



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA FOCAL REPETITIVA COMO INTERVENCIÓN EN UN
MODELO DE CONSUMO DE ALCOHOL EN RATAS

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA:
ALEJANDRA LÓPEZ CASTRO

TUTOR
DR. EDUARDO ADRIÁN GARZA VILLARREAL
[INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. GERARDO ROJAS PILONI
[INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA](#)
DR. JORGE JUÁREZ GONZÁLEZ
[INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS, UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.](#)

JURIQUILLA, QUERÉTARO. JUNIO DE 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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dra. María Isabel Miranda Saucedo
Secretario: Dr. Eduardo Adrián Garza Villarreal
Vocal: Dr. Roberto Emmanuele Mercadillo Caballero
1er Suplente: Dr. José Gerardo Rojas Piloni
2do Suplente: Dr. Pavel Ernesto Rueda Orozco

Agradezco las recomendaciones y correcciones que enriquecieron esta tesis y su apoyo a lo largo del desarrollo del proyecto.

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Alejandra López Castro, cuyo título es: “Estimulación eléctrica focal repetitiva como intervención en un modelo de consumo de alcohol en ratas” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente:

Dra. María Isabel Miranda Saucedo

Secretario:

Dr. Eduardo Adrián Garza Villarreal.

Vocal:

Dr. Roberto Emmanuele Mercadillo Caballero

1er Suplente:

Dr. José Gerardo Rojas Piloni

2do Suplente:

Dr. Pavel Ernesto Rueda Orozco

Aprobado por el comité académico

Dra. Maricela Luna Muñoz

Coordinadora del programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología)

A mis papás

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada durante la maestría CVU 1003251.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y especialmente al Instituto de Neurobiología (INB) por permitirme cursar el posgrado de maestría en ciencias, bajo su estandarte. Había permanecido como un anhelo, ser parte de su comunidad estudiantil. Y me llena de orgullo pronunciar que ese anhelo es ahora tangible y muy apreciado por mí. También agradezco a los laboratorios que forman parte de la Red LANIREM, por generar una comunidad casi hermandad, a quienes se puede acudir por consejo profesional y personal. Hacen que “hacer ciencia”, a diferencia de lo que se supone, sea más cálido y agradable.

A la Unidad de Enseñanza especialmente a la Dra. Nuri Aranda.

A la Unidad de Análisis Conductual dirigida por la Dra. Deisy Gasca.

A la Unidad de Microscopía en especial a la asesoría de la Dra. Ericka de los Ríos.

Al Dr. Juan Ortiz, por la capacitación y siempre disposición para el correcto uso de la Unidad de Resonancia Magnética para especies pequeñas.

Al Laboratorio Universitario de Bioterio, especialmente al MVZ. José Martín García, Dra. Alejandra Castilla y la Dra. María A. Carbajo.

Al Dr. Eduardo Garza, por brindarme la oportunidad de ser parte del laboratorio. Agradezco muchas cosas, sin embargo, creo que la paciencia y la motivación que me has brindado es lo que me permitió seguir con el proyecto en esos tiempos que parecía perdido.

Al Dr. Gerardo Rojas Piloni por sus comentarios, observaciones y enseñanzas. Y por facilitar que pudieran ser ejecutadas las técnicas de experimentación, que, de otra forma, no hubieran sido posible. Al Dr. Rafael Olivares, por su asistencia y asesorías constantes.

A Diego, mi compañero de laboratorio, de quién admiro su compromiso de levantarse temprano de lunes a sábado. ¡No sé cómo lo haces!. Gracias por tu amistad.

Al Mtro. Luis Ángel Trujillo, por tener la paciencia de enseñarme y contestar mis preguntas a lo largo del proyecto.

Al resto de integrantes del laboratorio GarzaLab que tuve la fortuna de conocer y aquellos que encontré en la transmutación a PsiLantroLab.

A Neurokuni por ser un equipo increíble de divulgadores de ciencia, que me inspiran a seguir aprendiendo sobre este basto mundo de las neurociencias.

A Ana, por tu compañía, apoyo y amistad.

A Erika, Victor Hugo y Esbeydy, ustedes que, aunque lejos, me han acompañado en momentos de gran dificultad. Gracias por estar ahí para levantarme.

A mi familia, por su apoyo infinito e incondicional. Son el motor principal que me motiva a seguir buscando aquello que me hace feliz, por que sé que eso los hará felices también a ustedes.

Resumen

Aproximadamente 3 millones de personas murieron en 2016 en todo el mundo debido al trastorno por consumo de alcohol (AUD), que se define como: el consumo excesivo de alcohol que afecta la salud física y mental. Las intervenciones de neuromodulación, como la estimulación cerebral profunda (DBS) y la estimulación magnética transcraneal repetida (rTMS), son posibles nuevas terapias complementarias, que se proponen para tratar el AUD. Sin embargo, la información sobre el mecanismo de acción, los sitios de estimulación cerebral y los tipos de protocolos de estimulación, siguen siendo insuficientes. Este estudio tiene la finalidad de explorar el efecto de la estimulación eléctrica y focalizada de alta frecuencia, mediante electrodos de carbono implantados en un área esencial del sistema de recompensa, en este estudio se eligió la corteza prelímbica, en ratas que desarrollaron un consumo crónico de alcohol voluntario. Para esto, se utilizó el modelo preclínico de AUD de acceso intermitente de elección de dos botellas (IA2BC) al 20% de concentración en ratas wistar adultas jóvenes (P45) durante 20 sesiones, un periodo de abstinencia de 20 días, seguido de 10 sesiones más de exposición al alcohol. Posteriormente se aplicó un protocolo de estimulación de alta frecuencia (20 Hz) durante 10 días consecutivos a 100 pulsos (duración = 0.2 μ s intensidad = 400 μ A) en ocho ratas asignadas al azar, que se separaron en: 1) un grupo estimulación activa y 2) un grupo de estimulación simulada (sham). Finalmente se dividieron en grupos de consumidores altos y consumidores bajos, mediante el análisis de conglomerados jerárquico. Nuestros resultados indican que dos ratas de alto consumo que recibieron estimulación activa y una de alto consumo con estimulación simulada, redujeron el consumo de alcohol. Lo que sugiere que una intervención sobre la corteza prelímbica en ratas de alto consumo podría influir sobre la disminución del consumo crónico de alcohol.

Abstract

About 3 million people died in 2016 worldwide due to Alcohol Use Disorder (AUD) which is defined as: the excessive alcohol use that affects physical and mental health. Neuromodulation interventions, such as Deep Brain Stimulation (DBS) and repeated transcranial magnetic stimulation (rTMS), are proposed possible new complementary therapies to treat AUD. However, information about mechanism of action, optimal brain targets and types of stimulation protocols remain insufficient. This study aims to explore the effect of high-frequency electrical and focused stimulation by carbon electrodes implanted in an essential area of the reward system, in this study was chosen the prelimbic cortex, in subjects who developed chronic voluntary alcohol consumption. For this purpose, was established the two-bottle choice intermittent access AUD preclinical model (IA2BC) at 20% concentration is used in young adult wistar rats (P45) for 20 sessions, an abstinence period of 20 days, followed by 10 sessions where is performance the stimulation protocol. Subsequently, a high frequency stimulation protocol (20 Hz) is replicated for 10 consecutive days at 100 pulses (duration = 0.2 μ s intensity = 400 μ A) in eight randomized rats, who were separated into: 1) an active stimulation group and 2) a group of simulated stimulation (sham). Finally, they were divided into groups of high-intake and low-intake, through hierarchical cluster analysis. Our results indicate that two high-intake rats who received active stimulation and one high-intake rat with sham stimulation reduced their alcohol consumption. This suggests that an intervention on the prelimbic cortex in high-intakers rats could influence the decrease in chronic alcohol consumption.

Índice

| | |
|-----------------------------------|----|
| Agradecimientos | 5 |
| Resumen | 7 |
| Abstract | 8 |
| 1. Introducción..... | 10 |
| 2. Antecedentes | 11 |
| 3. Justificación..... | 27 |
| 4. Pregunta de investigación..... | 27 |
| 5. Hipótesis | 28 |
| 6. Objetivos | 28 |
| 7. Sujetos y materiales..... | 28 |
| 8. Métodos | 29 |
| 9. Resultados | 46 |
| 10. Discusión..... | 56 |
| 11. Conclusión | 61 |
| 12. Referencias | 62 |
| Anexos | 71 |

1. Introducción

El trastorno de adicción es un problema de salud pública que compromete la integridad física, social, familiar y mental de la persona que las padecen (Leshner, A. 1997). En México el uso de alcohol y los trastornos acompañantes son el principal problema en materia de adicciones (ENCODAT 2016-2017). A nivel mundial según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2018 tres millones de muertes y morbilidades anuales se le atribuyen al uso de alcohol.

De acuerdo con el DSM-V (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders; manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales quinta edición, por sus siglas en inglés) las personas con mayor predisposición a desarrollar trastornos por consumo de sustancias cuentan con alteraciones en los mecanismos para la inhibición cerebral. Estas podrían ser debidas a procesos homeostáticos adaptativos celulares y de los circuitos neuronales estimulados que también se presentan producto del consumo crónico de alcohol (Nestler y Aghajanian, 1997). Dichos cambios persisten después del retiro de la sustancia y según la revisión de McLellan y cols., (2000) del 40 al 60 por ciento de las personas que son tratadas debido a un trastorno de dependencia por uso de sustancias, sufren una recaída antes del primer año de seguimiento después del alta. Es por lo anterior que un tratamiento complementario a las aproximaciones farmacológicas y psicoterapéuticas es necesario.

Una de las propuestas es utilizar técnicas de neuromodulación, en el supuesto de modificar la activación neuronal por medio de campos magnéticos inducidos por señales interneuronales o de corriente aplicada externamente, mediante el principio de inducción electromagnética (Vöröslakos y cols., 2008). Respecto a los tratamientos de padecimientos neuropsiquiátricos en donde se contemplan las adicciones, Food and Drug Administration (FDA) en 2017 aprobó el uso de la estimulación magnética transcraneal repetitiva (rTMS) como opción terapéutica para el trastorno depresivo mayor. Aún cuando existen investigaciones activas como tratamiento para el trastorno de adicción, falta conocimiento sobre el mecanismo de acción de la técnica no invasiva.

La información obtenida de los modelos animales nos permite identificar mecanismos patológicos y blancos terapéuticos. Un modelo animal de consumo voluntario basado en los criterios del DSM V ofrece una validez translacional a la clínica en humanos, donde se asume que el comportamiento de consumo voluntaria de drogas parte de los mismos substratos neuroquímicos y neuroanatómicos en ambas especies (Spanagel, R. 2017).

La imagen por resonancia magnética (MRI) es un método no invasivo útil para comprender los cambios funcionales y estructurales, cuya información nos ayuda a realizar análisis respecto a las modificaciones de la sustancia gris y blanca por el uso de alcohol, así como los resultados de las técnicas de estimulación.

En este proyecto proponemos estandarizar un modelo de consumo de alcohol voluntario crónico en ratas wistar. Asimismo, exploramos si el consumo de alcohol se modifica por la estimulación eléctrica de la corteza prelímbica, utilizando electrodos compatibles con resonancia magnética. Esto permitirá utilizar dicho modelo para analizar los mecanismos involucrados en los efectos observados en humanos con estimulación magnética transcraneal y que permita reforzar la propuesta de utilizar esta estrategia como opción terapéutica en los trastornos por uso de sustancias que llevan a la adicción.

2. Antecedentes

2.1 Neurobiología de la adicción

Se define como droga a una sustancia única que, al ser ingerida o introducida al cuerpo por otro medio, produce un efecto fisiológico, farmacológico o algún cambio en el cuerpo. (Wrase y cols., 2002). Esta droga puede desarrollar adicción, que es una dependencia patológica o compulsión para continuar consumiendo la sustancia con incapacidad para limitar su uso a pesar de las consecuencias (Bell, S. 2012). El consumo de drogas es un fenómeno de etiología multifactorial que involucra el tipo de droga que se consume, la genética, el neurodesarrollo y factores psicosociales (Volkow, N. 2000). La transición del consumo exploratorio a la

adicción sucede cuando la persona ha perdido la habilidad de sobreponerse a la urgencia de tomar la droga, a pesar de reconocer que no desea consumirla y es consciente de las posibles consecuencias negativas del acto.

La postura actual manifiesta que esta transición se debe a alteraciones en circuitos cerebrales en los que se incluyen los encargados de condicionamiento, sensibilidad a la recompensa, motivación incentivada, auto-regulación, estado de ánimo e interocepción (Volkow y cols., 2019). Y como resultado de las interacciones de estos circuitos se propone conceptualizar la adicción en un ciclo cerrado que engloba tres estados que incluyen: atracón/intoxicación, abstinencia/efectos negativos y preocupación/anticipación (Koob y Volkow, 2016).

El sistema dopaminérgico media funciones de neuromodulación en la motivación, función cognitiva, control motor, y en el sistema de recompensa. El neurotransmisor monoaminérgico dopamina (DA) y sus receptores D1R, D2R, median fenómenos implicados en cada uno de los circuitos mencionados anteriormente y que retomaré más adelante. Por las estructuras y propiedades farmacológicas de los receptores se subdividen en dos grandes grupos: los receptores D1R que incluyen a los D1 y D5, y los receptores D2R que incluyen a los D2, D3 y D4. Los D1R se encuentran en el cuerpo estriado, sustancia nigra pars reticulata, bulbo olfatorio, amígdala y la corteza prefrontal (PFC). Los D2R se encuentran en el estriado, área tegmental ventral (VTA), hipotálamo, amígdala, hipocampo e hipófisis. Por otro lado, los niveles extracelulares de DA son regulados por transmisión fásica y tónica. La primera libera DA por potenciales de acción, rápidamente de las vesículas contenedoras en el VTA, a una frecuencia de disparo mayor a 15 Hz. La transmisión tónica resulta cuando la liberación de dopamina es independiente de los potenciales de acción, en VTA la frecuencia de disparo de esta transmisión ocurre en 1 a 8 Hz. Se reconoce que las drogas mimetizan la transmisión fásica (Owesson-White y cols., 2009) y por lo tanto existe una liberación rápida de DA en VTA dependiente de potenciales de acción a una frecuencia mayor a 15 Hz. Dopamina no es el único neurotransmisor involucrado en los circuitos, ni en los fenómenos que se describen más adelante, sin embargo, se utiliza para establecer las relaciones con las áreas pertenecientes a los ciclos, sistemas y

circuitos, pues es el neurotransmisor hasta la fecha mayormente estudiado en la adicción.

2.1.1. Condicionamiento

Skinner en 1937 propuso dos tipos de condicionamientos: Tipo S y Tipo R. En el primero el reforzamiento siempre está relacionado con la presentación de un estímulo. Y el Tipo R, implica una relación entre reforzamiento y respuesta específica (Keller, Schoenfeld y Daurella., 1979). El condicionamiento clásico es el mecanismo más simple mediante el cual los organismos aprendemos sobre las relaciones entre los eventos (Domjan, M., 2010). Respecto al condicionamiento a las sustancias, se describe como el aumento en la sensibilidad a la expectativa de los efectos recompensantes de la droga, que se desarrollan a merced de la adición de estímulos relacionados al consumo. Tanto la exposición a los estímulos como el consumo mismo, ocasiona la liberación de DA en el núcleo accumbens (NAc) que se encuentra en la porción ventral del cuerpo estriado (Berlin y cols, 2009). El NAc es una estructura que pertenece a los ganglios basales, donde se ha descrito que existen las vías directa e indirecta que clásicamente facilitan e inhiben el movimiento, pero también median funciones de recompensa (directa) y motivación (indirecta) (Kravitz y cols., 2012).

2.1.2. Motivación y recompensa

Reducción en la sensibilidad del circuito dopaminérgico de recompensa al actual consumo de la droga que se extiende a las recompensas no relacionadas a las drogas, que contribuye a la falta de interés en actividades que no se asocian a las drogas. En estudios de neuroimagen en individuos con adicción, se encontró disminuida la presencia de receptores D2 y liberación de DA en el estriado ventral y dorsal, así como reducción en la reactividad de regiones prefrontales hacia reforzadores negativos (Dunn y cols., 2012). Lo que podría explicar la disminución de la respuesta a los estímulos recompensantes naturales y la capacidad de disuadir con desenlaces negativos como la pérdida de empleo o familia.

2.1.3. Auto-regulación

En este se incluye la incapacidad para evadir riesgos, comportamientos autodestructivos, resistir a tentaciones y retrasar la obtención de recompensas, lo que aumenta la vulnerabilidad a desarrollar una adicción (Volkow y Fowler, 2000). En estudios de imagen en roedores y humanos con adicción se encontró que la regulación a la baja de los receptores D2R se relacionaba con la reducción de la actividad metabólica basal en las regiones prefrontales que incluyen la corteza orbitofrontal (OFC) involucrada en la atribución de saliencia, corteza anterior del cíngulo (ACC) implicada en la regulación emocional y dorsolateral prefrontal (DLPFC) que desempeña un papel primordial en la toma de decisiones. Se propone que el trastorno por uso de alcohol altera las funciones cognitivas y conductuales de las regiones prefrontales que son mediadas por el neurotransmisor glutamato (Mishra, Harrison y Konradsson-Geuken, 2015; Nimitvilai y col., 2017).

2.1.4. Ánimo negativo y reactividad al estrés

Este fenómeno es mayormente observado durante la abstinencia, en el que se caracteriza la búsqueda del estímulo recompensante para evitar los síntomas negativos como el distress o las emociones negativas. El primero está relacionado con la reducida señalización de DA y con el aumento en la sensibilidad en el sistema de estrés el cual yace en eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA). Por lo que podemos relacionar al eje como fundamental en el desarrollo de la conducta de búsqueda a la droga (Mantsch y cols., 2016).

2.1.5. Conciencia Interoceptiva

La interocepción es la capacidad de censar el estado fisiológico interno a partir de información emocional y motivacional. Las cortezas implicadas en su procesamiento son la ínsula, ACC, la corteza ventromedial prefrontal (vmPFC) así como el estriado ventral (Paulus y cols., 2009) y el precuneo, cuya acción particular se basa en la percepción de estímulos ambientales o mejor conocida como exterocepción (DeWitt y cols., 2015). A partir de estudios de neuroimagen y

particularmente resonancia magnética funcional (fMRI) y del análisis de la señal BOLD (Blood Oxygen Level Dependent, por sus siglas en inglés) la cual se utiliza para medir la actividad cerebral de forma indirecta (Poldrack y Nichols, 2011), se encontró que la DA modula el reclutamiento de la red de activación por defecto (DMN, Default Mode Network) esta se cree involucrada en la autoconsciencia y el pensamiento no relacionado a tareas (Raichle y col., 2001). De manera que en el trastorno de adicción se propone, existe activación aumentada de la DMN, mediada por el estímulo dopaminérgico, y este puede redireccionar la atención al estado interno de disconfort o anhelo compulsivo (Zhang y Volkow, 2019).

2.1.6. El sistema mesocorticolímbico

El sistema mesocorticolímbico se conforma de un conjunto de neurocircuitos que incluyen el sistema de la amígdala, PFC, NAc y VTA (Schmidt y Reith, 2005). El PFC en su porción media recibe aferencias de glutamato, acetilcolina (ACh) y DA, y eferencias glutamatérgicas a otras áreas del circuito mesocorticolímbico, entre ellas la amígdala que a su vez se conecta con el VTA y NAc. El VTA proyecta eferencias dopaminérgicas a NAc, amígdala y mPFC. El NAc recibe aferencias glutamatérgicas de mPFC y amígdala, con eferencias GABAérgicas a VTA y amígdala. Las neuronas GABAérgicas en VTA exhiben disparos sostenidos a frecuencias de ~60 Hz (Steffensen y cols., 1998; Cohen y cols., 2012). La exposición repetida al alcohol se asocia a disminución de inhibición GABA en las neuronas dopaminérgicas (Brodie, M. 2002). Así también el modelo intermitente de toma de alcohol decrementa la regulación GABAérgica del glutamato en el cuerpo estriado dorsolateral (Adermark y cols., 2011). Retomando las aferencias y eferencias glutamatérgicas, existen receptores metabotrópicos glutamatérgicos (mGluRs) en la amígdala, BNST, corteza prefrontal, hipocampo, NAc, VTA, regiones hipotalámicas y talámicas cuya mención es importante pues junto con los receptores ionotrópicos (AMPA y NMDA) median procesos de aprendizaje y memoria por la plasticidad sináptica de los procesos de potenciación a largo plazo (LTP) y depresión a largo plazo (LTD) (Johnston, M. 2004). Estos dos procesos se han relacionado con el desarrollo de la conducta motivante a la búsqueda de la

droga. En un estudio de estimulación por optogenética de Ma y cols. (2018) encontraron que al inducir LTP con una frecuencia mayor a 50 Hz por 2 segundos, se incrementó un efecto a largo plazo en cuanto a un comportamiento de búsqueda de alcohol. Mientras que el protocolo para inducir LTD decreta este comportamiento.

2.2. Neurobiología del uso de alcohol

El término adicción se utilizó por primera vez a principios del siglo XX, dicho término se asociaba a la dependencia a sustancias no aceptadas socialmente, por lo que se le atribuyen connotaciones morales negativas, aunque ya describe la capacidad de las drogas de producir deseo, tolerancia y abstinencia (Goodman A., 1990). Por la misma época, se describió a la dependencia como un conjunto de conductas encaminadas al uso de una sustancia y de mayor saliencia respecto a otras. La propuesta actual en el DSM V es denominar trastornos por uso de sustancias (SUD, por sus siglas en inglés) al padecimiento que engloba los términos que abordamos. Dentro de los SUD encontramos al trastorno por uso de alcohol (AUD), este se caracteriza por el consumo de bebidas alcohólicas que conlleva a un deterioro o malestar significativo en un plazo de 12 meses (DSM V). En donde aparecen al menos dos de los siguientes procesos:

- Frecuentes episodios de intoxicación
- Preocupación por el consumo
- Uso a pesar de las consecuencias
- Compulsión a la búsqueda
- Pérdida de control al consumo
- Estado emocional negativo en la ausencia del alcohol

El trastorno por uso de alcohol se puede analizar desde el contexto de la propuesta de tres estados de la adicción (Koob y Volkow, 2016), con la particularidad que es un reforzamiento negativo el que perpetúa la toma de alcohol hasta desarrollar un trastorno. (Noronha y cols., 2014). De manera que la respuesta

al consumo aumenta al remover los estímulos negativos, por ejemplo: el dolor o los estados negativos que aparecen al retirar la sustancia.

2.2.1. Atracón/intoxicación

Una propuesta para definir al atracón (*binge*) en humanos, es como la toma de alcohol que eleva la concentración en sangre hasta 0.08% gramos o más, en hombres adultos equivale a consumir 5 vasos y en mujeres 4 vasos (1 vaso = 14 gr de concentración etílica) en aproximadamente 2 horas según el *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* (NIAAA, 2004). Aunque una forma más práctica en la actualidad es considerar al atracón como: la intención de intoxicarse con alcohol en un corto periodo de tiempo (Crabbe y cols., 2011). Los modelos preclínicos de toma en atracón en animales como el “acceso intermitente a dos botellas” (IA2BC), permiten valorar longitudinalmente: la toma compulsiva de alcohol, el fenómeno de tolerancia y abstinencia similar a los observado en humanos (Crabbe y cols., 2011). Es importante recalcar que en los modelos de roedores el parámetro de atracón depende de la cepa, la concentración del alcohol y el horario de la colocación de las botellas. Para la rata wistar, por ejemplo, se encontró que mantiene un consumo aproximado de 4.5 g/kg/24hrs después de un proceso de abstinencia de una semana (Sinclair y Li, 1989). De manera general en este estado se ubica el proceso de condicionamiento, así como el de motivación y recompensa.

2.2.2. Abstinencia/efectos negativos

En este estado se encuentra involucrado el sistema que engloba a la amígdala, compuesta por el núcleo basal de la estría terminal (BNST) y la zona de transición medial del NAc, como sustrato de procesamiento de excitación y estrés para producir los estados emocionales negativos que finalmente promueven el reforzamiento negativo y posteriormente la adicción al alcohol por medio de la alteración de la mediación glutamatérgica (Kallupi y cols., 2014; McCool y cols., 2010)

2.2.3. Preocupación/anticipación.

Este estado es clave para definir al trastorno por uso de alcohol como un padecimiento crónico, también se le atribuye esencial para entender el término *craving*, o el anhelo compulsivo para consumir alcohol. Las estructuras que se han relacionado a este estado son la corteza medial prefrontal, NAc, y núcleo pálido ventral cuyo neurotransmisor es el glutamato (Koob y Volkow, 2016).

2.2.4. Efectos del alcohol en el sistema mesocorticolímbico

Las alteraciones en el sistema mesocorticolímbico derivadas del trastorno por uso de alcohol resultan en el compromiso de la habilidad para evaluar los riesgos y recompensas relacionados al consumo (Bell y cols., 2006). Un estudio de autoadministración de alcohol en ratas en donde se administraban a VTA y NAc reveló alteración en los niveles de glutamato en ambas regiones (Alshehri y Sari, 2016). También se han encontrado alteraciones en la plasticidad sináptica asociada al receptor NMDA en el cuerpo estriado, amígdala e hipocampo (Möykkynen y Korpi, 2012). La amígdala regula los estados emocionales con la toma aguda y crónica de alcohol alterando la mediación glutamatérgica en estos procesos (Kallupi y cols., 2014). El hipocampo y la corteza prefrontal medial (mPFC) son dos estructuras que se encuentran altamente interconectadas ya que ambas participan en el adecuado funcionamiento de la memoria de trabajo espacial (Noronha y cols., 2014). En los roedores son frecuentemente utilizadas las tareas de memoria espacial en correspondencia con la memoria de trabajo en los humanos, donde los roedores deben usar la memoria de un lugar recientemente visitado para guiar su toma de decisiones (Dudchenko, P. 2004). Estudios en humanos y otros animales con exposición crónica al alcohol, apoyan que ésta puede causar cambios patológicos en los circuitos que involucran a PFC y por lo tanto comprometer la habilidad para el procesamiento de información y la toma de decisiones, especialmente en periodos de alta demanda cognitiva. (Chanraud y cols., 2010). La activación de las neuronas GABA en VTA altera directamente la actividad de las neuronas DA en el mismo núcleo y en el NAc (Zessen y cols., 2012) que se relacionan con conductas de recompensa y motivación. Entonces la activación

puede inducir un comportamiento tipo anhedonia que resulta en aversión y reducción de los comportamientos motivantes a la búsqueda a la droga a través también de la inhibición de las neuronas DA (Ungless y cols., 2010).

La activación de GABA también puede desencadenar una conducta de aversión al condicionamiento de lugar (Tan y cols., 2012) que es importante considerar por los posibles resultados en nuestras pruebas de comportamiento.

2.2.5. Modelos para el estudio del trastorno por uso de alcohol

Los modelos con otras especies animales para estudiar los trastornos por uso de sustancias, como el alcohol, basan su validez en que se comparte los sustratos neuroquímicos y neuroanatómicos presentes en los humanos. Una de las evidencias de estudio en otras especies, son las intervenciones de terapia farmacológica para el trastorno por uso de alcohol, cuyos hallazgos se trasladaron a la clínica médica humana. (Spanagel, R. 2017). Lester y Freed (1973) y posteriormente McBride y Li (1998) proponen criterios para considerar a un modelo de consumo crónico de alcohol en otras especies no humanas, y son los siguientes:

- 1) Autoadministración oral de alcohol bajo condiciones de libre elección.
- 2) La cantidad de alcohol consumido debe conducir a concentraciones farmacológicamente relevantes de alcohol en sangre (BAC).
- 3) El alcohol debe reforzarse positivamente de modo que el animal trabaje para el acceso.
- 4) Se debe autoadministrar por sus efectos farmacológicos postingesta.
- 5) El consumo crónico conduce a una tolerancia metabólica y funcional.
- 6) Tras el retiro de la sustancia aparecerán signos físicos de abstinencia.
- 7) Después del consumo crónico seguido por un estado prolongado de privación, se mostrará un comportamiento que se asocie a recaída.

En las propuestas de modelos que puedan cumplir con los criterios antes expuestos, se han diseñado varias intervenciones, siendo uno de los mayores retos el mimetizar la transición de consumo bajo, moderado a excesivo y crónico (Carnicella, Ron y Barak., 2014). Así mismo la propuesta de Koob, G., (2016) describe al abuso de alcohol como

un ciclo cerrado de intoxicación, retiro, anhelo al consumo o ansias y recaída. Los procedimientos de toma de alcohol desarrollados durante los años 70's (Wayner y cols., 1972; Wise, 1973) mostraron que ciclos repetidos de elección de consumo de alcohol y un periodo de retiro de este, conduce a un escalamiento del consumo de alcohol. En relación con el cumplimiento de los criterios, el consumo libre y cíclico permite el cumplimiento de los 1, 4, 5, 6. En el estudio de Simms y cols., (2008) y Carnicella y cols., (2009) delimitaron que el consumo que tenían las ratas en los primeros treinta minutos de exposición al alcohol, se manifestaba en la concentración en sangre de > 80 mg% que corresponde al criterio deL National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) para intoxicación aguda o toma en atracón., cumpliendo con el criterio 2.

2.3. Tratamiento farmacológico del trastorno por uso de alcohol

En la revisión de McLellan y cols., (2000) del 40 al 60 por ciento de las personas que son tratadas debido a un trastorno por uso de sustancias, sufren una recaída antes del primer año de seguimiento después del alta. El tratamiento actual se conforma de psicoterapia y psicofarmacología. Actualmente se encuentra en estudio el uso de antidepresivos, estabilizadores del ánimo, anticonvulsivos, bloqueadores alfa adrenérgicos, antipsicóticos y ansiolíticos (Jonas y cols., 2014). Sin embargo, son tres los fármacos aprobados por la FDA y son los siguientes:

Acamprosato - Modula la hiperactividad de los receptores glutamatérgicos NMDA.

Disulfiram - Inhibe al aldehído deshidrogenasa (ALDH2) lo que provoca acumulación de acetaldehído durante el consumo de alcohol.

Naltrexona - Antagonista de los receptores opioides, se acopla competitivamente a los receptores opioides bloqueando los efectos de los opioides endógenos como la β endorfina.

El blanco terapéutico de los fármacos considera algunos de los principios neurobiológicos que abordamos. Es de esperar que fueran eficaces por tal motivo, sin embargo, no presentan un beneficio mantenido a largo plazo por lo que se ha

vuelto una necesidad imperante un complemento terapéutico, como aquellos derivados de la neuromodulación.

2.4. Neuromodulación

Según la asociación internacional de neuromodulación (INS, por sus siglas en inglés) se define como un campo de la ciencia, medicina y bioingeniería con tecnologías implantables y no implantables, eléctricas o químicas, con el propósito de mejorar la calidad de vida y funcionamiento de los humanos (Sakas y cols., 2007). Holsheimer (2003) propone que para que una terapia se considere neuromoduladora, debe de cumplir con las siguientes características:

1. La terapia debe ser dinámica, continua o intermitente, y no un procedimiento corto o no recurrente.
2. La actividad de las redes neuronales se afectará por la estimulación eléctrica continua o por la estimulación neurofarmacológica continua.
3. El efecto clínico es constantemente controlable por la variación de uno o más parámetros de estimulación y esto a su vez por la necesidad de cada paciente.

Un término derivado es la neuroestimulación, que es el proceso o tecnología que aplica corrientes eléctricas en una variedad de parámetros, a través de electrodos implantados o no, para lograr una activación o inhibición funcional de un grupo de neuronas, vías o circuitos (Krames y cols., 2009). Aún cuando existen variaciones en los parámetros de estimulación y por tal motivo adquieran una modificación en su nombre, las técnicas principales son: estimulación magnética transcraneal (TMS), estimulación transcraneal de corriente directa (tDCS), estimulación del nervio vago (VNS) y la estimulación cerebral profunda (DBS) (Klooster y cols., 2016).

Actualmente están aprobados por la FDA la terapia con TMS para el tratamiento complementario para la depresión mayor, migraña y dentro de los TUS para el tratamiento del trastorno por uso de nicotina. VNS para epilepsia y depresión

resistente a fármacos. Y DBS para temblor esencial, distonía, desorden compulsivo obsesivo y enfermedad de Parkinson (Edwards y cols., 2017). En los puntos que siguen, se describirá partiendo desde lo general los mecanismos propuestos de la neuromodulación y los hallazgos encontrados en la investigación en los trastornos por uso de sustancias.

2.4.1. Mecanismo de acción de la neuroestimulación

En el estudio de Olds y Milner., (1954) concluyeron que la estimulación eléctrica en regiones cerebrales en ratas, producían un efecto en las adquisición y extinción en la asociación a los estímulos relacionados a la recompensa. Y aunque han pasado más de cincuenta años desde esos experimentos, en la actualidad no existe un consenso general sobre el mecanismo de acción de la neuroestimulación, más sí varias propuestas al respecto. En la revisión de Arango y Espinosa (2007) realizaron una síntesis de estudios en animales no humanos, donde se encontró que la estimulación de alta frecuencia tenía efectos diferentes según el área de una neurona estimulada. Al estimular el soma, se altera el metabolismo y disminuye la producción de neurotransmisores. En el axón, se describió un efecto de interferencia donde se sugiere que existe una producción mayor de GABA, por lo que se facilita el efecto inhibitorio que generalmente media este neurotransmisor. Y por último encontraron que se puede modificar la síntesis de proteínas a distancia, por ejemplo, del transportador de dopamina, facilitando los efectos que revisamos media DA en los núcleos y circuitos.

Los efectos a largo plazo en la actividad neuronal dependen de los parámetros de estimulación de la secuencia de pulsos de la estimulación. Oberman, L. (2014) sugiere que altas frecuencias de 5 a 25 Hz tienen un efecto facilitador con un fenómeno tipo LTP, mientras que las bajas frecuencias ~ 1 Hz reducen la excitabilidad con un fenómeno tipo LTD. También el estado de la actividad cortical basal adquiere un papel importante por la interacción que tiene con los estímulos externos de la estimulación. Con base en lo anterior los efectos en la conducta generados por TMS podrían ser debidos a estados dependientes de la actividad cortical antes y después de la estimulación (Diana y cols, 2017).

La intensidad de la estimulación es uno de los factores de mayor importancia, si la intensidad es insuficiente no tendrá efecto y si esta es de gran magnitud puede provocar que todo tipo de neuronas disparen indiferentemente (Klooster y cols., 2015). Es también relevante, considerar el umbral de disparo de las poblaciones neuronales involucradas en el área de estimulación por los efectos *in situ* de la estimulación *per se*. Cuando la intensidad de la estimulación aumenta, las interneuronas y las neuronas de la capa II son activadas, pudiendo progresar el estímulo trans sinápticamente a la capa V de neuronas piramidales, a través de un mecanismo indirecto (I). Aumentando aún más la intensidad, las neuronas piramidales son activadas a través del cono axónico o el cuerpo del axón a través de mecanismos directos (D) (Diana y col., 2017). Usualmente se utiliza la intensidad de 300 mA a 600 mA (Temel y col., 2004) para obtener los efectos de los mecanismos directo e indirecto.

El efecto secundario de la estimulación se basa en la liberación de neurotransmisor y de la estimulación de las células piramidales en el sitio primario de estimulación y por propagación antidrómica. Estas áreas secundarias de estimulación presentan frecuentemente cambios plásticos de largo plazo (Bashir y cols., 2011).

2.4.2. Efectos de la neuroestimulación en trastornos por uso de sustancias

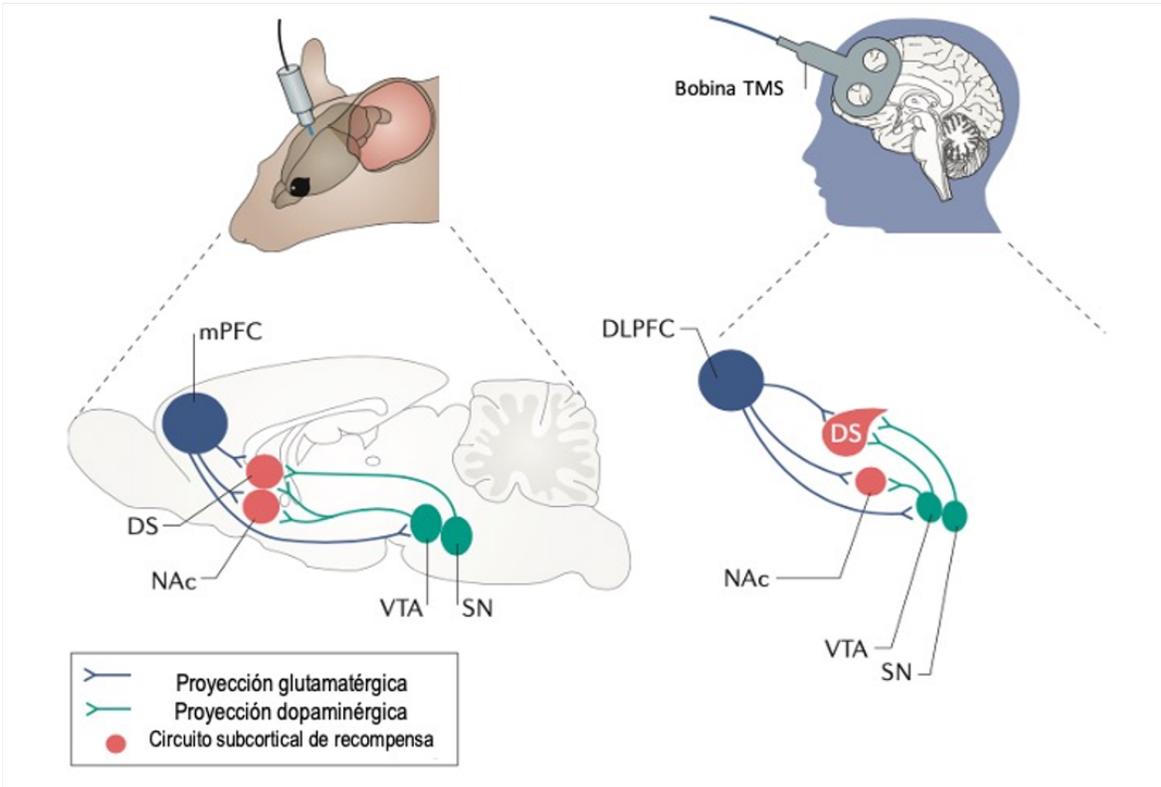
Actualmente, la TMS es la única técnica de neuroestimulación que ha sido aprobada para tratamiento complementario del trastorno por uso de nicotina, dentro de los trastornos por uso de sustancias. Sin embargo, los protocolos de estudios que aplican las técnicas con fines exploratorios y terapéuticos han incrementado a través de los años.

Se encontró que la estimulación eléctrica en áreas relacionadas a la recompensa activa fuertemente al sistema mesocorticolímbico, causando elevación dopaminérgica e incremento en la actividad neuronal en NAc y VTA, ambos mediados por las inervaciones de las vías glutamatérgicas (Noronha y cols., 2014). Según lo abordado en la descripción del sistema, la exposición repetida al alcohol se asocia a disminución de inhibición GABA en las neuronas dopaminérgicas

(Brodie, M. 2002) y decreta la regulación GABAérgica del glutamato en el cuerpo estriado dorsolateral (Adermark y cols., 2011) por lo que también se espera un incremento en la disponibilidad de dopamina y glutamato, pero sólo en el consumo agudo, ya que en el consumo crónico la disponibilidad de DA disminuye (Volkow, N., 2019).

Un área fundamental de los circuitos frontoestriales y mesolímbicos es la corteza prefrontal (PFC). También es el lugar más habitual de colocación de la bobina en TMS para el tratamiento de trastornos neuropsiquiátricos; estos circuitos están implicados en comportamientos de recompensa y motivación (Koob y cols., 2013). Particularmente, la estimulación magnética transcraneal repetitiva (rTMS) sobre los circuitos de recompensa, pueden tanto sensibilizar como desensibilizar respuestas relacionadas con el abuso de drogas. Addolorato y cols., (2017) emplearon rTMS profunda en áreas de la corteza dorsolateral prefrontal (DLPC) en humanos con trastorno por uso de alcohol, y encontraron reducción en la toma de alcohol y aumento en el número de días de abstinencia. Ferenczi y cols., (2016) compara dos técnicas de estimulación (Figura 1), la optogenética y la TMS, en donde estimuló las áreas análogas en humanos DLPFC y en ratas mPFC o lóbulo prelímbico (PL) (Paxinos y Watson 2007), el resultado en ambas especies fue la disminución de la búsqueda compulsiva de cocaína. Por otro lado, la estimulación hipocámpal reinstala la autoadministración de cocaína en ratas (Vorel. y cols., 2001). Y la estimulación hipotalámica disminuye los niveles de GluR1 en el VTA (Carlezon y cols., 2001) al contrario de la acción misma de la cocaína que incrementa los niveles de GluR1 en el VTA (Lu y cols., 2003).

Figura 1. Circuito subcortical de recompensa en ratas y humanos.



Comparación de las áreas análogas a en el sistema mesolímbico en la rata y humano. (Adaptada de Ferenczi y col., 2016). La bobina de estimulación de TMS se coloca en una zona donde se estimula DLPC. Esta área a través de proyecciones glutamatérgicas, se comunica con NAc y DS, estas últimas se consideran el circuito subcortical de recompensa. Que también se comunica a través de proyecciones dopaminérgicas con VTA y SN. A la izquierda se muestran las áreas análogas en roedores, que se estudiaron a través de la técnica de optogenética.

Otra modalidad de la estimulación eléctrica, que se ha aplicado para valorar su eficacia en el trastorno por consumo de alcohol, es la DBS. Esta técnica requiere de una cirugía para la implantación de electrodos de estimulación, y se ha utilizado eficazmente para el tratamiento de trastornos del movimiento y enfermedad de Parkinson (Wichmann y Delong 2006). También se propone como tratamiento alternativo complementario a distintos trastornos neuropsiquiátricos como los trastornos por uso de sustancias (Lozano y Lipsman., 2013). Laxton y cols., (2010) proponen que la eficacia terapéutica se acompaña de remodelación neuroanatómica, es decir, cambios en las estructuras cerebrales como la vasculatura, densidad sináptica o neuronal. Por ejemplo, en el estudio de Sankar y cols., (2014) se encontró que, en dos pacientes con diagnóstico de enfermedad de

Alzheimer, que se trataron con DBS sobre el fórnix, presentaron un aumento del volumen del hipocampo y mejoría clínica, que proponen se debió a la generación de nuevas y funcionales neuronas hipocampales.

Así mismo, en el estudio de Chakravarty y cols., (2016) se implantaron electrodos para la estimulación profunda de la corteza prefrontal ventromedial, con la finalidad de explorar el efecto de la implantación y estimulación/simulación (sham) en ratones de 8 a 9 semanas de edad. Encontraron que, tanto en la estimulación activa como en la simulada, existieron cambios al nivel de las conexiones sinápticas. A la estimulación activa se reveló un remodelamiento de la estructura de la vasculatura, de manera que el diámetro de los vasos aumentó. También encontró aumento de volumen en los sujetos que recibieron la estimulación, suponen que el reordenamiento neuroanatómico ocurre también en sitios alejados pero conectados en redes a través de múltiples sinapsis (Stone y cols., 2011).

En un reporte de caso en el que se implantaron electrodos para la estimulación profunda en NAc, con la finalidad terapéutica de tratamiento de trastorno depresivo mayor y con una comorbilidad secundaria de trastorno por uso de alcohol, se encontró que la persona presentó mejoría en la comorbilidad secundaria más no en sus síntomas depresivos (Kuhn y cols., 2007). En el estudio voluntario de Voges y cols., (2013) de cinco pacientes con trastorno por uso de alcohol, se estimuló de manera bilateral a NAc con DBS encontrando mejoría en las ansias por consumir en todos los pacientes y en dos de ellos una abstinencia superior a cuatro años de seguimiento.

Levy y cols., (2007) postularon que la estimulación eléctrica intracraneal repetitiva (ICES), que es como llamaron a su estimulación cortical con electrodos implantados, sobre áreas relacionadas al circuito de recompensa en ratas macho Sprague Dawley entre los 250-350 gr, disminuiría el reforzamiento, búsqueda y consumo de cocaína. Las áreas elegidas fueron hipotálamo lateral (LH) y PFC según Paxinos y Watson (1998). En el protocolo de estimulación utilizaron frecuencias altas de 100 Hz y 20 Hz, esta segunda comúnmente utilizada en TMS en humanos, sin encontrar diferencias significativas en el uso de una sobre la otra.

Respecto al consumo de cocaína, encontraron que al estimular la PFC revierten la sensibilización psicomotora, y disminuye la autoadministración y búsqueda de cocaína.

Por la evidencia consultada, NAc y PFC (PL o mPFC en ratas) (Laubach y cols., 2018) son áreas que prometen ser blancos terapéuticos para los trastornos por uso de sustancias.

Por los antecedentes descritos, la propuesta de este estudio radica en estimular eléctricamente y focalizada un área esencial del sistema de recompensa, elegida la corteza prelímbica, con el supuesto de generar un efecto sobre el consumo de alcohol en un modelo crónico a libre elección.

3. Justificación

Las indicaciones de las terapias de neuromodulación por estimulación eléctrica en general son limitadas por la falta de consenso general a los efectos que genera. Actualmente se utilizan como terapia complementaria en diversos trastornos neuropsiquiátricos. En el trastorno por uso de alcohol no se ha implementado la neuromodulación como terapia complementaria. Es así como, en este trabajo se planteó explorar si disminuye el consumo de alcohol crónico en un modelo preclínico al estimular un área fundamental del circuito mesocorticolímbico en un modelo, con la finalidad de aportar evidencia a la opción terapéutica que conlleva al establecimiento de esta como opción terapéutica en la clínica.

4. Pregunta de investigación

Si uno de los componentes del trastorno por uso de alcohol es el procesamiento inadecuado de la recompensa ¿Estimular eléctricamente y focalizada en un área esencial del sistema de recompensa podrá disminuir el consumo de alcohol en sujetos que se haya establecido un consumo voluntario crónico?

5. Hipótesis

La estimulación eléctrica focal repetitiva en corteza prelímbica reducirá el consumo de alcohol en ratas Wistar en un modelo de consumo voluntario crónico.

6. Objetivos

6.1. Objetivo general

Determinar si la estimulación eléctrica focal repetida crónica en la corteza prelímbica, disminuye el consumo de alcohol en ratas que se encuentren en un modelo preclínico de alcoholismo voluntario.

6.1.1. Objetivos específicos.

- o Desarrollar un modelo de intervención *in vivo* de estimulación eléctrica focal repetitiva en la corteza prelímbica en ratas, que sea compatible con el resonador magnético Bruker 7T y el modelo de alcoholismo.
- o Valorar si existen cambios en el consumo de alcohol y otros cambios conductuales resultantes de la intervención con estimulación eléctrica focal repetitiva crónica.

7. Sujetos y materiales.

Este es un estudio exploratorio a descriptivo que se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto de Neurobiología en Juriquilla, Querétaro. En los laboratorios A-15, C-13 y B-03, así como la Unidad de Análisis Conductual y cuartos experimentales del Laboratorio Universitario de Bioterio.

7.1 Sujetos

Los sujetos experimentales son ratas albinas de la cepa Wistar (*rattus norvegicus albinus*) de 21 días de edad, los cuales fueron obtenidos del bioterio del Instituto de Neurobiología. Alojadas en condiciones de temperatura controlada ($21 \pm 2^\circ \text{C}$),

con alimento libre a demanda, en condiciones de ciclo invertido oscuridad/luz de 12 horas, en grupos de 4 por caja de policarbonato. Son separadas individualmente a la edad de 25 días para iniciar la habituación a dos bebederos antigoteo de 125 ml (RedKit).

7.2. Materiales

7.2.1 Modelo preclínico de consumo de crónico de alcohol (IA2BC)

- 1) Bebederos antigoteo de 125 ml marca RedKit
- 2) Cajas de policarbonato para alojamiento individual
- 3) Cuarto de alojamiento con ciclo de luz invertido 12 h oscuridad/luz

7.2.2 Modelo de estimulación eléctrica focal repetitiva

- 1) Electrodo monopolar de carbono compatible con el resonador magnético.
- 2) Unidad de aislamiento de estímulos (SIU) GRASS
- 3) Estimulador de pulsos cuadrados GRASS S48

7.2.3 Valoración conductual

- 1) Laberinto en cruz elevado
- 2) Caja de policarbonato para prueba de Reconocimiento de Objeto Novedoso.

8. Métodos

Este trabajo forma parte del proyecto: "Neuromodulación como intervención terapéutica en uso de sustancias: efectos y mecanismos de acción" aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Instituto de Neurobiología con el número 119.A, el cual se apega a las siguientes normas nacionales:

- 1) Norma Oficial Mexicana "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio" (NOM-062-ZOO-1999).

- 2) Declaración mexicana y principios básicos de la experimentación en animales de la Comisión Nacional de Bioética de 1993.
- 3) Reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud, Título Séptimo.

Y los siguientes normas y guías internacionales:

- 1) Directiva del parlamento europeo y del consejo relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos 2010/63/UE.
- 2) Políticas para el uso de animales y humanos en la investigación de neurociencias, *Society for Neuroscience*, 1991.
- 3) Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, *Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Sciences National Research Council*, 1996.

8.1 Pilotos

8.1.1. Pilotos del modelo de alcohol intermitente de elección a dos botellas (IA2BC).

Fue necesario elegir la concentración de alcohol que para el protocolo del IA2BC (ver en 8.3) debido a las diferentes posturas sobre la edad ideal de los sujetos y la concentración de las soluciones de alcohol ofertadas. Según Murphy y cols., (1986) al evaluar a la cepa con preferencia al alcohol encontraron que prefería concentraciones de solución de alcohol mayores al 30%. Por el contrario, la cepa no preferente, reaccionaba de forma aversiva a concentraciones mayores al 10%. Por el contrario, Wise y cols., (1973) reportó que una solución al 20% en ratas Wistar no preferentes, al presentarla de manera intermitente, es decir un día sí y otro no, obtuvo mejores resultados en comparación con otros esquemas. En la revisión de Bell y cols., (2014) encontraron que a la edad de las ratas análogas a la peri-adolescencia humana, el consumo era mayor por 2 g/kg/sesión en adultas, asimismo, el consumo en la fase de oscuridad del ciclo invertido. Por lo anterior, se realizaron cuatro experimentos con las siguientes condiciones:

Experimento 1 – Consumo de alcohol al 20% en ratas Wistar adultas (Adultas 20%)

Sujetos: 2 ratas wistar macho (P76) y 2 ratas wistar hembra (P75). Alojadas desde su nacimiento y destete (P21) en el bioterio del Instituto de Neurobiología. Sesiones: 20 sesiones con toma de alcohol de 45 días totales.

Experimento 2 – Consumo escalonado de alcohol al 20% en ratas Wistar con inicio en la adolescencia (Teen 20%)

Sujetos: 1 ratas wistar macho (P69) y 2 ratas wistar hembra (P69) Alojadas desde su nacimiento y destete en el bioterio del Instituto de Neurobiología. Sesiones: 10 sesiones con toma de alcohol de 23 días totales

Experimento 3 – Consumo de alcohol al 10% en ratas Wistar adultas (A 10%).

Sujetos: 3 ratas wistar macho (P75) y 3 ratas wistar hembra (P75). Alojadas desde su nacimiento y destete en el bioterio del Instituto de Neurobiología.

Sesiones: 6 sesiones con toma de alcohol de 14 días totales

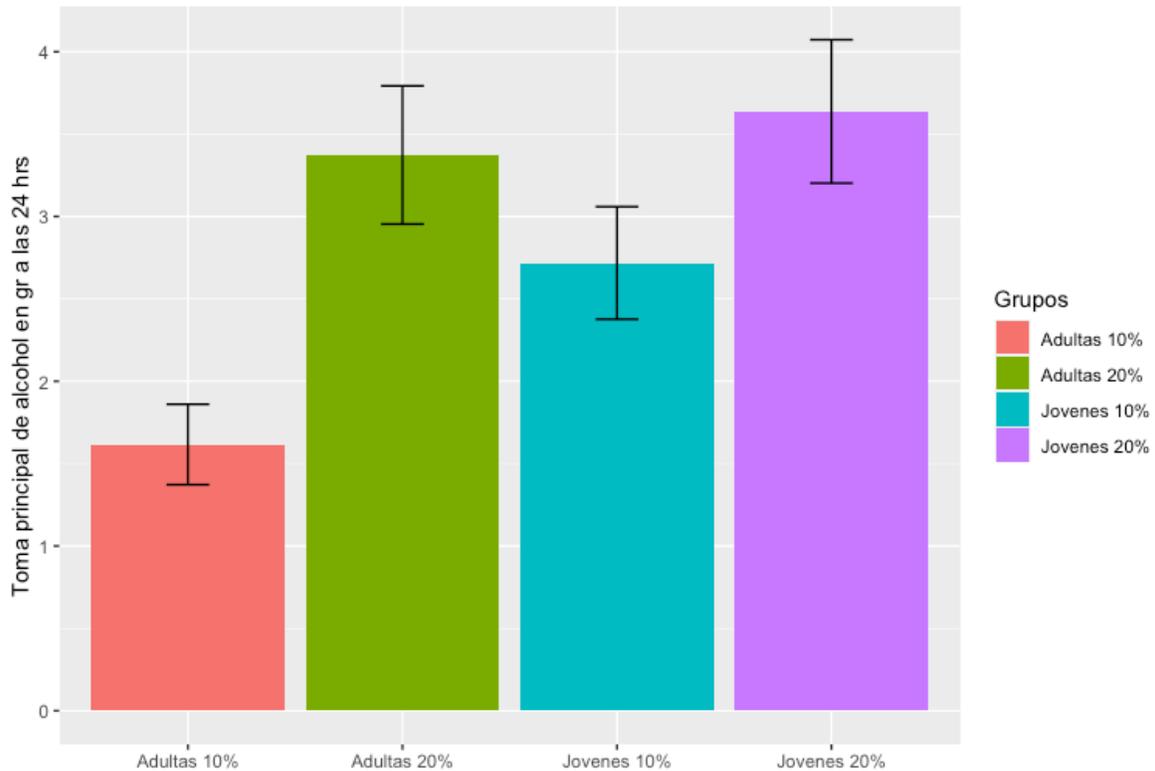
Experimento 4 – Consumo de alcohol al 10% en ratas Wistar adolescentes (Teen 10%)

Sujetos: 3 ratas wistar macho (P45) y 3 ratas wistar hembra (P45). Alojadas desde su nacimiento y destete en el bioterio del Instituto de Neurobiología.

Sesiones: 6 sesiones con toma de alcohol de 14 días totales

Como resultados de nuestros experimentos (Figura 2), se eligió la concentración de alcohol usada en Simms y cols., (2008) y la edad de inicio resultó de acuerdo con Bell y cols., (2014) en ratas jóvenes con una edad de 45 días.

Figura 2. Resultados de consumo de los pilotos de edades y concentraciones de soluciones de alcohol.

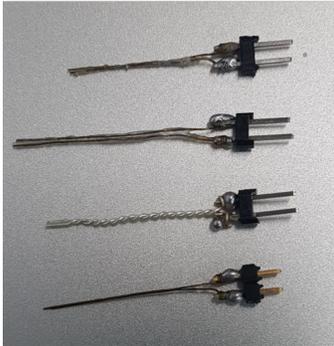


En esta gráfica de barras se muestra el consumo promedio con barras de error estándar en gr/kg/24 hr de los grupos de ratas de izquierda a derecha en edad de P75 (Adultas 10%) P76 (Adultas 20%) P69 (Jóvenes 10%) P45 (Jóvenes 20%).

8.1. 2. Piloto de creación de electrodos para la estimulación eléctrica.

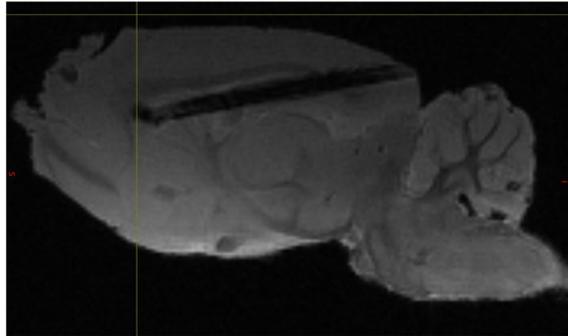
Previo a la reproducción de electrodos de carbono, se elaboró electrodos de tungsteno y plata, mismos que se descartaron al realizar pruebas de compatibilidad y generación de artefactos con el resonador magnético Bruker 7T que cuenta el INB, ya que es uno de los objetivos a corto plazo es realizar los análisis de las adquisiciones por resonancia magnética estructural y funcional.

Figura 3. Prueba de materiales para electrodos de estimulación



Electrodos bipolares de fibras trenzadas de plata y tungsteno de 0.35 mm de diámetro, con conectores de oro.

Figura 4. Resonancia magnética con artefacto por electrodo.



Resonancia magnética en secuencia de localizador de cerebro ex vivo de rata Sprague Dawley. Señalado con una flecha se nota la fibra de un electrodo de tungsteno que fue implantado. Se le llama artefacto a la señal incrementada de las dimensiones reales del objeto. No se realizó un análisis detallado al respecto.

8.1.3. Piloto de cirugía de implantación de electrodos.

Se utilizó la cirugía de Santana-Chavez y cols., (2020) de fijación de placa de semi-restricción, para la implantación de electrodos bipolares de tungsteno y plata bilaterales (Figura 6). Sin embargo, esta intervención requirió ser modificada pues los sujetos perdían el electrodo a la manipulación y el tiempo de recuperación de la cirugía era de aproximadamente 10 días. El procedimiento que se utilizó para la implantación de electrodos de carbono se describe más adelante.

Por otro lado, las coordenadas de implantación fueron AP (3.2) ML (± 0.95) DV (3.7), en donde la coordenada ML tuvo un ajuste de 0.55 debido a dificultades para el control de sangrado activo en sujetos destinados a pilotos de elección de cirugía de implantación.

Figura 5. Rata wistar con electrodo implantado de tungsteno

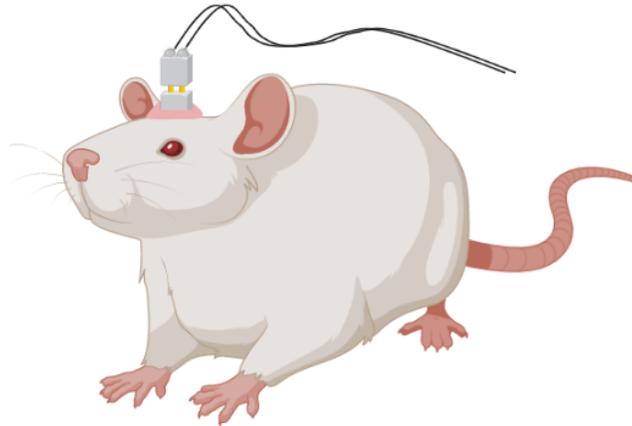


Figura que representa a rata con electrodo de tungsteno implantado. Se realizó la cirugía de implantación según Santa-Chavez y cols., (2020) con cemento dental que sobresalía sobre el cráneo. El cuero cabelludo previamente afeitado, era unido al concluir la implantación con sutura de seda 2-0.

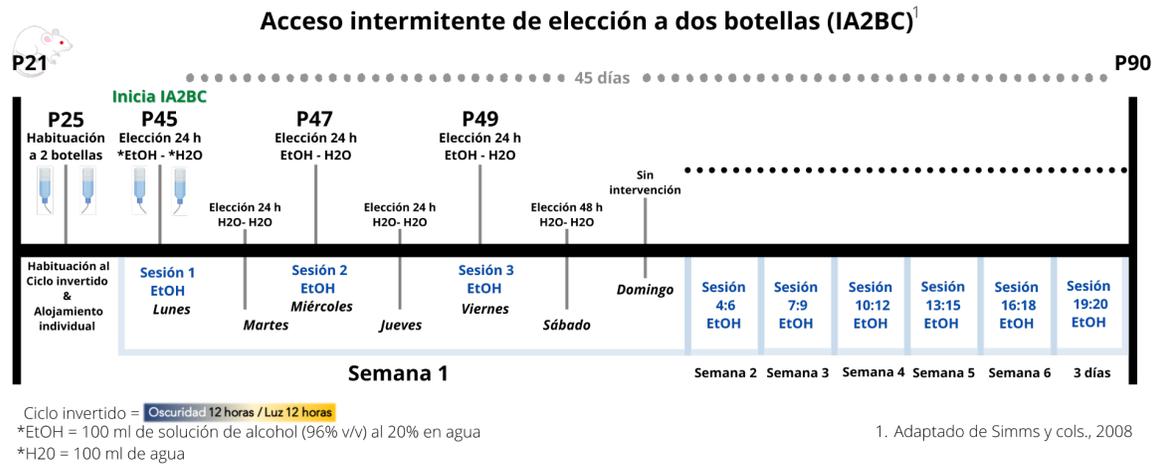
8.2. Modelo IA2BC

El procedimiento de acceso intermitente de elección a dos botellas (IA2BC) que se utilizó es una adaptación de Simms y cols., (2008). La elección del IA2BC se debe a las características valoradas por Kuhn y cols., (2019) que le confiere ser de acceso intermitente, este permite: 1) toma en escalamiento 2) captura el patrón temporal de consumo observado en humanos 3) mayor motivación para conseguir la droga 4) buena validez aparente que permite el incremento del consumo voluntario. Y la elección a dos botellas, por su lado es: 1) fácil de instaurar 2) buena correlación entre la toma y la concentración en sangre 3) buena validez aparente.

Las ratas con edad de 21 días postnatales (P21) se alojaron en grupos de 4 por caja de policarbonato, en ciclo invertido 12 horas (oscuridad/luz). En P25 se alojan individualmente, pues se reporta que el aislamiento social incrementa el consumo de alcohol en el IA2BC en ratas (Weiner y cols., 2013). También se inicia la habituación a 2 botellas (bebederos Redkit de 125 ml) con boquilla metálica antigoteo. El paradigma de IA2BC inicia a la edad de 45 días (P45) y tiene una duración total de 45 días (6 semanas 3 días) donde de manera intermitente se presentan 20 sesiones (sesiones EtOH) de 24 horas (lunes - miércoles - viernes)

con acceso ilimitado a la elección de 2 botellas con un volumen de 100 ml de solución al 20% alcohol (96% v/v) y 100 ml de agua.

Figura 6. Protocolo de IA2BC



El protocolo inicia con la obtención de la muestra en la edad de 21 días. A los 25 días de edad posnatal (P25) se realiza la habituaación a dos botellas, ciclo invertido y el alojamiento individual en las cajas de policarbonato. A los 45 días de edad, inicia el IA2BC, que se compone de 45 días totales (línea punteada gris) con 20 sesiones de 24 horas de acceso ilimitado (Sesión EtOH) con elección entre una botella con 100 ml de solución al 20% de alcohol (96% v/v) y una botella con 100 ml de agua en el transcurso de 6 semanas y 3 días (días lunes - miércoles - viernes).

8.2.1. Variables de consumo de alcohol

Los datos resultantes de las pruebas conductuales de consumo de alcohol serán analizados en T1 y T2, estos serán los siguientes según Simms y col., (2008):

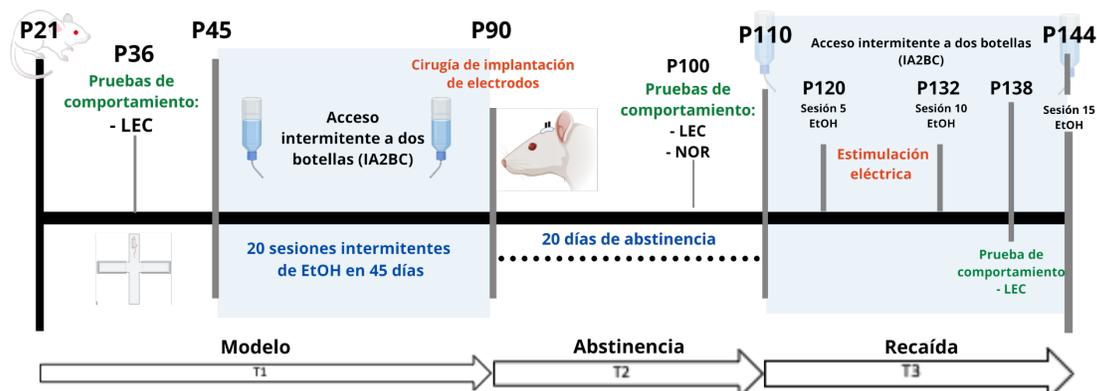
- Toma principal de alcohol a las 24 horas
 - Medida del consumo de alcohol a las 24 horas con unidades de g/kg/24hrs.
 - Los gramos consideran la medida inicial del bebedero de alcohol y a las 24 horas, multiplicado por el peso de la rata correspondiente expresada en kilogramos.
- Toma total de fluido alcohol
 - Medida del consumo de alcohol a las 24 horas en unidades de ml/kg/24 horas.

- 100 ml de EtOH al 10% significan un peso de 98.0608 gr
- 100 ml de EtOH al 20% significan un peso de 96.1216 gr

8.3. Diseño experimental

Se realizó un estudio longitudinal con grupo control (sham) (Figura 7). El tiempo 1 (T1) inicia con la separación de crías de sus madres a los 21 días. En P35 se inició la habituación a las dos botellas según el (IA2BC) de Simms y cols., (2008). La prueba de condicionamiento inició a los 45 días de edad de la rata (P45). El modelo tuvo una duración de 45 días que se compone de 20 sesiones, en las que se ofreció una botella con 100 ml de solución de alcohol al 20% y otra con agua. Tiempo 2 (T2) inicia al término del modelo y la cirugía de implantación de los electrodos para la estimulación en P90. Fueron 5 días de recuperación de la cirugía y la aplicación de pruebas de comportamiento para valorar el posible efecto de la cirugía per se. En P110 que da inició al tiempo 3 (T3). En T3 inicia la estimulación eléctrica que comprende las sesiones 5:10 de la reexposición a alcohol. Se realiza una tercera valoración con LEC en P138 y se concluye el IA2BC en la modalidad de recaída en P144 al completar la sesión 15 de exposición.

Figura 7. Diseño experimental.



T1 corresponde al tiempo que engloba la instauración del IA2BC. T2 separa el periodo de 20 días de abstinencia. T3 corresponde a la fase del modelo donde habitualmente se observa el fenómeno de recaída. P = Edad postnatal en días. EtOH = Etanol al 20%.

8.4. Cirugía de implantación de electrodos

8.4.1. Electrodos de estimulación

La construcción de los electrodos monopolares de carbono se basó en el diseño de Gallino y col. (2019). Los electrodos se forman de una fibra intracraneal con un diámetro de 0,25 mm y una fibra extracraneal de 2 mm de diámetro. La fibra intracraneal se aísla con caucho en aerosol (Plasti Dip) y ambas fibras se unen con un epoxi de carbono que tiene la capacidad de conducir entre las dos fibras. Cabe destacar que las dimensiones del electrodo se adaptaron por primera vez a las ratas wistar (Figura 8).

Las fibras de carbono se caracterizan por su alta resistencia, peso ligero y baja densidad. Se constituyen de 900 GPa, con una conductividad térmica de 1000 W/mK y una conductividad eléctrica de 106 S/m (Zhao y col., 2019). Como conductor eléctrico el carbono dista de la conductividad de los metales, sin embargo, al ser una fibra flexible pero resistente, permite ser implantado en la corteza con el mínimo insulto. Además, se asemeja a las propiedades magnéticas del tejido cerebral, por lo que el artefacto secundario a la adquisición de la imagen por resonancia magnética es disminuido (Chakravarty y col., 2016). Posteriormente se implantaron, mediante cirugía estereotáxica, los electrodos en la región prelímbica (PL) según Paxinos (2007), que corresponde con un área fundamental del sistema mesocorticolímbico y frontoestriatal.

Figura 8. Morfología del electrodo monopolar de carbono.

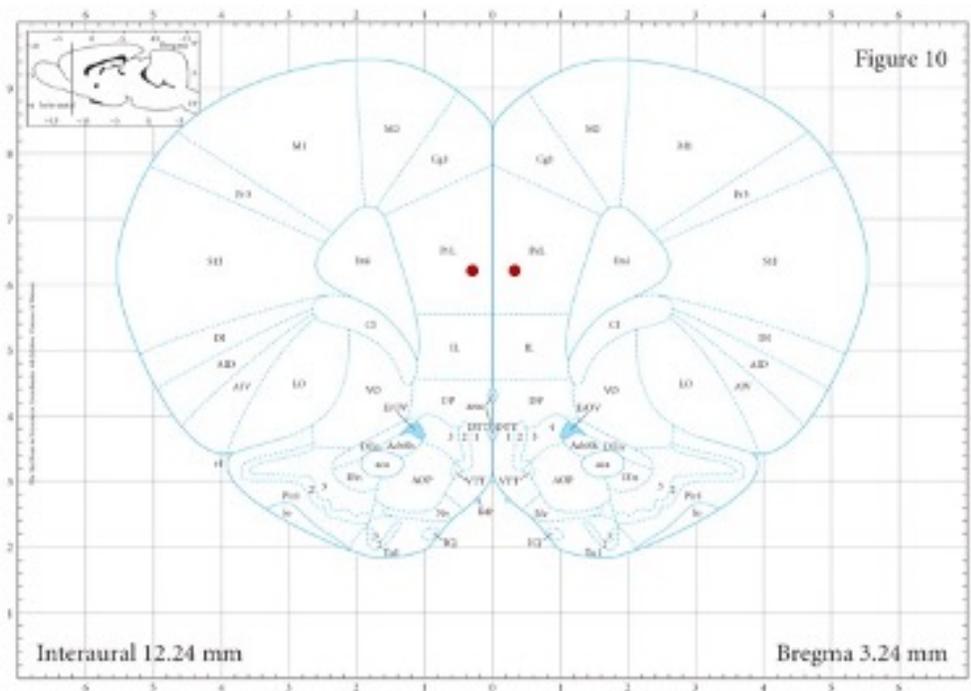


Electrodo monopolar de carbono formado por dos fibras con diámetros de 2 mm y 0.25 mm y recubierto con PlastiDip y cemento dental (Gallino y cols., 2019).

8.4.2 Coordenadas de estimulación

Las coordenadas modificadas (Figura 9) para la implantación de electrodos se basan en las utilizadas por Levy y col., (2007) que corresponden al lóbulo prelímbico (PL) también llamada mPFC, por su analogía con la corteza humana. Se utilizó la torre del aparato estereotáxico para dirigir el electrodo sobre las coordenadas de implantación, realizar el marcaje de la zona. También se ajusta la posición de la cabeza del roedor, según lo recomendado en Paxinos y Watson (2007).

Figura 9. Coordenadas de implantación.



Con un punto rojo se señalan las coordenadas AP (3.2) ML (± 0.95) DV (3.7) bilaterales de implantación de los electrodos según el atlas Paxinos y Watson (2007).

8.4.3. Cirugía estereotáxica.

En los siguientes apartados se utilizaron las referencias sobre la intervención quirúrgica de Sánchez-Chávez y cols., 2020; Rigalli y Loreto, 2016; Matsumiya y cols., 2012.

8.4.3.1. Preparación para anestesia.

Para inducir la anestesia profunda es necesario para esta intervención quirúrgica, se indujo la anestesia en una cámara de inducción con isoflurano vaporizado al 5%. Con la ausencia de reflejos de retiro al dolor y la disminución de la frecuencia respiratoria. Se colocó en decúbito supino cuidando su vía aérea. Esta última se mantiene permeable gracias a la barra de inmovilizadora de incisivos y los lápices de posición intra-aural (Figura 10). Posteriormente se administran lágrimas artificiales sobre los ojos, y se cubren con una gasa. Continuando con la administración subcutánea de 0.3 ml de lidocaína al 0.5% en el área donde será la incisión. Intramuscularmente se administra meloxicam en una dosis de 0.3 ml/kg y solución salina 1 ml subcutánea entre los omoplatos.

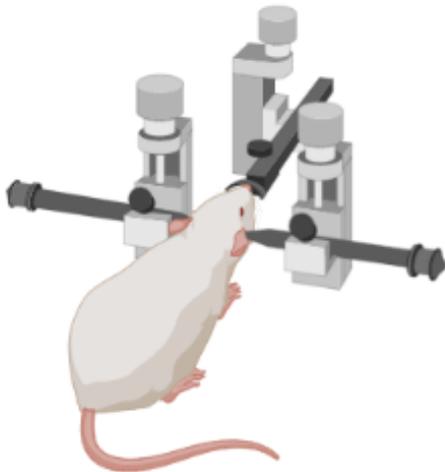
8.4.3.2. Implantación de electrodos.

Después de la preparación inicial, se asegura que la rata esté en un estado de anestesia profunda y que sus parámetros fisiológicos no demuestren datos de dificultad respiratoria (frecuencia cardiaca menor a 20 rpm). A continuación, se enumeran los pasos de la cirugía:

- 1) Iniciar con una incisión en la línea media con ayuda de un bisturí, de aproximadamente 2 cm. Con exposición de las suturas bregma y lambda. Y retraer la piel con ayuda de un retractor. Con un periostotomo se separa la aponeurosis del cráneo (Figura 10). Seguido de la limpieza y control de sangrado del cráneo.
- 2) Aplicar pegamento N-butil 2-cianocrilato sobre el cráneo limpio y seco, y esperar 10 min. Instalar la torre del aparato estereotáxico con los electrodos. Ajustar la posición de la cabeza del sujeto alineando bregma y lambda. Marcar las coordenadas donde se realizarán cuatro trépanos (dos por bregma y 2 por lambda) con el taladro dental (Figura 11).

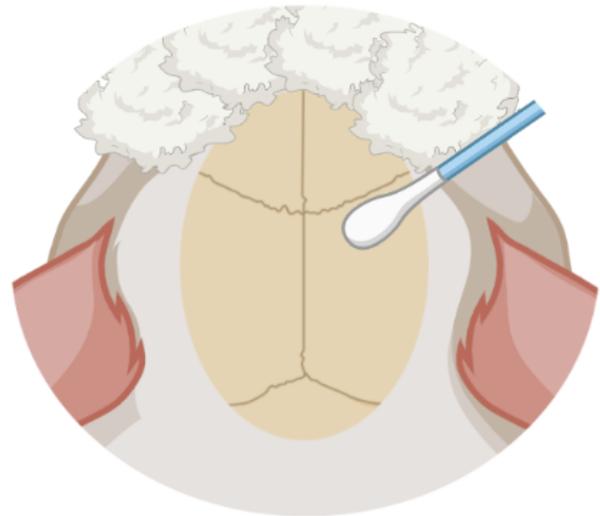
- 3) Después de los trépanos colocar los tornillos de nylon en los trépanos posteriores cercanos a lambda. Seguido de los electrodos que se colocan con ayuda de la torre estereotáxica (Figura 12). Se fijan con ayuda de cemento dental y Metabond.
- 4) Dejar secar los pegamentos por 10 a 15 minutos, después suturar con nylon 3-0 alrededor de los electrodos. Se concluye aplicando nuevamente meloxicam y un ungüento antibiótico de nitrofurazona en la zona de la piel (Figura 13).
- 5) Se revisa la resistencia de los electrodos, así como puedan ser conectados a través de las pinzas caimán (Figura 14).

Figura 10. Rata en base para cirugía estereotáxica.



Rata bajo anestesia vaporizada con isoflurano 3%, en base de marco estereotáxico con fijación de cabeza y cojín caliente bajo el cuerpo.

Figura 11. Preparación del cráneo y control de sangrado local.

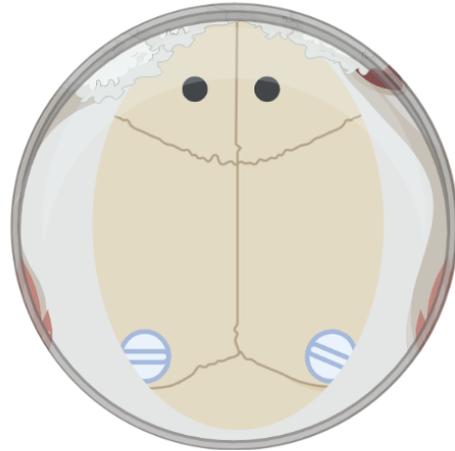


Incisión en cuero cabelludo en la sobre la línea media siguiendo la dirección de la sutura media sagital. Legrado de aponeurosis de cráneo y limpieza con hisopos.

Figura 12. Marcaje de coordenadas



Figura 13. Trépanos en cráneo



Marcaje de coordenadas de implantación de tornillos de nylon y electrodos de carbono al microscopio, dirigido por torre de marco estereotáxico.

Trépanos en cráneo que corresponden al sitio de entrada para la implantación cortical de los electrodos. También son visibles los tornillos de nylon que son colocados para mantener fijas las fibras al cráneo y mantener su cronicidad.

Figura 14. Rata con electrodos de carbono implantados bilaterales y conectado a estimulador mediante pinzas caimán.

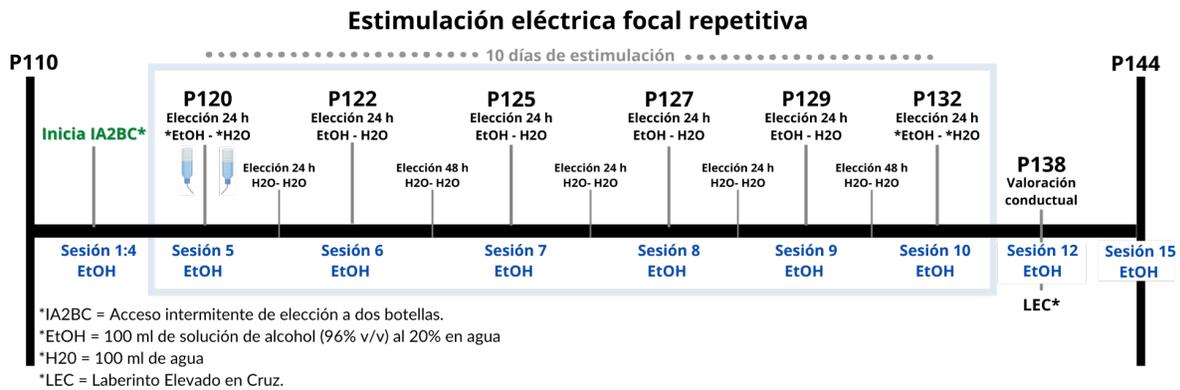


Figura representativa de rata wistar con electrodos de carbono implantados bilateralmente y conectados a un estimulador eléctrico GRASS SIU con pinzas caimán.

8.5. Estimulación

Al concluir el modelo IA2BC de 20 sesiones y la abstinencia de 20 días, que corresponden a los tiempos 1 y 2 (T1 y T2), inicia el tiempo 3 (T3) en el cual se reinstala el IA2BC con 15 sesiones de oferta de alcohol y el tratamiento de estimulación activa/sham. El tiempo 3 se representa en la Figura 15 a continuación.

Figura 15. Cronograma de estimulación eléctrica e IA2BC durante T3

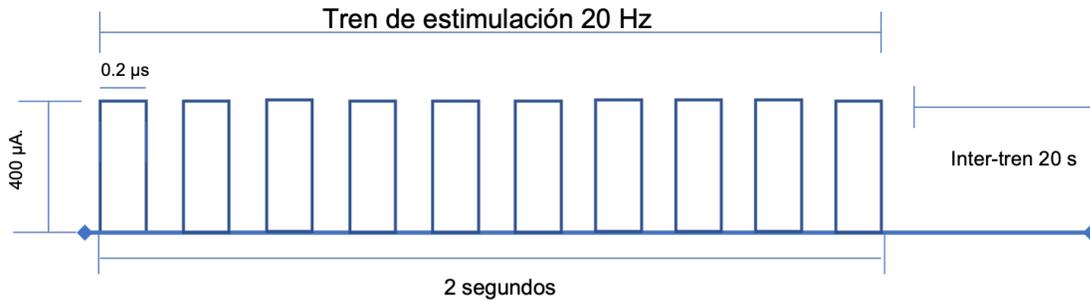


Diseño del cronograma para la estimulación eléctrica focal repetitiva que consta de 10 días con una sesión diaria de 10 minutos, dicho periodo se muestra dentro del rectángulo azul entre los días 120 y 132 de edad de la rata. En total son 15 sesiones donde existe una botella de agua y una de alcohol (EtOH - H2O) para elegir tomar, se muestran en azul. Entre cada una de estas sesiones se les ofrece dos botellas de agua (H2O - H2O).

8. 5. 2. Parámetros de estimulación

Sesiones de 10 minutos por 10 días consecutivos conformados por 100 pulsos (duración = 0.2 ms intensidad = 400 μ A) a frecuencia alta de 20 Hz en trenes de 10 pulsos con duración de 2 segundos y un intervalo inter-tren de 20 s (Levy y col., 2007; Gersner y col., 2010; Moshe y col., 2016).

Figura 16. Diseño de estimulación eléctrica



Con los parámetros de 100 pulsos (duración = 0.2 ms, intensidad = 400 μA) alta frecuencia de 20 Hz, en trenes de 10 pulsos cada 2 segundos con un intervalo inter-tren de 20 s. Tras la elección del electrodo de carbono, el protocolo de investigación se llevó a cabo durante 10 días consecutivos por 10 minutos. (Levy y col., 2007; Gersner y col., 2010; Moshe y col., 2016).

La intensidad de 400 μA requiere de un cálculo mediante la fórmula de la ley de ohm por su sujeto, que considera la resistencia del electrodo implantado, así como se muestra a continuación, donde V es el voltaje necesario para lograr una intensidad de corriente de 400 μA a través de una fibra cuya resistencia varía en función de su construcción.

$$V = IR$$

$$V = (400\mu A)(2KW)$$

$$V = (0.0004A)(2000W) V = 0.8 V$$

8.6. Conducta

La naturaleza multifactorial del trastorno por uso de alcohol (Volkow N., 2000) permite por medio de la valoración de la conducta, conocer los rasgos que pueden llevar al consumo exacerbado. Por ejemplo, en el estudio de Bahi A., (2013) relaciono a los sujetos con rasgos de ansiedad alta, valorada con el laberinto en cruz elevado, con un mayor consumo de alcohol. Respecto a la tarea de reconocimiento de objeto novedoso, se usa para describir mecanismos relacionados con el proceso de adquisición del aprendizaje y la evocación de la

memoria (Warburton y Brown, 2015). Según Chanraud y cols., (2010) en humanos con exposición crónica al alcohol, surgen procesos patológicos en los circuitos cerebrales, que comprometen precisamente la habilidad para el procesamiento de información y la toma de decisiones, especialmente en periodos de alta demanda cognitiva. Es por esto, en dónde radica la importancia de valorar la conducta de los sujetos bajo el modelo preclínico. También en aquellos sometidos a cirugía de electrodos, es importante conocer que el electrodo *per se*, sea la razón de un cambio de conducta hacia el consumo de alcohol.

8.6.1. Pruebas de comportamiento

En el tiempo 1 (T1) y 2 (T2) serán valoradas conductualmente con las siguientes pruebas.

o Tarea de reconocimiento de objeto; novedoso y cambio espacial. Para la valoración de memoria de tipo espacial (Warburton y Brown, 2015).

o Laberinto elevado. Para valorar aprendizaje espacial y memoria (Sharma y cols., 1992).

8.6.1.1. Reconocimiento de objeto novedoso.

La prueba se realiza durante el tiempo de abstinencia en T2. Consiste en una habituación de 3 minutos en una caja facilitada por la unidad de conducta del INB. Donde se colocaron dos objetos con las mismas características físicas como lo fueron frascos de vidrio con tapa de aluminio. Y una prueba de 5 minutos donde se intercambié uno de esos frascos por otro objeto con los mismos materiales y dimensiones similares, pero de una forma diferente, como lo fue una bombilla (Tress y cols., 2012). En esta prueba se valora la capacidad de discriminación de un objeto nuevo sobre un objeto familiar. Para lo cual se extrajo la proporción de discriminación (discrimination ratio, en inglés) con la siguiente fórmula:

$$\text{Proporción de discriminación} = \frac{\text{Tiempo explorando el objeto novedoso}}{\text{Tiempo explorando objeto novedoso} + \text{Tiempo explorando objeto familiar}}$$

8.6.1.2. Laberinto Elevado en Cruz

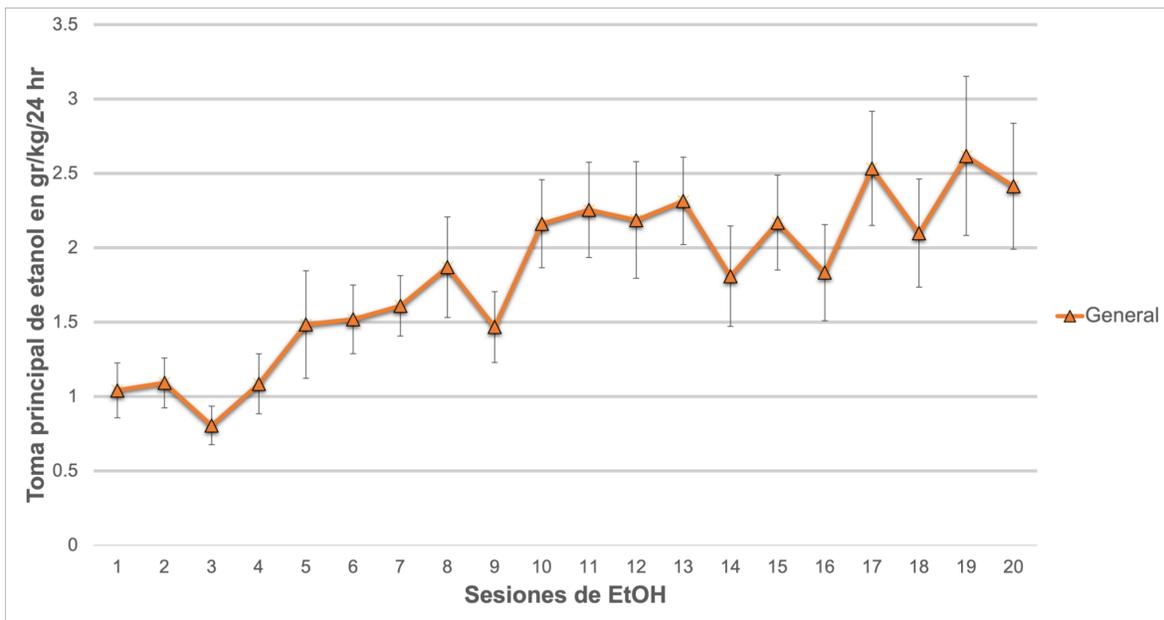
La prueba de laberinto elevado en cruz (LEC) se lleva a cabo en 2 tiempos para las ratas que fueron expuestas a la elección de alcohol, y en 3 tiempos para aquellas que formaron parte de los grupos de tratamiento. Para ambos casos, T1 corresponde a la valoración previa exposición al alcohol. Por otro lado, T2 responde al tiempo en el cual se inicia la abstinencia al alcohol, que es el tiempo de recuperación del grupo de cirugía. En T3 se realiza después de la adquisición de resonancia magnética, que coincide con el último día de estimulación eléctrica activa y sham. La intención de aplicar LEC en tres tiempos, surge desde que se propone puede aportar datos sobre los efectos sobre el aprendizaje espacial y memoria, así como ansiedad e impulsividad en los sujetos valorados (Bahi A., 2013). La valoración de memoria se realiza mediante la obtención de un parámetro conocido como: latencia de transferencia, que se obtiene al cuantificar el tiempo que le toma al roedor desplazarse desde brazos abiertos a brazos cerrados.

9. Resultados

9.1. Modelo IA2BC

El modelo en este estudio tuvo una muestra de ratas bajo el IA2BC ($n = 22$) y ratas control ($n = 7$). El protocolo tiene dos tiempos: 20 sesiones donde se ofrece el alcohol (45 días), un periodo de abstinencia por 20 días y la posterior instauración de la oferta de alcohol por 10 sesiones (20 días). En la Figura 17 se presenta el promedio de consumo de todas las ratas bajo el IA2BC a lo largo de las 20 sesiones del primer tiempo del IA2BC. Las unidades se encuentran en gr/kg/24 horas, es decir el peso del contenido de los bebederos de alcohol, normalizado por el peso de cada rata en 24 horas de consumo.

Figura 17. Consumo principal de etanol durante el IA2BC



Consumo promedio en gr/kg/24 hr de los sujetos ($n = 22$) a lo largo de cada sesión del IA2BC con barras de error estándar.

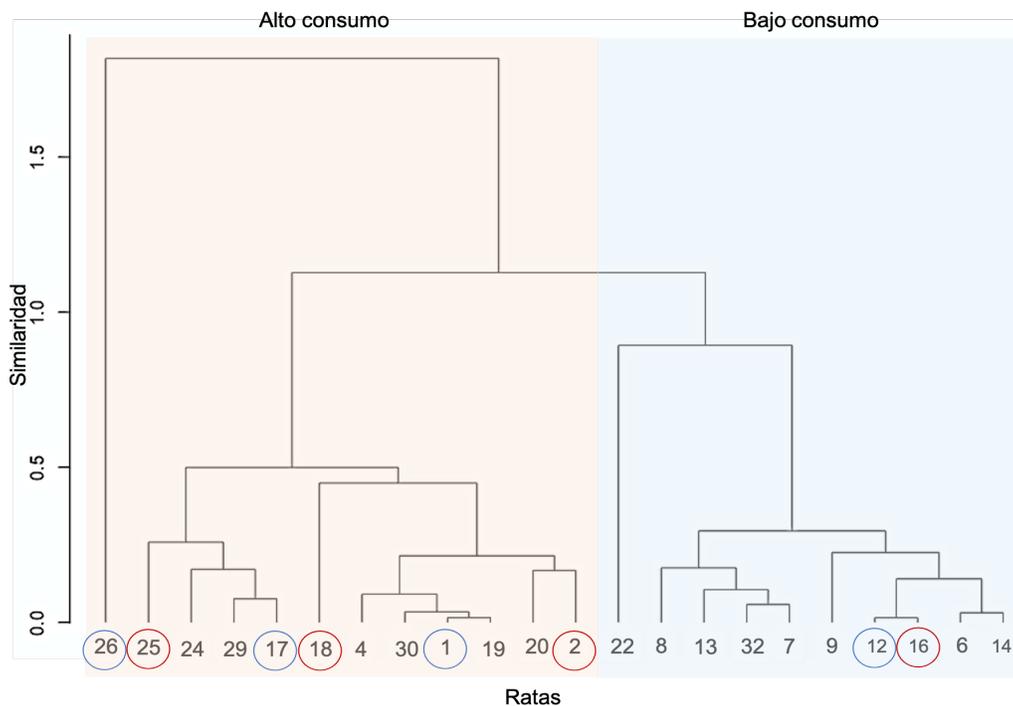
Según Simms y cols., (2008) el consumo se estabiliza en la sexta sesión. Un análisis preliminar de los datos resultó en el no cumplimiento del supuesto de homogeneidad de varianza. Así mismo, ratas presentaron consumos bajos y en otras aumentó de consumo

al desarrollo del modelo, por lo que fue necesario implementar otra forma del análisis de los resultados, así como el siguiente.

9.2. Análisis de conglomerados jerárquico

Este análisis permite identificar grupos basándose en características seleccionadas sin conocer a priori los grupos que se obtendrán, se utiliza cuando existen datos homogéneos o difícil de establecer una diferencia entre ellos, y también cuando el número de muestras es menor a 50 (Tivis y cols., 1995). Los procedimientos jerárquicos consisten en la construcción de una estructura en forma de árbol en donde se aglomeran los grupos por medio del método del centroide. El centroide de cada grupo es el promedio de los puntos de distancia entre el grupo (Hair y cols., 1999).

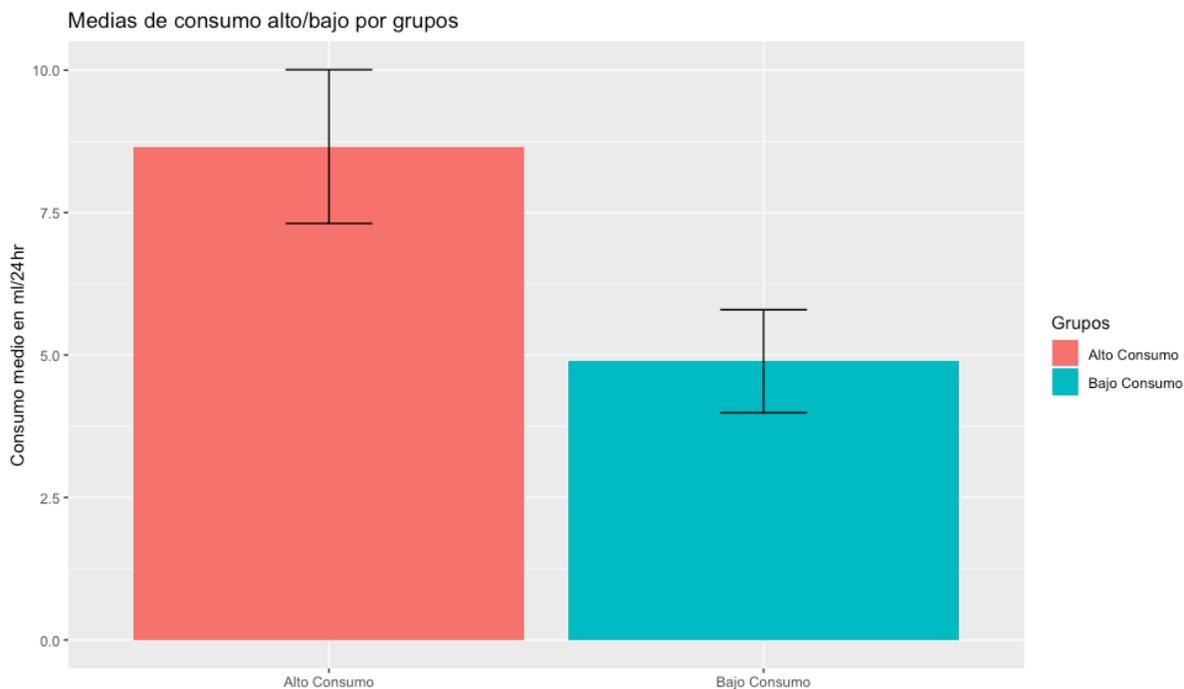
Figura 18. Dendrograma de análisis de conglomerados jerárquico para el consumo de alcohol.



Proceso de agrupación jerárquico, los objetos similares (los números en el eje de las x representan a las ratas) se enlazan y su posición en el diagrama está determinada por el nivel de similitud entre los consumos. En círculos se distinguen las ratas que recibirán tratamiento, en rojo activo en azul sham.

Como resultado del análisis se dividió la muestra en ratas de alto (n = 12) y bajo consumo (n = 10) de alcohol. Cuyas medias se muestran en la Figura 19 y en la Tabla 1 en Anexos.

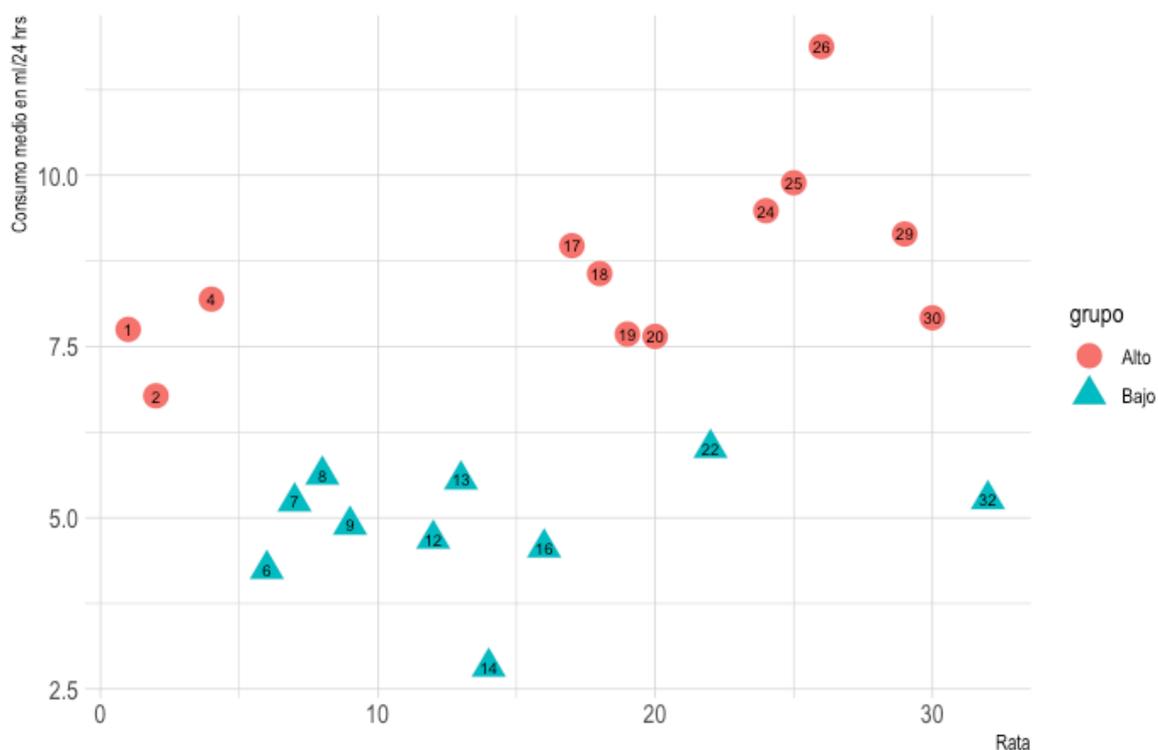
Figura 19. Consumos medios de los grupos de alto y bajo consumo.



Consumos medios de los sujetos de los grupos de alto consumo en rojo y bajo consumo en azul con sus desviaciones estándar en unidades de ml/kg/24 horas.

Al obtener los grupos, exploramos el consumo medio agrupando a las ratas en su grupo de consumo, así como se muestra a continuación en la Figura 20.

Figura 20. Gráfico de dispersión de consumo medio por sujeto.

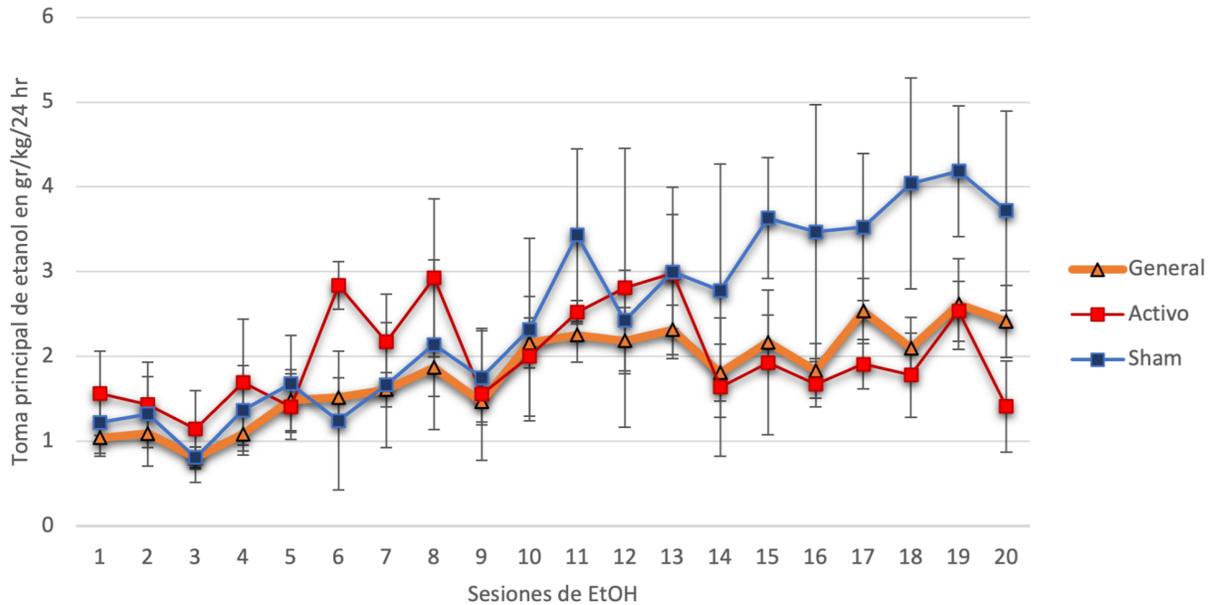


Distribución de los 22 sujetos después del análisis de conglomerados y designación de los grupos como alto consumo en rojo ($n = 12$) y bajo consumo en azul ($n=10$).

9.3. Consumo de alcohol en ratas que reciben tratamiento

A partir de dos grupos de ratas ($n=22$) se escogieron de forma aleatoria 8 para la muestra destinada al tratamiento de estimulación (sham/activa). Fueron dos ratas hembra y dos ratas macho, para el grupo que recibió estimulación activa. Y dos hembras y dos machos, para los que recibieron estimulación simulada o sham como se muestra en la tabla 2 y 3 en Anexos.

Figura 21. Consumo medio durante IA2BC

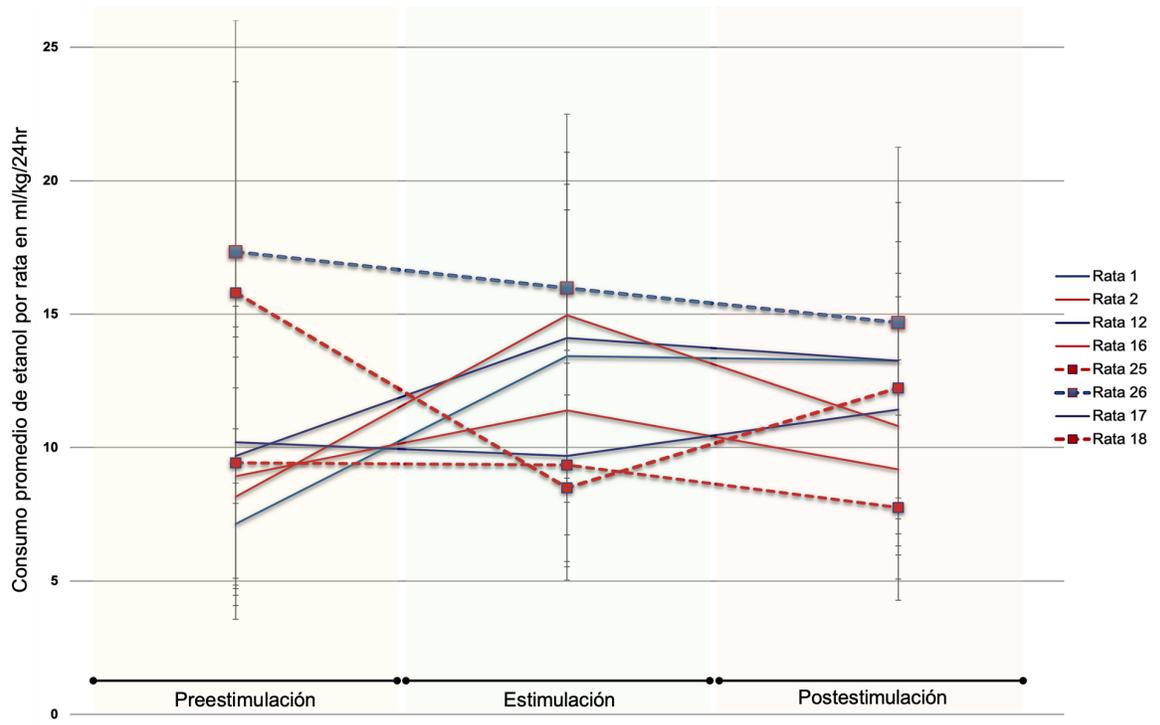


Se muestran los consumos medios en gr/kg/24 hr de los grupos durante el desarrollo de las 20 sesiones del IA2BC en el tiempo 1. Al grupo General lo conforman los 22 sujetos, a los grupos activo/sham lo conforman 4 sujetos para cada grupo, que se obtienen de una selección aleatoria del grupo General en el tiempo 2, para la intervención quirúrgica de implantación de electrodos.

Las 8 ratas que se designaron en los grupos de tratamiento de estimulación activa/sham, conservan el mismo protocolo de acceso intermitente a dos botellas en la fase de modelo en tiempo 1, abstinencia en tiempo 2 y recaída en tiempo 3.

Así como se mostró en la Figura 15, en el tiempo 3 se retoma la oferta de alcohol. La sesión 1 a la 4 engloba el periodo de preestimulación. Y a partir de la sesión 5 a la 10 de exposición a la botella de alcohol, se lleva a cabo el tratamiento de estimulación que tiene una duración de 10 días consecutivos con una duración de 10 minutos al día. Concluido el tratamiento en la sesión 10 de exposición al alcohol, se continuó hasta la sesión 15 de alcohol, periodo que se establece como de postestimulación.

Figura 22. Consumo por sujeto durante el tratamiento.



Consumo promedio de alcohol en unidades de ml/kg/24 horas por rata durante el tiempo 3 o de tratamiento con barras de error estándar. En color rojo se distinguen las ratas del grupo de tratamiento sham y en azul las ratas que recibieron estimulación activa. En los tres momentos que circundan la intervención de estimulación. Preestimulación corresponde a las 4 sesiones de exposición a alcohol previas al tratamiento de estimulación. Estimulación corresponde a la sesión 5 a 10 durante la cual se desarrolla el protocolo de estimulación. Postestimulación es la sesión 11 a 15 donde se retoma la exposición a alcohol sin estimulación.

Cabe destacar que el análisis de conglomerados jerárquico se realizó después de la cirugía de las ratas y por lo tanto la separación en los grupos de tratamiento activo/ sham. Como se muestra en la Figura 18, en círculos azules para las ratas que recibieron el tratamiento sham y en rojo las ratas del tratamiento activo. Seis de las 8 ratas resultaron agrupadas como consumo alto y sólo dos de ellas en consumo bajo.

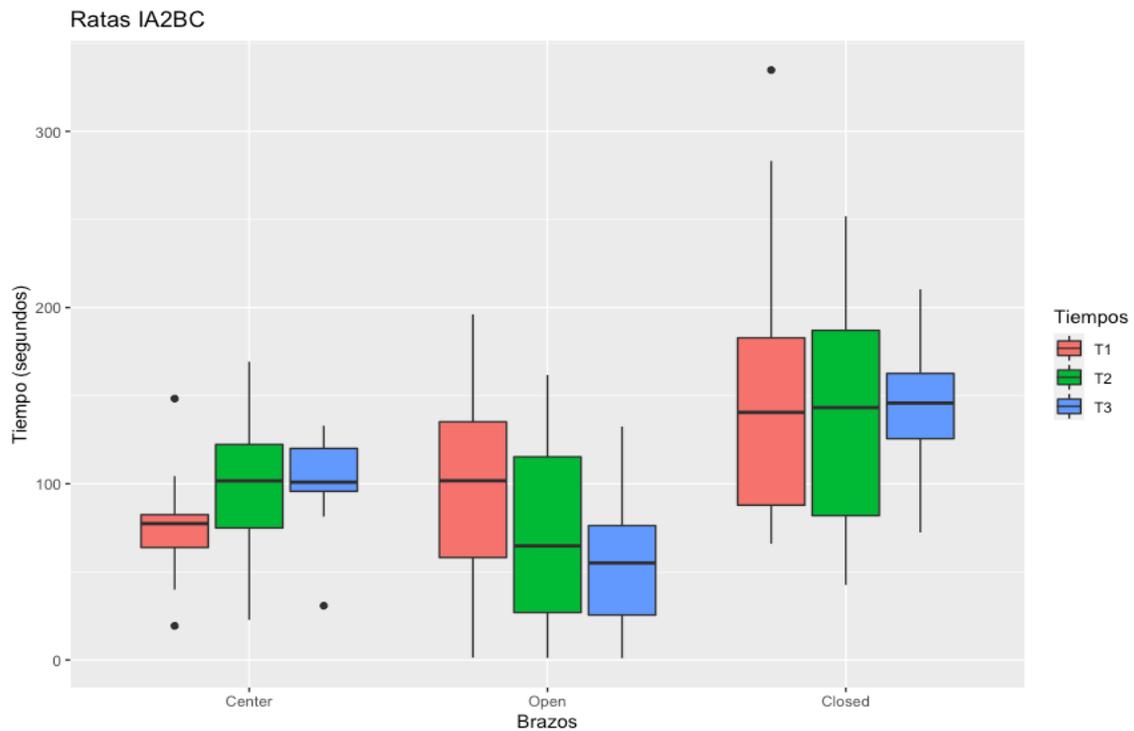
9.4 Pruebas Conductuales

Las pruebas conductuales se llevaron a cabo en cada uno de los tiempos (T1, T2 y T3) para el laberinto elevado en cruz. Para la tarea de reconocimiento de objeto novedoso, solo se realizaron en el tiempo 2, cuando las ratas se encuentran en abstinencia. Los análisis se hacen con ratas control sin cirugía y sin consumo de alcohol ($n = 7$), sujetos que reciben tratamiento ($n = 8$) y ratas sin cirugía ($n = 22$) (ver Figura 7 de diseño experimental).

9.4.1. Laberinto elevado en cruz

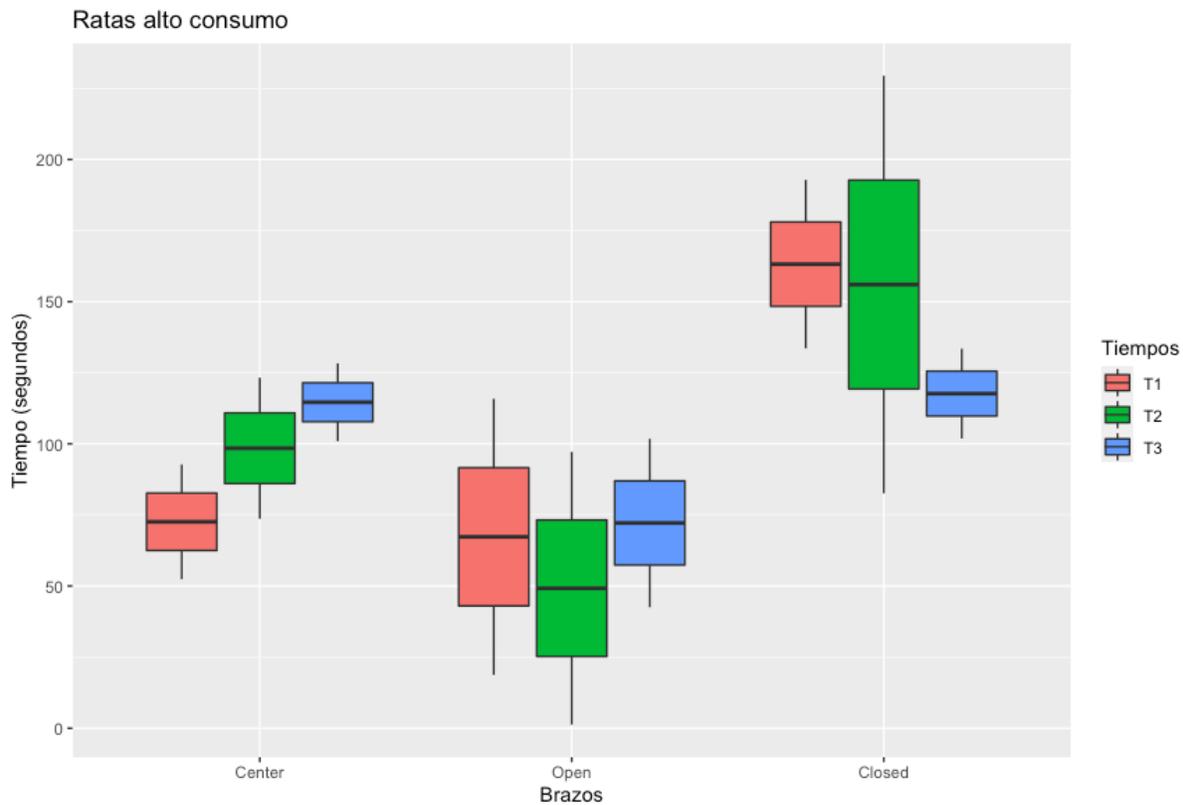
En las figuras 23 y 24 se muestra el tiempo que permanecieron las ratas en los brazos abiertos, cerrados y el centro del laberinto. Los roedores tienden a explorar por lo que permanecer en los brazos cerrados, se sugiere es indicio de un rasgo evitativo o ansioso por parte del sujeto (Sharma y cols., 1992). Particularmente en el T3 esta aseveración podrá no corresponder, pues los sujetos ya fueron expuestos al laberinto en dos ocasiones previas.

Figura 23. Tiempo de permanencia de los sujetos en los tres tiempos que abarca el diseño del estudio.



Resultados del tiempo en segundos de permanencia en los brazos centro, abiertos y cerrados de todos los sujetos ($n = 22$) con consumo sin/con cirugía, en los tres tiempos que abarca el diseño del estudio. En T3 sólo se valoraron las ratas que concluyeron el tratamiento de estimulación activa/sham. Se muestra en rojo T1 (antes de IA2BC) en verde T2 (periodo de abstinencia) y en azul T3 (posterior a la estimulación).

Figura 24. Tiempo de permanencia de los sujetos de alto consumo en los tres tiempos que abarca el diseño del estudio.

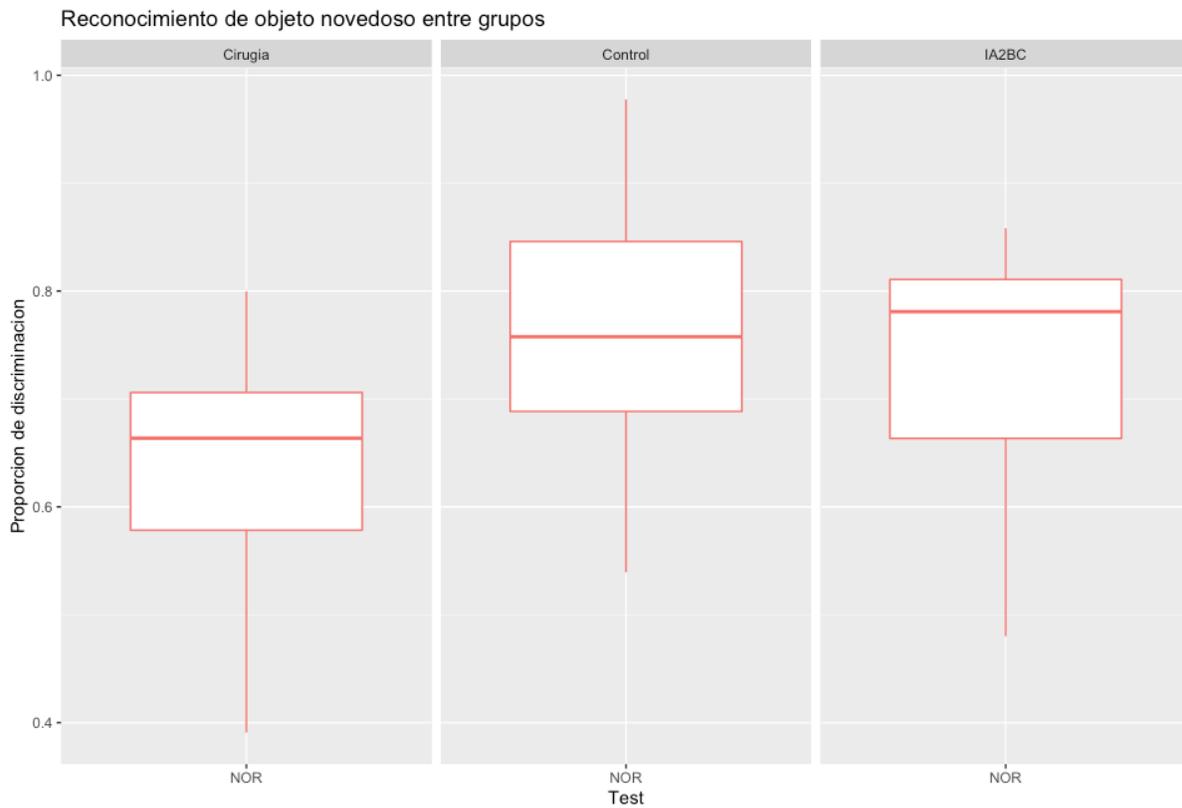


Datos de los sujetos (18 y 25) que mostraron decremento de consumo de alcohol después de la estimulación activa. Se realizó un ANOVA para valorar si existían diferencias durante el T3 que corresponde a la postestimulación, la cual no fue significativa ($F_{(2,3)} = 1.478$ $p = 0.358$). Se muestra en rojo T1 (antes de IA2BC) en verde T2 (periodo de abstinencia) y en azul T3 (posterior a la estimulación).

9.4.2. Reconocimiento de objeto novedoso

Divididos en 3 grupos, aquellos con cirugía de implantación de electrodos ($n = 8$), sujetos control sin consumo y sin cirugía ($n = 7$), y sujetos sin cirugía con consumo de alcohol ($n = 22$). Se presenta la proporción de discriminación, para lo que también se llevó a cabo una prueba estadística ANOVA que arroja no existe diferencias significativas entre los grupos ($F_{(2,26)} = 2.40$ $p = 0.1$).

Figura 25. Resultados de prueba de objeto novedoso



Muestra la proporción de discriminación de los tres grupos (cirugía, control y IA2BC) en la tarea de reconocimiento de objeto novedoso, que se lleva a cabo en el tiempo 2 en estado de abstinencia se realiza un ANOVA que arroja que las diferencias no son significativas entre los grupos ($F_{(2, 26)} = 2.40$ $p = 0.1$).

10. Discusión

Este trabajo de tesis tuvo como propósito estudiar el efecto de la estimulación cerebral profunda repetitiva en el trastorno por consumo de alcohol. Por lo que se estableció un modelo de consumo de alcohol crónico en ratas wistar, cuyas características pudieran ser equiparables a un modelo preclínico (McBride y Li., 1998). También se estableció la intervención quirúrgica necesaria para la implantación de electrodos monopolares de carbono (Santana-Chávez y cols., 2020) y la construcción previa de estos últimos, siguiendo el diseño para ratones de Gallino y cols. (2019) con la modificación para implantarlos en ratas. Los resultados arrojan que existe un efecto de la estimulación eléctrica cerebral profunda en la corteza prelímbica, sobre el consumo de alcohol, sin embargo, se esperaba una disminución en el consumo, pero en general presentó alta variabilidad. Este es el primer estudio en investigar los efectos de la estimulación eléctrica focal repetitiva en un modelo de consumo crónico de alcohol en ratas. A continuación, se discutirán los principales hallazgos del estudio.

El trastorno por uso de alcohol es un fenómeno de etiología multifactorial cuya vulnerabilidad de padecerlo se ha relacionado con maladaptaciones celulares y de circuitos neuronales (Nestler y Aghajanian., 1997) por si fuera poco, en su desarrollo los factores psicosociales también son preponderantes (Volkow N., 2000). Por lo anterior, un modelo análogo en otra especie debe considerar que al menos compartan los sustratos neuroquímicos y neuroanatómicos. Existen distintos modelos para conseguir lo anterior, como los modelos no operantes de acceso libre de autoadministración por vía oral, que son de los más utilizados por ser no invasivos, más sencillos de ejecutar y que comparten la vía oral como humanos (Planeta., 2013). También existen distintas posturas respecto a las concentraciones, los días del protocolo, la edades y cepa de rata. Concentraciones mayores a 30% pueden resultar aversiva para algunas cepas (Murphy y cols.1986), pero concentraciones muy bajas podrían no desarrollar un trastorno (Noronha y cols., 2014). Por lo anterior, se desarrollaron cuatro pilotos con dos concentraciones

de una solución de alcohol, al 10% y al 20%. Según el estudio de Bell y cols., (2014) las ratas en una edad análoga a la peri-adolescencia, exhiben mayor consumo en comparación con las ratas adultas, pero estas segundas tienen consumos constantes a largo plazo, así como se ha observado en la conducta humana, con consumos exploratorias de alcohol durante la adolescencia (Volkow., 2000). Dentro de los pilotos se consideraron dos edades, una comparable con la adolescencia-adulto joven y edad adulta. En el resultado de los pilotos, una edad análoga a adultos jóvenes y en una concentración al 20% fue la que obtuvieron resultados más consistentes, con un consumo mayor a los 2 gr/kg/ml (Bell y cols., 2014) que es el consumo que se describe constante en las ratas wistar que muestran características de consumo constante de alcohol (Sauton y cols., 2020).

Secundario a determinar la edad de inicio del modelo a los 65 días de edad de las ratas wistar, la concentración al 20% y se implementó el protocolo de acceso intermitente a dos botellas según Simms y cols., (2008), el cual también reportó que solo el 30% de los sujetos desarrollaron un consumo constante. Analizando los resultados de este estudio, obtuvimos que de 22 ratas que tuvieron la elección a la botella de alcohol, solo uno se manifestó un consumo menor a 2 gr/kg/24horas. En contraste, los resultados del consumo de cada rata a lo largo de las sesiones muestran variabilidad, al contrario de los resultados de Simms y cols., (2008) donde pronuncian que el consumo se vuelve estable después de la sexta sesión de exposición a alcohol. Sin embargo, se encontró al explorar los consumos individuales, un consumo de hasta 11 gr/kg/día, que, al promediarse con el resto de las ratas del grupo, no era evidente que existían consumos altos por el resultado del promedio con aquellos de consumos bajos. La variabilidad en el registro del consumo, son debidas al goteo de la botella por error de colocación, y según lo reportado por Sabry y cols., (2020) la administración de alcohol lleva a una alteración en el comportamiento motor y exploratorio de las ratas, así como un aumento en la ansiedad, por lo que sus interacciones con las botellas pudieron ser la razón de las pérdidas que provocaron finalmente la variabilidad.

Entonces fue necesario realizar el análisis de consumo individual como el propuesto en Tivis y cols., (1995) para poder agrupar a los altos consumidores de

los bajos. Este se basa en la agrupación jerárquica, por medio de características comunes, en el cual se determina la similitud o las diferencias respecto a la variable por la que se agrupan, en este caso, el consumo a través de las sesiones de exposición a alcohol. Se encontró que 12 ratas se separaron de las restantes 10, por presentar una similitud en su consumo que los separó como un grupo de alto consumo, representando el 54% de los sujetos, lo cual es mayor a lo anteriormente ya abordado de Simms y cols., (2008).

Establecer el modelo de consumo de alcohol fue un objetivo específico necesario, para poder estudiar el trastorno por uso de alcohol con un modelo preclínico. Lo siguiente fue determinar un área esencial del circuito mesocorticolímbico o de recompensa según Koob y cols., (2013) que se ha relacionado con una disregulación en el circuito (Broadwater et al., 2018). El lóbulo prelímbico que es análogo a la corteza prefrontal medial, la cual se activa en respuesta a señales que se relacionan con la sustancia. Se ha asociado que el déficit en la habilidad para inhibir las respuestas asociadas a las drogas proviene de un control reducido de aferencias de la corteza prefrontal medial a las regiones del estriado (Goldstein y Volkow, 2002). Otra área importante del circuito es el núcleo accumbens, que integra impulsos corticales y envía aferencias a la corteza prefrontal medial, se conoce como una zona importante para la motivación y otorgarles propiedades recompensantes a las sustancias (Koob y Volkow, 2010). El alcohol facilita la liberación de dopamina en el núcleo accumbens a través de la estimulación del VTA o sobre el mismo núcleo (Koob., 2016) y también se hipotetiza que el alcohol facilita la liberación de los péptidos opioides en VTA, núcleo accumbens y núcleo central de la amígdala. En el estudio de Voges y cols., (2013) cinco sujetos humanos voluntarios con trastorno por uso de alcohol lograron mejorar las respuestas recompensantes, y de inhibición a las señales asociadas a las drogas, es decir aumentaron los días de abstinencia y disminuyeron las ansias por consumir. Esto bajo un tratamiento de estimulación cerebral profunda en el núcleo accumbens bilateral. Por otro lado, en el estudio de Levy y cols., (2007) estimuló eléctricamente la corteza prelímbica (PL) en ratas bajo un modelo operante de autoadministración de cocaína, y encontró que disminuyeron el

consumo, esta conducta se mantuvo aún después de tres meses de abstinencia y disminuyó también las ansias de consumo. En este estudio se implantaron los electrodos en la PL bilateral en ratas, pues también en los tratamientos para padecimientos neuropsiquiátricos en humanos es la región más utilizada (Diana y cols., 2017). Los resultados de la estimulación activa contra la simulada o sham no son concluyentes por mostrar una variabilidad en el consumo previo, durante y después del tratamiento. A pesar de lo anterior, después del análisis de conglomerados jerárquico las 6 de 8 ratas que recibieron tratamiento activo/sham fueron de alto consumo, de este grupo las dos ratas con el consumo más alto recibieron tratamiento activo y sham. Estas dos últimas ratas mencionadas, mostraron disminución del consumo antes y después del tratamiento (Figura 22). Esto podría corresponder a lo encontrado por Henricks., y cols., (2019), quienes estudiaron las oscilaciones corticales en PFC y NAc, por medio de registros locales de campo, encontrando que ratas con consumos altos presentan aumento en la potencia y coherencia de las oscilaciones gamma (45 Hz - 90 Hz). También encontraron que al estimular las zonas eléctricamente con alta frecuencia, sólo las ratas con altos consumos lo decrementan, en contraposición con las de bajo consumo. Para explicar por qué la rata con tratamiento simulado también disminuyó el consumo, Chakravarty y cols., (2016) sugieren que la simple cirugía de implantación de electrodos genera un cambio morfológico local que en sí mismo puede ocasionar una mejoría clínica en distintos padecimientos.

Referente a los parámetros de estimulación, la alta frecuencia de estimulación al 20 Hz tiene un efecto facilitador cortical con un fenómeno tipo LTP (Levy y cols., 2008), que se traduce como una excitación cortical con aumento de la actividad glutamatérgica, que también depende de la intensidad y la duración de los pulsos (Wu y col., 2000). La estimulación se aplica en trenes de pulsos como lo describe (Diana y cols., 2017) pues induce efectos en la actividad cortical duraderos, este tren tiene una distancia de 20 segundos al tener un efecto facilitador intracortical.

Entonces, la pregunta de este proyecto de tesis fue: ¿estimular eléctricamente y focalizada en un área esencial del sistema de recompensa, la corteza prelímbica, podrá disminuir el consumo de alcohol en sujetos que se haya establecido un

consumo crónico? De acuerdo con los hallazgos anteriormente contrastados en esta discusión, es necesario contar con una muestra mayor de ratas de alto consumo para así aportar más evidencia a la disminución de consumo y realizar registros locales de campo en la población neuronal de la zona de estimulación y contiguas para comprobar los hallazgos.

Respecto a los hallazgos en las pruebas de conducta, según Chanraud y cols., (2010) en humanos con exposición crónica al alcohol, surgen procesos patológicos en los circuitos cerebrales, que comprometen precisamente la habilidad para el procesamiento de información y la toma de decisiones, especialmente en periodos de alta demanda cognitiva. En contraste con nuestros resultados, no existen diferencias significativas entre los grupos en las pruebas de laberinto elevado y reconocimiento de objeto novedoso. Que, en los sujetos con intervención quirúrgica, representa un hallazgo positivo de lograr replicar estos resultados con una muestra más grande.

10.1. Alcances y Limitaciones

Los estudios de neuromodulación van en aumento conforme pasa el tiempo. Sin embargo, aún no existe un consenso general sobre cómo definir los parámetros de estimulación. El estudio de donde se deriva el presente trabajo de tesis es parte de un proyecto mayor, en el que se adquirieron datos de resonancia magnética, conducta e inmunohistología. Por lo que, al concluirse los análisis del resto de los datos, será el primero en poseer este enfoque multidimensional, con el objetivo final de que sus resultados puedan ser traslacionales, al ser replicables en otras especies.

La limitante principal es el tamaño de muestra, que complicó la aplicación de estadística inferencial, sin embargo, es valioso este estudio exploratorio y a que permitirá continuar y realizar ajuste al modelo experimental propuesto.

11. Conclusión

Este estudio forma parte de un proyecto mayor donde se implementó por primera vez en el Instituto de Neurobiología, un modelo preclínico de toma de alcohol crónico en rata wistar. Así mismo se construyeron electrodos de carbono para la estimulación eléctrica compatibles con el resonador magnético, también sin precedente en el INB la adquisición de secuencias de resonancia magnética estructural, funcional y de difusión en los sujetos implantados con estos electrodos. Partiendo de la pregunta de investigación, nos planteamos si ¿era posible estimular eléctricamente y focalizada en un área esencial del sistema de recompensa y esto disminuiría el consumo de alcohol? Con base en nuestros resultados, la disminución de la toma de alcohol en sujetos con muy alto consumo parece factible. Tal caso nos motiva para continuar desarrollando la línea de investigación, y analizar los datos que también se obtuvieron a la par del desarrollo de esta, como son aquellos de neuroimagen, conducta e inmunofluorescencia. Y así logremos contribuir de manera más significativa a dilucidar las bases neurales del mecanismo de acción de la estimulación eléctrica como terapia neuromoduladora, y del trastorno por uso de alcohol.

12. Referencias

- Addolorato, G., Antonelli, M., Cocciolillo, F., Vassallo, G. A., Tarli, C., Sestito, L., ... & Miceli, A. (2017). Deep transcranial magnetic stimulation of the dorsolateral prefrontal cortex in alcohol use disorder patients: effects on dopamine transporter availability and alcohol intake. *European Neuropsychopharmacology*, 27(5), 450-461.
- American Psychiatric Association. (2014). *Guía de consulta de los criterios diagnósticos del DSM-5: Spanish Edition of the Desk Reference to the Diagnostic Criteria From DSM-5*. American Psychiatric Pub.
- Alshehri, F. S., & Sari, Y. (2016). Binge ethanol withdrawal: effects on post-withdrawal ethanol intake, glutamate–glutamine cycle and monoamine tissue content in P rat model. *Behavioural brain research*, 303, 120-125.
- Ashburner y Friston. (2004). *Human brain function*. Chapter 6 “Morphometry”. Elsevier.
- Bashir, S., Edwards, D. & Pascual-Leone, A. Neuronavigation increases the physiologic and behavioral effects of low-frequency rTMS of primary motor cortex in healthy subjects. *Brain Topogr.* **24**, 54–64 (2011).
- Belin D, Jonkman S, Dickinson A, Robbins TW, Everitt BJ. Parallel and interactive learning processes within the basal ganglia: relevance for the understanding of addiction. *Behav Brain Res* 2009; 199: 89–102. [PubMed: 18950658]
- Bell, S. (2012). *A dictionary of forensic science*. Oxford University Press.
- Bell, R. L., Rodd, Z. A., Lumeng, L., Murphy, J. M., & McBride, W. J. (2006). The alcohol-preferring P rat and animal models of excessive alcohol drinking. *Addiction biology*, 11(3-4), 270-288.
- Brodie, M. S. (2002). Increased ethanol excitation of dopaminergic neurons of the ventral tegmental area after chronic ethanol treatment. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 26(7), 1024-1030.
- Carlezon, W. A., Todtenkopf, M. S., McPhie, D. L., Pimentel, P., Pliakas, A. M., Stellar, J. R., & Trzcinska, M. (2001). Repeated exposure to rewarding brain

- stimulation downregulates GluR1 expression in the ventral tegmental area. *Neuropsychopharmacology*, 25(2), 234-241.
- Chakravarty, M. M., Hamani, C., Martinez-Canabal, A., Ellegood, J., Laliberté, C., Nobrega, J. N., ... & Lerch, J. P. (2016). Deep brain stimulation of the ventromedial prefrontal cortex causes reorganization of neuronal processes and vasculature. *Neuroimage*, 125, 422-427.
- Chanraud, S., Pitel, A. L., Rohlfing, T., Pfefferbaum, A., & Sullivan, E. V. (2010). Dual tasking and working memory in alcoholism: relation to fronto cerebellar circuitry. *Neuropsychopharmacology*, 35(9), 1868.
- Crabbe, J. C., Harris, R. A., & Koob, G. F. (2011). Preclinical studies of alcohol binge drinking. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1216, 24.
- DeWitt SJ, Ketcherside A, McQueeney TM, Dunlop JP, Filbey FM. The hyper-sentient addict: an exteroception model of addiction. *Am J Drug Alcohol Abuse* 41: 374–381, 2015. doi:10.3109/00952990.2015.1049701.
- Diana, M., Raij, T., Melis, M., Nummenmaa, A., Leggio, L., & Bonci, A. (2017). Rehabilitating the addicted brain with transcranial magnetic stimulation. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(11), 685.
- Domjan, M. (2010). *Principios de aprendizaje y conducta: Michael Domjan*. México DF: Cengage Learning pp. 60.
- Dudchenko, P. A. (2004). An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28(7), 699-709.
- Dunn J.P. Kessler R. M., Feurer I. D., Volkow N. D., Patterson B. W., Ansari M. S., LiR , Marks- Shulman P, Abumrad NN. Relationship of dopamine type 2 receptor binding potential with fasting neuroendocrine hormones and insulin sensitivity in human obesity. *Diabetes Care* 35: 1105–1111, 2012. doi:10.2337/dc11-2250.
- Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nature neuroscience*, 8(11), 1481.
- Ferenczi, E. & Deisseroth, K. Illuminating next- generation brain therapies. *Nat. Neurosci.* 19, 414–416 (2016).

- Franke H, Kittner H, Berger P, Wirkner K, Schramek J (1997) The reaction of astrocytes and neurons in the hippocampus of adult rats during chronic ethanol treatment and correlations to behavioral impairments. *Alcohol* 14:445– 454.
- Gallino, D., Devenyi, G. A., Germann, J., Guma, E., Anastassiadis, C., & Chakravarty, M. M. (2019). Longitudinal assessment of the neuroanatomical consequences of deep brain stimulation: Application of fornical DBS in an Alzheimer's mouse model. *Brain research*, 1715, 213-223.
- Gilpin, N. W., & Koob, G. F. (2008). Neurobiology of alcohol dependence: focus on motivational mechanisms. *Alcohol research & health: the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 31(3), 185–195.
- Goodman, A. (1990). Addiction: definition and implications. *British journal of addiction*, 85(11), 1403-1408.
- Guleyupoglu, B., Schestatsky, P., Edwards, D., Fregni, F., & Bikson, M. (2013). Classification of methods in transcranial electrical stimulation (tES) and evolving strategy from historical approaches to contemporary innovations. *Journal of neuroscience methods*, 219(2), 297-311.
- Grüsser, S. M., Wrase, J., Klein, S., Hermann, D., Smolka, M. N., Ruf, M., ... & Heinz, A. (2004). Cue-induced activation of the striatum and medial prefrontal cortex is associated with subsequent relapse in abstinent alcoholics. *Psychopharmacology*, 175(3), 296-302.
- Hair, J. F., Anderson, R. E., Tatham, R. I. y Black, W. (1999). *Análisis Multivariante*. 5 edición. Editorial Prentice Hall. Madrid.
- Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Instituto Nacional de Salud Pública, Secretaría de Salud. Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco 2016-2017: Reporte de Alcohol [Internet]. Ciudad de México: INPRFM; 2017. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud%7Cconadic/acciones-y-programas/encuesta-nacional-deconsumo-de-drogas-alcohol-y-tabaco-encodat-2016-2017-136758>.
- Jernigan, T. L., Butters, N., DiTraglia, G., Schafer, K., Smith, T., Irwin, M., ... & Cermak, L. S. (1991). Reduced cerebral grey matter observed in alcoholics using

- magnetic resonance imaging. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 15(3), 418-427.
- Johnston, M. V. (2004). Clinical disorders of brain plasticity. *Brain and Development*, 26(2), 7380.
- Jonas DE, Amick HR, Feltner C, et al: *Pharmacotherapy for Adults With Alcohol-Use Disorders in Outpatient Settings* [Internet]. Rockville, MD, Agency for Healthcare Research and Quality, 2014.
- Kallupi, M., Varodayan, F. P., Oleata, C. S., Correia, D., Luu, G., & Roberto, M. (2014). Nociceptin/orphanin FQ decreases glutamate transmission and blocks ethanol-induced effects in the central amygdala of naive and ethanol-dependent rats. *Neuropsychopharmacology*, 39(5), 1081-1092.
- Keller, F. S., Schoenfeld, W. N., & Daurella, N. (1979). *Fundamentos de psicología*. Fontanella p.p. 52.
- Kravitz, A.V., Tye, L.D., and Kreitzer, A.C. (2012). Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nat. Neurosci.* 15, 816–818.
- Kril, J. J., Halliday, G. M., Svoboda, M. D., & Cartwright, H. (1997). The cerebral cortex is damaged in chronic alcoholics. *Neuroscience*, 79(4), 983-998.
- Klüver H, Barrera E. A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1953; 12: 400-3.
- Koob, G. F., Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (2013). Reward, motivation, and addiction. In *Fundamental neuroscience* (pp. 871-898). Academic Press.
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2016). Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The Lancet Psychiatry*, 3(8), 760-773.
- Krames, E. S., Peckham, P. H., Rezai, A., & Aboelsaad, F. (2009). What is neuromodulation? In *Neuromodulation* (pp. 3-8). Academic Press.
- Laxton, A. W., Tang-Wai, D. F., McAndrews, M. P., Zumsteg, D., Wennberg, R., Keren, R., ... & Lozano, A. M. (2010). A phase I trial of deep brain stimulation of memory circuits in Alzheimer's disease. *Annals of neurology*, 68(4), 521-534.
- Leshner, A. I. (1997). Addiction is a brain disease, and it matters. *Science*, 278(5335), 45-47.

- Lester, D., & Freed, E. X. (1973). Criteria for an animal model of alcoholism. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1(1), 103-107.
- Levy, D., Shabat-Simon, M., Shalev, U., Barnea-Ygael, N., Cooper, A., & Zangen, A. (2007). Repeated electrical stimulation of reward-related brain regions affects cocaine but not “natural” reinforcement. *Journal of Neuroscience*, 27(51), 14179-14189.
- Lozano, Andres M., and Nir Lipsman. "Probing and regulating dysfunctional circuits using deep brain stimulation." *Neuron* 77.3 (2013): 406-424.
- Lu, Wei-Yang, et al. "Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons." *Neuron* 29.1 (2001): 243-254.
- Nestler, E. J., & Aghajanian, G. K. (1997). Molecular and cellular basis of addiction. *Science*, 278(5335), 58-63.
- National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. (2004). NIAAA council approves definition of binge drinking. *NIAAA newsletter*, 3(3).
- Noronha, A., Cui, C., Harris, R. A., & Crabbe, J. C. (Eds.). (2014). *Neurobiology of alcohol dependence*. Elsevier.
- Makris, N., Oscar-Berman, M., Jaffin, S. K., Hodge, S. M., Kennedy, D. N., Caviness, V. S., ... & Harris, G. J. (2008). Decreased volume of the brain reward system in alcoholism. *Biological psychiatry*, 64(3), 192-202.
- Ma, T., Cheng, Y., Hellard, E. R., Wang, X., Lu, J., Gao, X., ... & Wang, J. (2018). Bidirectional and long-lasting control of alcohol-seeking behavior by corticostriatal LTP and LTD. *Nature neuroscience*, 21(3), 373-383.
- Mantsch JR, Baker DA, Funk D, Lê AD, Shaham Y. Stress-Induced Reinstatement of Drug Seeking: 20 Years of Progress. *Neuropsychopharmacology* 41: 335–356, 2016. doi:10.1038/npp.2015.142.
- Matsumiya, L. C., Sorge, R. E., Sotocinal, S. G., Tabaka, J. M., Wieskopf, J. S., Zaloum, A., ... & Mogil, J. S. (2012). Using the Mouse Grimace Scale to reevaluate the efficacy of postoperative analgesics in laboratory mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 51(1), 42-49.

- McBride, W. J., & Li, T. K. (1998). Animal models of alcoholism: neurobiology of high alcohol-drinking behavior in rodents. *Critical Reviews™ in Neurobiology*, 12(4).
- McLellan, A. T., Lewis, D. C., O'Brien, C. P., & Kleber, H. D. (2000). Drug dependence, a chronic medical illness: implications for treatment, insurance, and outcomes evaluation. *Jama*, 284(13), 1689-1695.
- Möykkynen, T., & Korpi, E. R. (2012). Acute effects of ethanol on glutamate receptors. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 111(1), 4-13.
- Oberman, L. (2014). Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) protocols. In *Transcranial magnetic stimulation* (pp. 129-139). Humana Press, New York, NY.
- Owesson-White, C. A., Ariansen, J., Stuber, G. D., Cleaveland, N. A., Cheer, J. F., Mark Wightman, R., & Carelli, R. M. (2009). Neural encoding of cocaine-seeking behavior is coincident with phasic dopamine release in the accumbens core and shell. *European Journal of Neuroscience*, 30(6), 1117-1127.
- Paulus, M.P., Tapert, S. F., Schulteis, G. The role of interoception and alliesthesia in addiction. *Pharmacol Biochem Behav* 94: 1–7, 2009. doi:10.1016/j.pbb.2009.08.005.
- Perini, I., Kämpe, R., Arlestig, T., Karlsson, H., Löfberg, A., Pietrzak, M., ... & Heilig, M. (2019). Repetitive transcranial magnetic stimulation targeting the insular cortex for reduction of heavy drinking in treatment-seeking alcohol-dependent subjects: a randomized controlled trial. *Neuropsychopharmacology*, 1-10.
- Pfefferbaum, A., Sullivan, E. V., Rosenbloom, M. J., Mathalon, D. H., & Lim, K. O. (1998). A controlled study of cortical gray matter and ventricular changes in alcoholic men over a 5-year interval. *Archives of general psychiatry*, 55(10), 905-912.
- Porta, M. (2018). *A Dictionary of Public Health*. Oxford University Press.
- Rigalli, A., & Di Loreto, V. (Eds.). (2016). *Experimental surgical models in the laboratory rat*. CRC Press.
- Roger Sánchez, C., García Pardo, M. P., & Aguilar Calpe, M. A. (2016). Condicionamiento de preferencia de lugar: un modelo animal para evaluar las

- propiedades motivacionales de las drogas. *Escritos de Psicología (Internet)*, 9(2), 53-62.
- Sabry FM, Ibrahim MK, Hamed MR, Ahmed HMS. Neurobehavioral effects of alcohol in overcrowded male adolescent rats. *Neurosci Lett*. 2020 Jul 13;731:135084. doi: 10.1016/j.neulet.2020.135084. Epub 2020 May 30. PMID: 32485284.
- Sankar, T., Lipsman, N., & Lozano, A. M. (2014). Deep brain stimulation for disorders of memory and cognition. *Neurotherapeutics*, 11(3), 527-534.
- Santana-Chávez, G., Rodríguez-Moreno, P., López-Hidalgo, M., Olivares-Moreno, R., Moreno-López, Y., & Rojas-Piloni, G. (2020). Operant conditioning paradigm for juxtacellular recordings in functionally identified cortical neurons during motor execution in head-fixed rats. *Journal of neuroscience methods*, 329, 108454.
- Simms, J. A., Steensland, P., Medina, B., Abernathy, K. E., Chandler, L. J., Wise, R., & Bartlett, S. E. (2008). Intermittent access to 20% ethanol induces high ethanol consumption in Long–Evans and Wistar rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 32(10), 1816-1823.
- Schröder, L., & Faber, C. (2011). *In vivo NMR Imaging*. Humana Press.
- Sinclair, J. D., & Li, T. K. (1989). Long and short alcohol deprivation: effects on AA and P alcohol-preferring rats. *Alcohol*, 6(6), 505-509.
- Sharma, A. C., & Kulkarni, S. K. (1992). Evaluation of learning and memory mechanisms employing elevated plus-maze in rats and mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 16(1), 117-125.
- Spanagel, R. (2017). Animal models of addiction. *Dialogues in clinical neuroscience*, 19(3), 247.
- Stone, S. S., Teixeira, C. M., DeVito, L. M., Zaslavsky, K., Josselyn, S. A., Lozano, A. M., & Frankland, P. W. (2011). Stimulation of entorhinal cortex promotes adult neurogenesis and facilitates spatial memory. *Journal of Neuroscience*, 31(38), 13469-13484.
- 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.

- Tress, O., Maglione, M., May, D., Pivneva, T., Richter, N., Seyfarth, J., ... Willecke, K. (2012). Panglial gap junctional communication is essential for maintenance of myelin in the CNS. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(22), 7499–7518.
- Ungless, M. A., Argilli, E., & Bonci, A. (2010). Effects of stress and aversion on dopamine neurons: implications for addiction. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(2), 151-156.
- Volkow, N. D., Jones, E. B., Einstein, E. B., & Wargo, E. M. (2019). Prevention and treatment of opioid misuse and addiction: a review. *JAMA psychiatry*, 76(2), 208-216.
- Volkow, N. D., Fowler J. S. Addiction, a disease of compulsion and drive: involvement of the orbitofrontal cortex. *Cereb Cortex* 10: 318 –325, 2000. doi:10.1093/cercor/10.3. 318.
- Vorel, S. R., Liu, X., Hayes, R. J., Spector, J. A., & Gardner, E. L. (2001). Relapse to cocaine-seeking after hippocampal theta burst stimulation. *Science*, 292(5519), 1175-1178.
- Vöröslakos, M., Takeuchi, Y., Brinyiczki, K., Zombori, T., Oliva, A., Fernández-Ruiz, A., ... & Berényi, A. (2018). Direct effects of transcranial electric stimulation on brain circuits in rats and humans. *Nature communications*, 9(1), 483.
- Wichmann, Thomas, and Mahlon R. DeLong. "Deep brain stimulation for neurologic and neuropsychiatric disorders." *Neuron* 52.1 (2006): 197-204.
- Wrase, J., Grüsser, S. M., Klein, S., Diener, C., Hermann, D., Flor, H., ... & Heinz, A. (2002). Development of alcohol-associated cues and cue-induced brain activation in alcoholics. *European Psychiatry*, 17(5), 287-291.
- Rao, P. S. S., Bell, R. L., Engleman, E. A., & Sari, Y. (2015). Targeting glutamate uptake to treat alcohol use disorders. *Frontiers in neuroscience*, 9, 144.
- 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.
- Zhang R, Volkow ND. Brain default-mode network dysfunction in addiction. *Neuro-image* 200: 313–331, 2019.

Zhao, Q., Zhang, K., Zhu, S., Xu, H., Cao, D., Zhao, L., ... & Yin, W. (2019). Review on the electrical resistance/conductivity of carbon fiber reinforced polymer. *Applied Sciences*, 9(11), 2390.

Anexos

| Tabla 1. Resultados del consumo promedio por grupo según el análisis de conglomerados jerárquicos. | | |
|--|-------------------|--|
| Categoría de consumo | Número de sujetos | Media de consumo en m/kg/24 hrs y desviación estándar. |
| Alto Consumo | 12 | 8.66 ± 1.35 |
| Bajo Consumo | 10 | 4.89 ± 0.90 |

| Tabla 2. Grupo de alto consumo de ratas sometidas a cirugía | | |
|---|------------------------------|-------------|
| Rata | Consumo medio en m/kg/24 hrs | Tratamiento |
| 1 | 7.75 | Sham |
| 2 | 6.78 | Activa |
| 17 | 8.97 | Sham |
| 18 | 8.56 | Activa |
| 25 | 9.89 | Activa |
| 26 | 11.88 | Sham |

| Tabla 3. Grupo de bajo consumo de ratas sometidas a cirugía | | |
|---|------------------------------|-------------|
| Rata | Consumo medio en m/kg/24 hrs | Tratamiento |
| 12 | 4.69 | Sham |
| 16 | 4.56 | Activa |