones se dividieron aleatoriamente en tres grupos: el grupo basal (inyecciones de solución salina; n=4) y dos grupos control (inyecciones de atropina con dosis de 2 y 7mg/kg respectivamente; n=4 cada uno). Los ratones compensaron de manera que todos los ratones no comenzaran a condicionarse en el mismo compartimiento cada día (es decir, las sesiones posteriores comenzaron en cámaras opuestas). Los animales recibieron 5 sesiones emparejadas con sacarosa al 20% en el compartimiento no preferido y cinco sesiones emparejadas con agua en el compartimiento preferido.

Pruebas

En el séptimo día (día de prueba), los animales se sometieron al mismo procedimiento que en la habituación para determinar si se había establecido la preferencia de lugar condicionada con sacarosa. No se proporcionó ninguna sustancia durante la prueba. Dependiendo del grupo experimental, los animales recibieron una inyección intraperitoneal (IP) de dosis de solución salina (VEH) y de atropina de 2 y 7 mg/kg.

8.4 Procedimientos experimentales

Prueba de atropina

Para determinar el efecto de la atropina en la expresión de la preferencia de lugar asociada a la sacarosa, todos los ratones se sometieron a habituación, condicionamiento y pruebas con sacarosa. El día 7 (día de la prueba), se inyectó a los ratones VEH (n=2) o atropina (2 o 7 mg/kg; IP; n=2 y 2) 25 min antes de la prueba. La sesión de prueba fue idéntica al procedimiento de habituación. En total, se utilizaron 6 ratones para esta prueba.

Sin manipulación

Para determinar que el desarrollo de cualquier preferencia de lugar se debió específicamente al condicionamiento asociado a la sacarosa, un grupo de ratas (n=6) no recibió inyecciones de atropina el día de la prueba. Todos los ratones se sometieron a los mismos procedimientos de condicionamiento y prueba sin manipulación de fármacos.

8.5 Análisis estadístico

La cantidad de tiempo y el porcentaje de tiempo pasado en las cámaras se calculó utilizando el software MATLAB. El porcentaje de tiempo pasado en la cámara emparejada con sacarosa se calculó como el tiempo pasado en la cámara emparejada con sacarosa entre el tiempo total pasado en la cámara emparejada con el agua. Se omitió el tiempo pasado en el pasillo, ya que no se pasó tiempo en esta parte de la caja durante las pruebas de condicionamiento. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas bidireccionales para determinar las diferencias entre los grupos en la preferencia de lugar entre los animales tratados

con atropina y VEH y las diferencias entre los grupos en la preferencia de lugar entre la línea base y la preferencia de prueba. Todos los datos se presentan como la media \pm SEM. Se considero significancia estadística con un valor de $p < 0.05$.

9. Resultados

9.1 Los ratones presentan una respuesta condicionada en relación con la sacarosa

El algoritmo propuesto fue útil para poder analizar los videos de CPP y analizar los datos, de tal manera que se pudieron obtener variables para medir el efecto gratificante que tuvo la sacarosa en los ratones. En primer lugar, se realizó el análisis del índice de preferencia de lugar (Figura 4), el cuál reveló un aumento de tiempo de permanencia de los ratones del lado del compartimiento emparejado con sacarosa, notándose una diferencia estadísticamente significativa entre el día de habituación (Figura 4A) y el día 7 (Figura 4B), que fue en donde se puso a prueba a los ratones después de haber pasado por un tiempo de condicionamiento con sacarosa. Estos resultados sugieren que los animales mostraron una expresión atenuada de preferencia de lugar asociada a sacarosa en relación con los días de habituación, es decir, una respuesta condicionada.

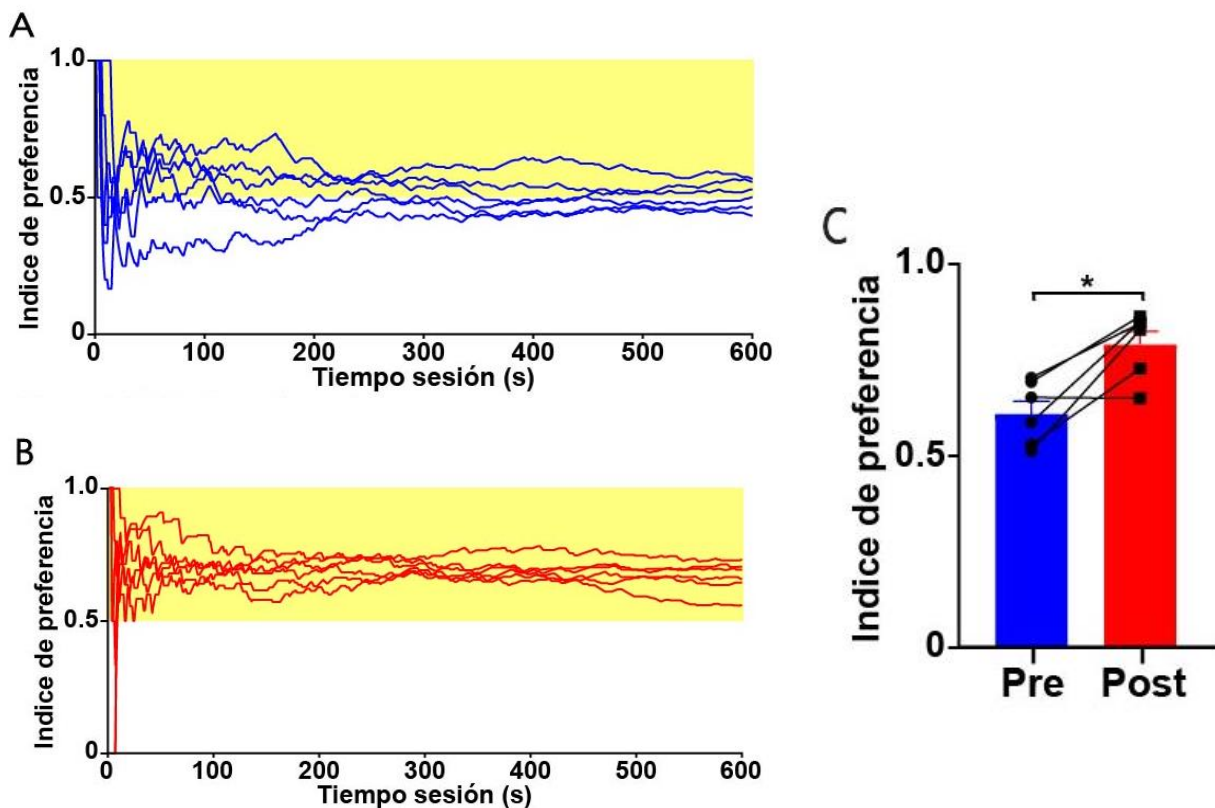


Figura 4. Índice de preferencia de lugar condicionada de sacarosa

Trazos de movimiento promedio (media \pm SEM) **(A y B)** gráfico de barras que comparan los movimientos del antes y después del entrenamiento del grupo de ratones **(C)** donde el color azul representa el antes y el color rojo el después. (M= 0.1461, SD=0.088; $p < 0.01$)

9.2 Comportamientos involucrados en la búsqueda del consumo de sacarosa posterior al entrenamiento

Uno de los objetivos que se logró resolver con el algoritmo elaborado, fue la obtención de las variables de distancia y velocidad, con lo que pudimos comprobar que los ratones realmente desarrollaron un comportamiento de búsqueda en la caja de CPP por la sustancia hedónica, en este caso sacarosa, la cual estimuló el sistema de recompensa. En la Figura 5 (A) se puede observar la distancia recorrida en metros de cada uno de los ratones (n=6) a lo largo de las sesiones de prueba; en azul se encuentra el trazado de los ratones en el día de la habituación y en rojo el recorrido de los ratones en el día de la prueba, posterior a la exposición de sacarosa comprobando que hubo un aumento en los desplazamientos de los ratones por la caja, explicándose como una conducta de búsqueda. En B se puede observar cómo los ratones se desplazaron con cierta velocidad a lo largo del tiempo de las sesiones de habituación y de prueba, ningún ratón se quedó quieto en algún momento. En las figuras de la derecha se muestra un promedio del antes y después del entrenamiento de la distancia (C) y la velocidad (D) de desplazamiento de los ratones, donde se visualiza la diferencia entre el antes y después del entrenamiento. Estas pruebas nos indican que se pudo activar el sistema de recompensa mediante la ingesta de sacarosa, ya que los ratones se movilizaron de una manera continua y rápida a través de los compartimientos de la caja experimental, esperando encontrar nuevamente la sustancia con estímulo gratificante.

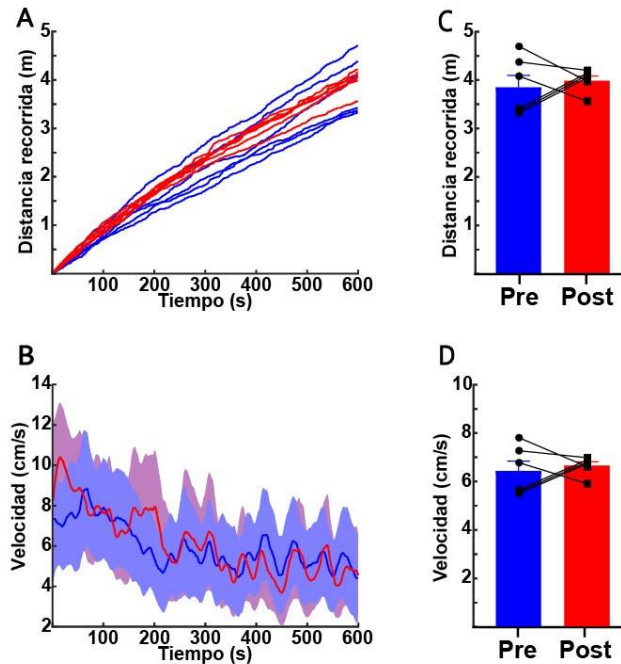


Figura 5. Distancia y velocidad del recorrido de los ratones antes y después de la prueba

A: Trazos de cada uno de los ratones antes (azul) y después (rojo) de la prueba. Se hace la comparación de la distancia (metros) recorrida de los ratones a lo largo del tiempo (segundos) tomando en cuenta el antes y después del entrenamiento con la sustancia hedónica ($M=132.9$, $SD=689.9$; $p<0.6$). **B:** Comparación del promedio y desviación estándar de la velocidad de desplazamiento de los ratones antes (azul) y después (rojo) de la prueba ($M=0.22$, $SD=1.152$; $p<0.6$). **C y D:** Gráfico de barras que compara la distancia recorrida y la velocidad de desplazamiento que tuvieron los ratones antes (azul) y después (rojo) del entrenamiento.

Posteriormente, determinamos el el número de cruces de cada ratón. En la figura 6 se puede observar el trazado (A) de un ratón donde se hace la comparación de los cruces que hizo entre los compartimientos de la caja de CPP antes (azul) y después (rojo) del entrenamiento. En estas figuras se puede observar un mayor movimiento del animal dentro de la caja, de un extremo a otro. También se obtuvo un mapa de calor donde se ilustran los lugares donde estuvo mayor tiempo el ratón, viéndose una diferencia notable entre el antes y después del entrenamiento en la cámara emparejada con la sacarosa (Figura 6 B). Por último, en la gráfica de barras (Figura 6 C) se hace una comparación del promedio del número de cruces que hubo por la caja entre el antes (azul) y después (rojo) del entrenamiento. Estos cruces nos ayudan a interpretar de una manera más clara el comportamiento de los ratones antes y después de tener contacto con la sacarosa. Es muy notable la forma en la que los ratones se desplazan por el pasillo intermedio para tener acceso a las cámaras externas, realizando diversos cruces de una forma constante con la finalidad de poder encontrar la sustancia que les causó placer en algún lugar de la caja, de esta forma comprobamos la teoría de CPP, donde efectivamente se

desarrolla un comportamiento de búsqueda y “necesidad” por ingerir constantemente la sustancia hedónica.

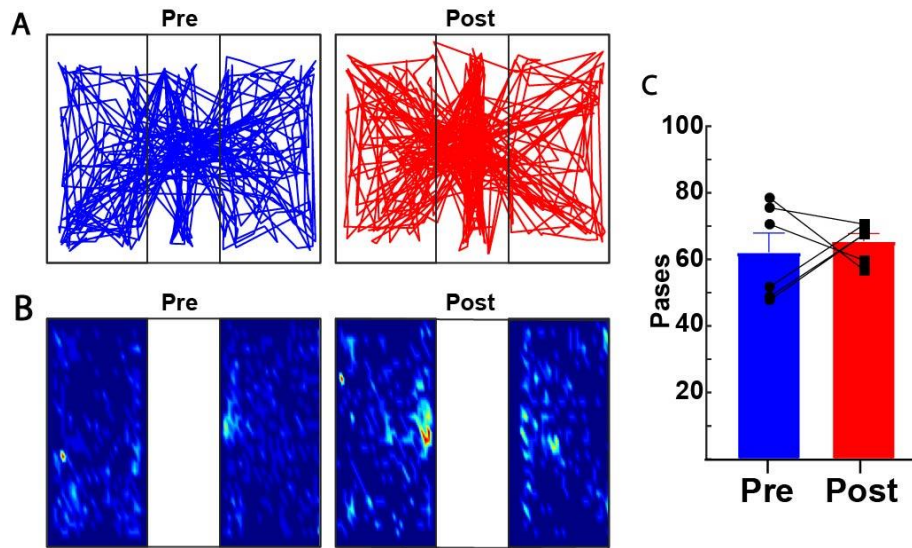


Figura 6. Número de cruces por caja

A: Trazos de cruces por caja que hizo un ratón antes y después del entrenamiento.
B: Mapa de calor (Heatmap) del movimiento de un ratón en la caja de CPP. Las zonas que muestran un tono rojizo, es dónde el ratón pasó mayor número de veces.
C: Gráfico de barras que hace una comparación entre el número de cruces que tuvieron los ratones en la caja de CPP a lo largo del tiempo de estancia, antes (azul) y después (rojo) del entrenamiento ($M=3.3$, $SD=18.36$; $p<0.6$).

9.3 La atropina no afectó la adquisición de la preferencia de lugar de sacarosa

En la figura 7 se puede observar un análisis del índice de CPP que los ratones presentaron posterior a la inyección de atropina y VEH en los grupos experimentales. Todos los ratones adquirieron con éxito la preferencia de lugar condicionada asociada a la sacarosa. No hubo diferencias significativas en el tiempo pasado en la cámara emparejada de sacarosa durante la prueba de preferencia entre atropina o VEH administrados en el día de la prueba lo que sugiere que la administración de atropina por vía intraperitoneal durante la prueba no afectó la adquisición de preferencia de lugar asociada a sacarosa en relación con los animales tratados con VEH, sin embargo, esto nos da la pauta para seguir buscando el método eficaz para suprimir esta preferencia, ya sea con la exposición del fármaco durante los días de condicionamiento, un aumento en la dosis inyectada o mediante inyecciones intracerebrales.

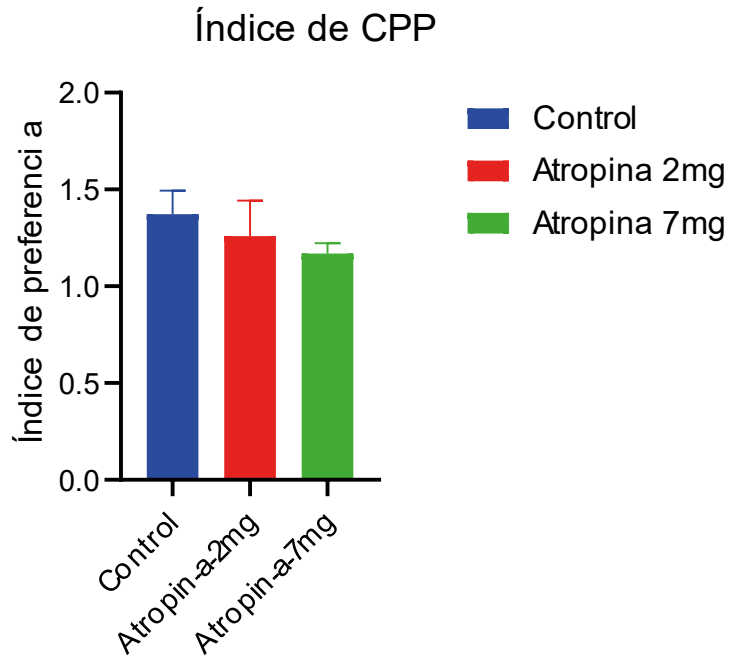


Figura 7. Índice de preferencia de lugar condicionada de sacarosa con IP de atropina

Porcentaje de tiempo pasado en la cámara de conducta de la prueba de CPP con sacarosa e inyecciones de atropina ($p < 0.8$)

10. Discusión

El presente trabajo demuestra que la CPP de sacarosa se obtuvo con éxito en ratones que recibieron asociaciones de dicha sustancia en un contexto específico. Se decidió implementar un sistema típico de CPP, donde los ratones eran libres de consumir sacarosa en una cámara específica de la caja y del lado contrario, se les proporcionaba agua. De esta forma, se pudo analizar, con ayuda del algoritmo desarrollado, el índice de preferencia de una forma confiable y rápida, lo cual ayudó a no retrasar los tiempos de duración del experimento propuestos en el protocolo. Una vez que se obtuvieron las mediciones de CPP se pudo comprobar de una manera positiva, que hubo un desarrollo del comportamiento de búsqueda hacia la sacarosa, activando de esta forma el circuito de recompensa, dándonos la pauta de establecer posteriormente una aversión ante la sustancia hedónica con inyecciones de atropina. Sin embargo, una vez analizados los datos, no se obtuvieron diferencias significativas entre el día 1 (habitación) y el día 7 (prueba de CPP). Estos hallazgos sugieren que la inyección IP de atropina no atenúa suficientemente la expresión de preferencia de lugar asociada a la sacarosa, por lo tanto, es necesario la búsqueda de técnicas alternativas para interrumpir la expresión de comportamientos desadaptativos de búsqueda de sacarosa utilizando atropina.

A pesar de que en las últimas décadas el condicionamiento de preferencia de lugar se ha convertido en una herramienta valiosa, fuertemente establecida y muy utilizada en la farmacología del comportamiento y la investigación de las adicciones, este ha sido criticado debido a algunos problemas metodológicos (Tzschentke, 1998).

Investigaciones anteriores han demostrado que existen variaciones en las respuestas de CPP relacionadas con la cepa. La interpretación más común de tales efectos es una diferencia de percepción en la sensibilidad al efecto gratificante de la sustancia; sin embargo, son posibles otras interpretaciones. Por ejemplo, dado que la CPP depende de los procesos de aprendizaje y memoria, las cepas pueden diferir en su capacidad para formar asociaciones de contexto-fármaco o en su capacidad para recuperar recuerdos basados en esas asociaciones. Esa interpretación predice una fuerte correlación genética entre el rendimiento de la tensión en la tarea de CPP y el rendimiento de la tensión en otras tareas de aprendizaje y memoria, incluidas aquellas que involucran refuerzo no farmacológico. También hay evidencia convincente de que una señal multimodal producirá un desarrollo más rápido de CPP que una señal de un solo elemento, pero que la ventaja de una señal multimodal se verá disminuida o afectada tras un entrenamiento continuo. La generalización de este hallazgo está respaldada por la demostración de este efecto en dos cepas de ratón de uso común, B6 y D2. Estos estudios también apoyan estudios previos que indican que los ratones D2 son más sensibles a la recompensa de etanol que los ratones B6. Además, estos estudios

sugieren que las configuraciones de señales de los aparatos pueden tener diferentes efectos en ratones y ratas. Finalmente, ilustran el valor de probar la CPP después de diferentes cantidades de entrenamiento, por ejemplo, en algunos protocolos sugieren realizar hasta 2 sesiones de condicionamiento por día por cada ratón, sin embargo, hay evidencia de que los ratones también podrían alterarse por dicha acción (Cunningham, 2018; Blanco-Gandía, 2018).

Una de las variaciones del modelo de CPP involucra tres fases diferentes: adquisición (que incluye la habituación, el condicionamiento y la prueba de CPP), extinción y reinstalación. En el modelo de restablecimiento de CPP, los animales primero adquieren el CPP para un compartimiento emparejado con el fármaco y luego realizan varias sesiones de extinción. Se define extinción como el momento en el que el animal reduce sus respuestas conductuales de aproximación a un estímulo gratificante condicionado que ha sido eliminado (por ejemplo, la droga). Durante las sesiones de extinción, los animales exploran los compartimientos en ausencia del fármaco, de modo que la preferencia adquirida se atenúa gradualmente. Un tema importante para considerar es que el cambio de comportamiento que exhibe el animal durante la extinción (la disminución progresiva del tiempo de permanencia en el compartimiento emparejado con el fármaco) puede deberse a nuevos procesos de aprendizaje que compiten con la respuesta anteriormente aprendida, o debido a una disminución del estado motivacional interno del sujeto. Finalmente, el restablecimiento de la preferencia de lugar a través del contexto o las señales de drogas sería el modelo de reinstalación (Blanco-Gandía, 2018).

En el caso de nuestro trabajo, una visión a futuro sería estudiar el efecto de la atropina a largo plazo sobre la preferencia inducido por sacarosa, donde se esperaría que la administración de una inyección de preparación del fármaco limite la búsqueda de la sustancia hedónica pero que, en las etapas posteriores, omitiendo la intervención de la atropina se pueda restablecer la preferencia, lo que se consideraría un restablecimiento de la aproximación a las señales contextuales. Con esto, evaluaríamos el papel de la memoria sobre los efectos placenteros y motivacionales relacionados con la recompensa. El punto clave de la investigación en adicción a las drogas es el desarrollo de tratamientos que disminuyan el ansia y, en consecuencia, reduzcan la vulnerabilidad a las recaídas (Blanco-Gandía, 2018). por lo que este modelo de estudio tiene un buen grado de validez y factibilidad, ya que simula bien la situación por la que pasa un ser humano durante un proceso de adicción, es decir, se incita el reintegro con estímulos que inducen la recaída, como la reexposición al fármaco o el estrés. Sin embargo, precisamente, el estrés es un punto muy importante para considerar. La limitación más importante del paradigma CPP y el modelo de reinstalación es que son muy sensibles a cualquier cambio ambiental. Por lo tanto, las condiciones de la habitación con compañeros del sexo

opuesto, jaulas con artefactos como ruedas que hacen un ruido específico y constante, o condiciones de luz. Además de controlar estas variables, el rol del investigador también es crítico, ya que puede inducir un aumento en los niveles de estrés de los animales e interferir con los resultados (Blanco-Gandía, 2018). En el caso de este trabajo, se cuidó este aspecto, ya que una sola persona se encargó de realizar la manipulación de los ratones.

En los experimentos de CPP generalmente se realizan sesiones de prueba con una duración de 15 a 20 minutos. Anteriormente, los tiempos de permanencia de los animales en los diferentes compartimientos de condicionamiento se determinaban mediante observación directa, lo que implicaba mucho tiempo (Tzschentke, 1998). Con el paso del tiempo, las estrategias para el análisis de estas variables fueron modificándose con el objetivo de reducir el tiempo para la lectura y obtención de datos. Uno de los métodos mejores aceptados fue el uso de sistemas de seguimiento automatizados, normalmente basados en dispositivos de haz de fotocélulas, se han hecho intentos para mejorar estos sistemas artificiales y recopilar información adicional durante el experimento, principalmente con respecto a la actividad locomotora. Es por eso, que, en este trabajo, se planteó como objetivo principal elaborar un algoritmo que fuera funcional para el análisis de datos obtenidos de experimentos involucrados en el desarrollo de CPP. Es importante mencionar que previamente se hizo una compilación de algoritmos que fueron utilizados para proyectos similares en diferentes artículos, resaltando de esta forma las ventajas del algoritmo propuesto. Es de gran relevancia la facilidad con la que se podrán analizar videos de este tipo de experimentos en futuros proyectos, ya que, a comparación de otros trabajos, el software empleado aquí (MATLAB) es de acceso gratuito con licencia académica de la UNAM y su uso es muy práctico, ya que el sistema cuenta con tutoriales fáciles de seguir para el entendimiento del programa. Otra ventaja de que se posee Matlab es la oportunidad que se tiene de alterar la lógica de los algoritmos previamente establecidos, logrando de esta forma realizar ajustes en la lectura de las matrices y poder encontrar un seguimiento de pasos personalizado. Como se mencionó anteriormente, la evaluación de la actividad locomotora durante la prueba de CPP puede ayudar a obtener más información sobre la expresión de diferentes comportamientos provocados por CPP (Alderson, 2001).

Otro resultado que se obtuvo en este trabajo fue el desarrollo de la preferencia de lugar condicionada que se adquirió con éxito en animales que recibieron emparejamientos de sacarosa en un contexto específico. Estos hallazgos se respaldaron con el análisis de las variables del índice de preferencia, donde es muy evidente que los ratones prefirieron estar del lado donde se les había proporcionado la sacarosa. También se obtuvo la velocidad de desplazamiento y la distancia recorrida de los ratones dentro de la caja, con lo que se pudo comprobar el

comportamiento de búsqueda asociado con la recompensa, sin embargo, una de las variables más importantes que se obtuvieron con este trabajo, fueron los números de cruces que hicieron los ratones por los compartimientos de la caja, lo cual se puede interpretar como una búsqueda desesperada por encontrar la sustancia gratificante en alguna de las cámaras, es evidente que al tener apertura a la ingesta de sacarosa se estimuló el circuito de recompensa, lo que derivó una respuesta condicionada. Por otro lado, se pudo observar que la administración intraperitoneal de atropina no interrumpió significativamente la expresión de preferencia de lugar condicionada cuando se administró el día de la prueba. Estos hallazgos sugieren la búsqueda de otras vías de administración de atropina en los animales para lograr interrumpir la expresión de comportamientos de búsqueda de sacarosa.

Para realizar un experimento basado en el paradigma de CPP, se tienen que tomar en cuenta varios puntos que pueden llegar a ser cruciales para los resultados del proyecto, por ejemplo, la elección del diseño de la caja de trabajo o el número de sesiones y fases que se incluirán en el trabajo. Otro factor que se tiene que considerar antes de empezar con el desarrollo del modelo es decidir si se opta por un diseño imparcial o uno sesgado. Se puede diseñar un aparato de condicionamiento de modo que los animales ingenuos no muestren una preferencia significativa por uno de los compartimientos de condicionamiento en la exposición inicial (diseño imparcial), o se puede diseñar de manera que los animales muestren una preferencia incondicionada por un lado sobre el otro (diseño sesgado). En el último caso, la administración del fármaco se puede emparejar con la exposición de los animales al compartimiento preferido o no preferido, o el emparejamiento se puede compensar, de modo que para la mitad de los animales el tratamiento se empareja con el comportamiento preferido, mientras que, para la otra mitad de los animales, el tratamiento se empareja con el compartimiento no preferido. Esto sugiere que el diseño sesgado y no equilibrado puede ser útil para detectar efectos motivacionales de un fármaco que dependen de la línea de base motivacional o del estado del animal, siempre que se incluyan los controles adecuados, por ejemplo, emparejando el fármaco con el preferido y el no-compartimiento preferido en diferentes grupos de animales, y mediante la inclusión de controles de solución salina apropiados. Por lo tanto, el uso del diseño sesgado (diseño elegido para trabajar en este proyecto) puede ser útil para detectar efectos ansiolíticos y antiaversivos de los fármacos independientemente de los posibles efectos gratificantes genuinos. Una vez que se ha establecido una configuración experimental, una vez que se ha determinado si la configuración es sesgada o imparcial, y una vez que se ha confirmado que las drogas de "control positivo" como la morfina o la cocaína producen una CPP clara y reproducible. El procedimiento de CPP puede producir una CPP clara reproducible (Tzschentke, 1998).

La gran mayoría de los estudios de CPP se han centrado en los efectos farmacológicos sobre el aprendizaje de preferencia de lugar establecido por los reforzadores de fármacos, en lugar de reforzadores “naturales” como los alimentos. Sin embargo, existe evidencia que demuestra demostrado que los CPP se pueden establecer utilizando reforzadores naturales y que los sistemas opioides y dopaminérgicos pueden desempeñar un papel importante en este aprendizaje (Delamater, 2000). La sacarosa se ha caracterizado como una sustancia de abuso en modelos animales: las ratas expuestas a la sacarosa muestran una serie de respuestas fisiológicas y de comportamiento similares a las provocadas por drogas de abuso como la cocaína o la anfetamina. Estos incluyen cambios de comportamiento como la CPP, abstinencia y deseo y respuestas fisiológicas como el aumento de la dopamina extracelular en el NAc (Mohammed, 2018). La acumulación de estudios preclínicos y clínicos ha proporcionado evidencia de que la disponibilidad de una dieta o solución endulzada, como recompensa no farmacológica, tiene una gran influencia en las propiedades conductuales de las drogas adictivas. La correlación entre la preferencia de sacarosa y los efectos conductuales de las drogas adictivas se ha examinado ampliamente de forma experimental, comparando las respuestas de ratas criadas selectivamente; en entornos clínicos tanto los pacientes dependientes de alcohol como los dependientes de la cocaína hay mostrado una preferencia alterada por la sacarosa de alta concentración. La evidencia de la participación del sistema de dopamina en la recompensa de la sacarosa también apoya la hipótesis de que una vía neuroquímica común subyace a la interacción conductual entre la sacarosa y otras drogas adictivas (Zhai, 2008).

El presente estudio buscó examinar el efecto de una posible diana terapéutica, la atropina, sobre el comportamiento de preferencia de lugar asociado a la sacarosa. Se ha demostrado que la sacarosa tiene efectos sobre el sistema opioide endógeno. Los análisis de alteraciones locomotoras también han demostrado una fuerte correlación entre en consumo de sacarosa y los efectos de comportamiento mediados por opioides, por ejemplo, la ingesta de una solución de sacarosa que resulte agradable puede modificar la acción de la morfina y otros fármacos opioides sobre la percepción del dolor. También se ha demostrado que el consumo de sacarosa eleva los niveles extracelulares de dopamina en el prosencéfalo estriado de ratas (Zhai, 2008). Estos datos obtenidos de investigaciones anteriores sugieren que el sistema opioide está involucrado en las CPP reforzadas de sacarosa lo que es consistente con la opinión de que los sistemas opioides endógenos están relacionados con el valor hedónico de los alimentos. Por lo tanto, las modulaciones inducidas por opioides en el valor de la sacarosa pueden ser más importantes para el rendimiento que para los procesos de aprendizaje en el procedimiento de CPP (Delamater, 2000).

El presente estudio demuestra que la CPP de sacarosa se adquirió con éxito en animales que recibieron emparejamientos de sacarosa en un contexto específico y que la administración periférica de atropina no interrumpió significativamente la expresión de CPP. Se sabe que la activación de los receptores muscarínicos parece mejorar el aprendizaje y la memoria, por lo que era probable que la atropina redujera el aprendizaje relacionado con la recompensa. Estudios anteriores también han indicado que las inyecciones de atropina en el VTA inhiben la recompensa por estimulación cerebral (Rezayof, 2006). De igual manera se sabe que los agonistas nicotínicos y muscarínicos excitan directamente las neuronas VTA DA (Yeomans, 1997). Estos hallazgos sugieren que la atropina no atenúa suficientemente la expresión de CPP asociada a la sacarosa, sin embargo, si puede ser una opción viable para interrumpir la expresión de comportamientos desadaptativos de búsqueda de sacarosa utilizando diferentes métodos de administración del fármaco en los animales. Patel (2020) demostró que la administración de la oxitocina a nivel periférico posterior al condicionamiento interrumpe la respuesta de CPP, sin embargo, si se inyecta durante esa etapa de asociación, no se verá ninguna alteración en el comportamiento de búsqueda. Estas diferencias, tanto de la oxitocina como de la atropina, pueden deberse a que recompensa natural y del fármaco están mediadas por vías neuronales superpuestas pero distintas, lo que resulta en un efecto diferencial del fármaco en varias etapas de los comportamientos de búsqueda de recompensa. Además, también es probable que, a diferencia de las drogas de abuso, el valor hedónico y de incentivo relativamente más bajo de la sacarosa sea insuficiente para que la atropina o la oxitocina ejerza un efecto durante la adquisición. Los estudios futuros deben examinar el efecto de la atropina de infusión centralizada sobre la CPP por sacarosa.

Se ha demostrado, que tanto la inyección intraperitoneal como la intracerebroventricular de oxitocina disminuyen de manera dependiente de la dosis en la ingesta de alimentos en ratas con comida *ad libitum* y ratas con restricción de comida, en cambio, las inyecciones centrales de oxitocina disminuyen la ingesta de una solución de sacarosa (Patel, 2020). Con esos datos obtenidos, es claro que deben realizarse más estudios para poder determinar las estructuras y mecanismos específicos involucrados en este proceso. Estos resultados brindan importancia clínica y experimental, dados los riesgos para la salud asociados con el consumo excesivo de azúcar y la información adicional sobre los procesos que subyacen al efecto de la atropina sobre los comportamientos adquiridos en la recompensa.

Se espera que este trabajo sirva como base para continuar expandiendo el campo de estudio de sustancias hedónicas y su relación con CPP, buscando rutas neuronales en donde se puedan involucrar fármacos que induzcan la disminución o inhibición del circuito de recompensa. Una ventaja de considerar este proyecto

como guía para futuros experimentos, es que se contará con un algoritmo previamente estudiado y puesto a prueba, que facilitará el análisis de datos para la traducción de los comportamientos desarrollados por los animales en un programa que cuenta con la opción de modificar los arreglos de matrices para alterar las variables deseadas a estudiar. Es importante mencionar, que el estudio de los efectos gratificantes de la sacarosa y su vía de acción en el circuito de la recompensa, es un tema que debería ser prioridad, ya que como sabemos, muchos de los alimentos que consumimos en la actualidad son procesados y uno de sus ingredientes principales es la sacarosa, lo que se convierte en un factor alarmante, ya que los consumidores llegan a desarrollar comportamientos similares a la “adicción”, llevándolos a consumir constantemente estos alimentos, con el propósito de satisfacer este “placer” y desencadenando futuras enfermedades, como por ejemplo, la obesidad. Es por ello, que la búsqueda de una disminución en el comportamiento adictivo a la sacarosa, a nivel neuronal y conductual toma un papel crucial en el estudio de tratamientos futuros sobre comorbilidades clínicamente perjudiciales.

11. Conclusión

El algoritmo elaborado en este trabajo será de gran ayuda para futuros experimentos, ya que brinda una guía rápida para la obtención de variables necesarias para el análisis de datos obtenidos con el paradigma de CPP.

Por otro lado, el modelo de conducta de preferencia de lugar condicionado (CPP) es eficaz para estudiar los efectos gratificantes de sustancias hedónicas en roedores. Este sistema experimental brinda un amplio campo de estudio para diferentes pruebas de recompensa con diversas sustancias y/o fármacos que involucren conductas como la adicción y trastornos del comportamiento. Una de las mayores ventajas al utilizar este paradigma, es que su metodología puede moldearse a las necesidades del experimentador.

Es necesario plantear nuevas estrategias de administración de atropina en los ratones para poder atenuar una alteración en el sistema de recompensa con el objetivo de revertir el comportamiento de preferencia de lugar asociado a sacarosa.

12. Glosario

- *Algoritmo*: En el ámbito de programación, los algoritmos son una herramienta que permite describir claramente un conjunto finito de instrucciones, ordenadas secuencialmente y libres de ambigüedad, que debe llevar a cabo un computador para lograr un resultado previsible. Vale la pena recordar, que un programa de computador consiste en una serie de instrucciones muy precisas y escritas en un lenguaje de programación que el computador entiende. En resumen, un algoritmo es una secuencia ordenada de instrucciones, pasos o procesos que llevan a la solución de un determinado problema (López, 2009).
- *Condicionamiento operante*: Una respuesta a la que depende la presentación de un reforzador, como presionar una palanca. Tal comportamiento se llama “instrumental” para obtener una meta (o “resultado” o “reforzador”) o bien, es una acción voluntaria. El aprendizaje de tales comportamientos se denomina condicionamiento instrumental.
- *Condicionamiento pavloviano o clásico*: A principios de la década de 1900, Iva Pavlov delineó el proceso de aprendizaje por excelencia del condicionamiento clásico, el cual implica emparejar dos estímulos, un estímulo no condicionado (p. Ej., comida apetitosa) que naturalmente provoca una respuesta (p. Ej., salivación) con un estímulo condicionado (p. Ej., campana), para crear una nueva respuesta aprendida (p. Ej., acicalación al escuchar la campana) (Hanley, 2019).
- *Contingencia*: Una relación temporal consistente entre dos (o más) eventos que reduce la incertidumbre del evento posterior: por ejemplo, una situación en la que un tono siempre ocurre al mismo tiempo que un shock (Everitt, 2005).
- *Dolor neuropático orofacial*: Se describe como un dolor causado por una lesión o enfermedad del sistema nervioso somatosensorial (Christoforou, 2018).
- *Estímulo discriminativo*: Un estímulo en cuya presencia se refuerza la respuesta de acuerdo con algún programa de refuerzo. Por ejemplo, las señales de drogas pueden actuar como estímulos discriminativos para una respuesta conductual que se mantiene mediante el esfuerzo de drogas (Everitt, 2005).
- *Estímulo-respuesta o aprendizaje por “hábito”*: En el aprendizaje de hábitos, el desempeño instrumental se adquiere mediante la asociación de respuestas con estímulos presentes durante el entrenamiento. Por lo tanto, refleja la formación de asociaciones estímulo-respuesta y los reforzadores cumplen principalmente la función de fortalecer la asociación estímulo-respuesta, pero no se codifican como objetivo. Por lo tanto, la devaluación del reforzador no afecta la respuesta instrumental adquirida por el aprendizaje de hábitos (Everitt, 2005).

- *Incentivo*: Un estímulo que provoca una conducta de acercamiento (incentivo positivo) o una conducta de retraimiento (incentivo negativo). Un incentivo condicionado adquiere tales propiedades a través del condicionamiento pavloviano. Los incentivos y los incentivos condicionados también pueden funcionar como reforzadores y reforzadores condicionados, respectivamente dependiendo de las contingencias ambientales.
- *Paradigma*: Concepto vital que dirige el desarrollo de una disciplina científica (Deliktas, 2019).
- *Preferencia de lugar condicionado (CPP)*: El CPP es un procedimiento comúnmente utilizado para estudiar los efectos gratificantes condicionados de las drogas de abuso (Aguilar, 2009). Se ha convertido en una herramienta preclínica básica utilizada para evaluar comportamientos relacionados con la recompensa (Vassilev, 2020). El modelo de CPP consta de tres fases: habituación, condicionamiento y post-condicionamiento (es decir, prueba de CPP) (McKendrick, 2020).
- *Reforzador negativo*: Un evento que cuando se omite o termina aumenta la probabilidad de la respuesta a la que depende. Por ejemplo, los síntomas de abstinencia precipitados por la administración programada de naloxona en animales dependientes de morfina, que pueden evitarse presionando la palanca para posponer la naloxona (Everitt, 2005).
- *Reforzador positivo*: Un evento que aumenta la probabilidad de una respuesta de la que depende. Por ejemplo, las infusiones de fármacos aumentan la probabilidad de que se presione la palanca del fármaco; la ingestión de alcohol aumenta la probabilidad de lamer o beber (Everitt, 2005).
- *Refuerzo condicionado*: Un estímulo que adquiere sus propiedades reforzantes (positivas o negativas) al emparejarse con otros reforzadores, generalmente primarios, como la comida, las drogas, el sexo o la descarga eléctrica. Un estímulo puede funcionar como reforzador condicionado o como estímulo discriminativo en la misma situación (Everitt, 2005).
- *Sustancias hedónicas*: Sustancia que resulta agradable y gratificante, simula una recompensa, es decir que es de naturaleza apetitiva ante un estímulo dado (Prus, 2009).
- *Transferencia instrumental pavloviana (PIT)*: Los estímulos pavlovianos apetitosos (asociados con reforzadores positivos como la comida) pueden mejorar en gran medida la respuesta instrumental para el mismo reforzador cuando se presentan de forma inesperada (independientemente de la respuesta instrumental), y esto define el efecto de transferencia instrumental pavloviano. El PIT se ha interpretado como evidencia de que las CS ejercen una influencia motivacional sobre el desempeño instrumental (Everitt, 2005).

13. Referencia Bibliográficas

- 1) Aguilar, M. A., Rodríguez-Arias, M., & Miñarro, J. (2009). Neurobiological mechanisms of the reinstatement of drug-conditioned place preference. *Brain Research Reviews*, 59(2), 253-277. doi:https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.08.002
- 2) Alderson, H. L., Jenkins, T. A., Kozak, R., Latimer, M. P., & Winn, P. (2001). The effects of excitotoxic lesions of the pedunculopontine tegmental nucleus on conditioned place preference to 4%, 12% and 20% sucrose solutions. *Brain Research Bulletin*, 56(6), 599-605. doi: https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00733-X
- 3) Alhadeff, A. L., Goldstein, N., Park, O., Klima, M. L., Vargas, A., & Betley, J. N. (2019). Natural and Drug Rewards Engage Distinct Pathways that Converge on Coordinated Hypothalamic and Reward Circuits. *Neuron*, 103(5), 891-908.e896. doi:10.1016/j.neuron.2019.05.050
- 4) Bardo, M. T., & Bevins, R. A. (2000). Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology (Berl)*, 153(1), 31-43. doi:10.1007/s002130000569
- 5) Bevins, R. A., Besheer, J., Palmatier, M. I., Jensen, H. C., Pickett, K. S., & Eures, S. (2002). Novel object place conditioning: behavioral and dopaminergic processes in expression of novelty reward. *Behavioural Brain Research*, 129(1), 41-50. doi:https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00326-6
- 6) Blanco-Gandía, MC, Aguilar, MA, Miñarro, J. y Rodríguez-Arias, M. (2018). Reinstatement of Drug-seeking in Mice Using the Conditioned Place Preference Paradigm. *Revista de experimentos visualizados: JoVE*, (136), 56983. https://doi.org/10.3791/56983
- 7) Bouarab, C., Thompson, B., & Polter, A. M. (2019). VTA GABA Neurons at the Interface of Stress and Reward. *Frontiers in neural circuits*, 13, 78-78. doi:10.3389/fncir.2019.00078
- 8) Bradfield, L., Hart, G., & Balleine, B. (2013). The role of the anterior, mediodorsal, and parafascicular thalamus in instrumental conditioning. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 7(51). doi:10.3389/fnsys.2013.00051
- 9) Cardinal, R. N., & Everitt, B. J. (2004). Neural and psychological mechanisms underlying appetitive learning: links to drug addiction. *Current Opinion in Neurobiology*, 14(2), 156-162. doi:https://doi.org/10.1016/j.conb.2004.03.004
- 10) Carlezon, W. A., Jr., & Thomas, M. J. (2009). Biological substrates of reward and aversion: a nucleus accumbens activity hypothesis. *Neuropharmacology*, 56 Suppl 1(Suppl 1), 122-132. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.06.075
- 11) Childs, E., & de Wit, H. (2009). Amphetamine induced place preference in humans. *Biological psychiatry*, 65(10), 900-904. doi:10.1016/j.biopsych.2008.11.016

- 12) Childs, E., & de Wit, H. (2013). Contextual conditioning enhances the psychostimulant and incentive properties of d-amphetamine in humans. *Addiction biology*, 18(6), 985-992. doi:10.1111/j.1369-1600.2011.00416.x
- 13) Childs, E., & de Wit, H. (2016). Alcohol-induces place conditioning in moderate social drinkers. *Addiction (Abingdon, England)*, 111(12), 2157-2165. doi:10.1111/add.13540
- 14) Cunningham, CL y Shields, CN (2018). Effects of multi-modal cues on conditioned place preference in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Psicofarmacología*, 235 (12), 3535–3543. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5078-2>
- 15) Delamater, A. R., Sclafani, A., & Bodnar, R. J. (2000). Pharmacology of Sucrose-Reinforced Place-Preference Conditioning: Effects of Naltrexone. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 65(4), 697-704. doi:[https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(99\)00251-8](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(99)00251-8)
- 16) Deliktas, A., Korukcu, O., Aydin, R., & Kabukcuoglu, K. (2019). Nursing Students' Perceptions of Nursing Metaparadigms: A Phenomenological Study. *The journal of nursing research : JNR*, 27(5), e45-e45. doi:10.1097/jnr.0000000000000311
- 17) Deng, J. V., Rodriguiz, R. M., Hutchinson, A. N., Kim, I.-H., Wetsel, W. C., & West, A. E. (2010). MeCP2 in the nucleus accumbens contributes to neural and behavioral responses to psychostimulants. *Nature neuroscience*, 13(9), 1128-1136. doi:10.1038/nn.2614
- 18) Ebrahimi, Z., Kahvandi, N., Komaki, A., Karimi, S. A., Naderishahab, M., & Sarihi, A. (2021). The role of mGlu4 receptors within the nucleus accumbens in acquisition and expression of morphine-induced conditioned place preference in male rats. *BMC neuroscience*, 22(1), 17-17. doi:10.1186/s12868-021-00627-2
- 19) Ernst, M., & Luciana, M. (2015). Neuroimaging of the dopamine/reward system in adolescent drug use. *CNS spectrums*, 20(4), 427-441. doi:10.1017/S1092852915000395
- 20) Everitt, B. J., Dickinson, A., & Robbins, T. W. (2001). The neuropsychological basis of addictive behaviour. *Brain Research Reviews*, 36(2), 129-138. doi:[https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(01\)00088-1](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(01)00088-1)
- 21) Everitt, B.J., & Robbins, T.W. (2005). Neuronal systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nature Neuroscience* 8, 1481-1489. doi: 10.1038/nn1579
- 22) Feltenstein, M. W., & See, R. E. (2008). The neurocircuitry of addiction: an overview. *British Journal of Pharmacology*, 154(2), 261-274. doi:<https://doi.org/10.1038/bjp.2008.51>

- 23) Flagel, S. B., Akil, H., & Robinson, T. E. (2009). Individual differences in the attribution of incentive salience to reward related cues: Implications for addiction. *Neuropharmacology*, *56 Suppl 1*(Suppl 1), 139-148. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.06.027
- 24) Haber, SN y Knutson, B. (2010). The Reward Circuit: Linking Primate Anatomy and Human Imaging. *Neuropsicofarmacología: publicación oficial del Colegio Americano de Neuropsicofarmacología*, *35* (1), 4–26. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.129>
- 25) Hanley, A. W., & Garland, E. L. (2019). Mindfulness training disrupts Pavlovian conditioning. *Physiology & Behavior*, *204*, 151-154. doi:<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.02.028>
- 26) Huston, J. P., Silva, M. A. d. S., Topic, B., & Müller, C. P. (2013). What's conditioned in conditioned place preference?. *Trends in Pharmacological Sciences*, *34*(3), 162-166. doi:10.1016/j.tips.2013.01.004
- 27) Itzhak, Y., Roger-Sánchez, C., Kelley, J. B., & Anderson, K. L. (2010). Discrimination between cocaine-associated context and cue in a modified conditioned place preference paradigm: role of the nNOS gene in cue conditioning. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *13*(2), 171-180. doi:10.1017/s1461145709990666
- 28) López, J. (2009). Algoritmos y programación. Fundación Gabriel Piedrahita Uribe. Segunda edición. doi: <https://www.eduteka.org>
- 29) Lowes, D. C., Chamberlin, L. A., Kretsge, L. N., Holt, E. S., Abbas, A. I., Park, A. J., . . . Harris, A. Z. (2021). Ventral tegmental area GABA neurons mediate stress-induced blunted reward-seeking in mice. *Nature communications*, *12*(1), 3539-3539. doi:10.1038/s41467-021-23906-2
- 30) McKendrick, G., & Graziane, N. M. (2020). Drug-Induced Conditioned Place Preference and Its Practical Use in Substance Use Disorder Research. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *14*(173). doi:10.3389/fnbeh.2020.582147
- 31) Mohammed Jawad, RA, Hutchinson, CV y Prados, J. (2018). Dissociation of place preference and tolerance responses to sucrose using a dopamine antagonist in the planarian. *Psicofarmacología*, *235* (3), 829–836. <https://doi.org/10.1007/s00213-017-4801-8>
- 32) Napier, T. C., Herrold, A. A., & de Wit, H. (2013). Using conditioned place preference to identify relapse prevention medications. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, *37*(9 Pt A), 2081-2086. doi:10.1016/j.neubiorev.2013.05.002
- 33) Nesbit, M. O., Dias, C., & Phillips, A. G. (2017). The effects of d-gavadine on conditioned place preference with d-amphetamine or food reward. *Behavioural Brain Research*, *321*, 223-231. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.12.043>

- 34) Patel, D., Sundar, M., Lorenz, E., & Leong, K.-C. (2020). Oxytocin Attenuates Expression, but Not Acquisition, of Sucrose Conditioned Place Preference in Rats. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 14(231). doi:10.3389/fnbeh.2020.603232
- 35) Prus, A. J., James, J. R., & Rosecrans, J. A. (2009). Conditioned Place Preference. In (2nd ed.): CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL).
- 36) Risca, H. I., Zuarth-Gonzalez, J. D., & Baker, L. E. (2020). Conditioned place preference following concurrent treatment with 3, 4-methylenedioxypyrovalerone (MDPV) and methamphetamine in male and female Sprague-Dawley rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 198, 173032. doi:https://doi.org/10.1016/j.pbb.2020.173032
- 37) T.E. Robinson, K.C. Berridge (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Research Reviews*, 18, 247-291. doi: 10.1016/0165-0173(93)90013-P.
- 38) Russo, S. J., & Nestler, E. J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature reviews. Neuroscience*, 14(9), 609-625. doi:10.1038/nrn3381
- 39) Schifirneț, E., Bowen, S. E., & Borszcz, G. S. (2014). Separating analgesia from reward within the ventral tegmental area. *Neuroscience*, 263, 72-87. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.01.009
- 40) Serafini, R. A., Pryce, K. D., & Zachariou, V. (2020). The Mesolimbic Dopamine System in Chronic Pain and Associated Affective Comorbidities. *Biological psychiatry*, 87(1), 64-73. doi:10.1016/j.biopsych.2019.10.018
- 41) Tan, K. R., Yvon, C., Turiault, M., Mirzabekov, J. J., Doehner, J., Labouèbe, G., . . . Lüscher, C. (2012). GABA neurons of the VTA drive conditioned place aversion. *Neuron*, 73(6), 1173-1183. doi:10.1016/j.neuron.2012.02.015
- 42) Tomie, A. (1996). Locating reward cue at response manipulandum (CAM) induces symptoms of drug, abuse. *Neurosci Biobehav Rev*, 20(3), 505-535. doi:10.1016/0149-7634(95)00023-2
- 43) Tzschentke, T. M. (1998). Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Progress in Neurobiology*, 56(6), 613-672. doi:https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00060-4
- 44) Van Zessen, R., Phillips, J. L., Budygin, E. A., & Stuber, G. D. (2012). Activation of VTA GABA neurons disrupts reward consumption. *Neuron*, 73(6), 1184-1194. doi:10.1016/j.neuron.2012.02.016
- 45) Vassilev, P., Salim, M., Popescu, C., Flores, C., & Hernandez, G. (2020). Low-cost conditioned place preference setup including video recording and analysis of behaviour. *MethodsX*, 7, 100899. doi:https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.100899

- 46) Voigt, R. M., Herrold, A. A., Riddle, J. L., & Napier, T. C. (2011). Administration of GABA(B) receptor positive allosteric modulators inhibit the expression of previously established methamphetamine-induced conditioned place preference. *Behavioural Brain Research*, 216(1), 419-423. doi:10.1016/j.bbr.2010.08.034
- 47) Yeomans, J., & Baptista, M. (1997). Both Nicotinic and Muscarinic Receptors in Ventral Tegmental Area Contribute to Brain-Stimulation Reward. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 57(4), 915-921. doi:https://doi.org/10.1016/S0091-3057(96)00467-4
- 48) Zhai, H., Wu, P., Xu, C., Liu, Y., & Lu, L. (2008). Blockade of cue- and drug-induced reinstatement of morphine-induced conditioned place preference with intermittent sucrose intake. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 90(3), 404-408. doi:https://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.03.023