



[1][2]

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**Caracterización de la respuesta inmune a la administración de *Mycobacterium bovis* (bacilo de Calmette-Guerin) y su influencia sobre el efecto de la transmisión nicotínica en el sistema mesocortico-límbico**

### **Tesis**

que para optar el grado de  
Doctor en Ciencias Biomédicas

### **Presenta:**

Marco Antonio Sotomayor Sobrino

### **Director de tesis:**

Dra. Claudia Gómez Acevedo  
Facultad de Medicina

### **Comité tutor:**

Martha María León Olea  
Instituto Nacional de Psiquiatría

Y

Clara Inés Espitia Pinzón  
Instituto de Ciencias Biomédicas

Ciudad Universitaria, Unidad de Posgrado, Octubre del 2018



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.

## *Dedicatoria*

*A mi padre, Marco Antonio Sotomayor Orellana,  
porque siempre me has inspirado a ser una mejor  
persona y a cambiar el mundo.*

*A mi madre, María Eugenia Sobrino Bracamontes,  
porque siempre has guiado mis pasos y evitado que  
erre el camino.*

*Porque por ustedes soy lo que soy y a donde vaya los llevo conmigo, este y todos mis logros están dedicados a ustedes.*

### **Agradecimiento**

Este trabajo hubiera sido imposible sin la ayuda de un grupo grande de personas que nunca dudó en brindarme su ayuda, apoyo y entendimiento.

Primero que nada a la doctora Claudia Gómez Acevedo, por rescatarme a mi, a mis amigos y a muchos otros alumnos cuando estábamos perdidos, temerosos de no poder terminar nuestros posgrados, licenciaturas, trabajos y a punto de perder nuestra cordura; el trabajar con ella me permitió desarrollarme en el sentido científico, profesional y personal.

A Georgina Carranza Escalera, mi esposa, por mostrarme con su ejemplo a nunca rendirme y afrontar las adversidades con alegría y optimismo.

A Abraham Ochoa Aguilar, mi amigo, por su inquebrantable lealtad, creatividad y enseñarme a ser paciente y tener fe en la gente.

A la doctora Martha León Olea por guiarme durante todo el proyecto y apoyarme durante los periodos de transición más difíciles, sin dejar de creer en el proyecto o en un servidor.

Al señor Arturo Castillo Tovar por nunca dudar en brindarme una mano con los experimentos o un oído para escuchar los problemas que aparecieron en el camino.

A mis hermanos Juan Carlos Sotomayor y Luis Fernando Sotomayor por siempre estar a mi lado y no dejarme desfallecer.

## Resumen

El campo de la neuroinmunología ha avanzado en los últimos años, con importantes descubrimientos en el entendimiento de patologías del sistema nervioso como el autismo, el infarto y la depresión, entre otros. Sin embargo, no se ha explorado la relación entre la inflamación y la motivación para consumir sustancias de abuso, por lo que nuestro objetivo fue identificar si la inflamación dolorosa y no dolorosa son capaces de afectar la motivación para consumir morfina y nicotina.

Para evaluar la conducta motivada utilizamos el modelo de preferencia de sitio condicionado con morfina y con nicotina en animales con inflamación dolorosa y no dolorosa. Utilizamos 2 modelos de inflamación, el primero fue la administración de carragenina intraplantar (250 o 750  $\mu$ l al 1%) en ratas con o sin sensibilidad en la pata; el segundo modelo fue la administración intraperitoneal del bacilo de *Calmette-Guerin* (BCG)  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias (UFC). Encontramos que ambos estímulos inflamatorios inhiben la preferencia de sitio condicionada con morfina, y la administración de ibuprofeno recuperaba la preferencia de sitio en el modelo de carragenina, pero no tenía ningún efecto en la inflamación inducida con el BCG. En el modelo de nicotina, también encontramos un bloqueo de la preferencia de sitio condicionada con ambos modelos de inflamación y de nuevo el ibuprofeno recupera el efecto de la nicotina en el modelo de carragenina, pero no en el de BCG. Al probar con aversión de sitio condicionada, la carragenina no muestra ningún efecto, mientras que el BCG también bloquea esta forma de condicionamiento, en este modelo el ibuprofeno no presenta ningún efecto.

Estos experimentos demuestran que la inflamación no dolorosa inhibe las respuestas de preferencia y aversión de sitio condicionadas sugiriendo un efecto sobre el sistema de recompensa, lo que parece indicar que existen al menos 2 mecanismos diferentes, siendo uno sensible a modulación por ibuprofeno, mientras que el otro es resistente.

### **Palabras clave**

Recompensa; aversión; morfina; nicotina; inflamación; ibuprofeno

### **Abstract**

The field of neuroimmunology has expanded in recent years providing new insight and therapies into pathologies like stroke, autism, and depression. However few works have explored the relationship between inflammatory stimuli and motivation. Thus, the aim of this study was to determine how painful and non-painful inflammatory stimuli affect reward behavior induced by morphine and nicotine. To test reward-response, we used morphine and nicotine induced conditioned place-preference and place-aversion model in rats with non-painful inflammation. Inflammation was induced by two distinct methods: In the non-painful infectious inflammation, 24 hrs prior to conditioning sessions an injection with *Calmette-Guerin bacillus* (CGB)  $1 \times 10^7$  cfu ip was administered. To produce non-painful non-infectious inflammation 24 hrs prior to conditioning sessions, the rats' sciatic nerve was blocked and cut, followed by the injection of carrageenan 750 $\mu$ l in the paw. Cytokine concentration was measured to determine the inflammatory profile of each of our models.

Finally, we administered ibuprofen to determine if it could prevent the effect of inflammation over conditioned place-preference.

We showed that carrageenan significantly reduced the morphine-induced reward. Non-painful inflammatory stimulus induced both with CGB and carrageenan, inhibit the conditioned place-preference to morphine and nicotine, furthermore the administration of CGB also block conditioned place-aversion to nicotine, but carrageenan had no effect on conditioned-place aversion. The administration of ibuprofen reinstates conditioned place-preference to morphine and nicotine in the carrageenan model, but has no effect in the CGB model, and

finally ibuprofen has no effect in either of the conditioned-place aversion tested. Our data suggest that non-painful- inflammatory stimuli inhibit the reward system, independent of cytokine concentration. Also, the administration of a PGE 2 inhibitor can importantly modulate this phenomenon.

### **Key words**

Reward; aversion; inflammation; morphine; nicotine; ibuprofen

### **Índice**

#### **1. Introducción**

##### 1.1 Conducta de recompensa

###### 1.1.1 Sustratos anatómicos y funcionales de la recompensa

##### 1.2 Interacciones entre el sistema inmune y el sistema de recompensa

###### 1.2.1 Interacciones con el glutamato

###### 1.2.2 Interacciones con sistemas monoaminérgicos

###### 1.2.3 Interacciones con acetilcolina

###### 1.2.4 Interacciones con opioides

##### 1.3 Efectos de la inflamación sobre la conducta

#### **2. Razonamiento científico**

##### 2.1 Justificación y planteamiento del problema

##### 2.2 Hipótesis

##### 2.3 Objetivos Generales

##### 2.4 Objetivos Particulares

#### **3. Material y métodos**

##### 3.1 Preferencia de sitio condicionada

##### 3.2 Administración de fármacos

##### 3.3 Grupos experimentales

##### 3.4 Técnica quirúrgica de denervación

##### 3.5 Fármacos antiinflamatorios

##### 3.6 Análisis de datos

#### **4. Resultados**

4.1 La inflamación dolorosa con carragenina inhibe la preferencia de sitio condicionada con morfina

4.2 La inflamación no dolorosa con carragenina inhibe la preferencia de sitio condicionada con morfina

4.3 El ibuprofeno re-establece la CPP en el modelo de carragenina, pero no en el de BCG

4.4 La inflamación no dolorosa con carragenina y BCG inhibe la preferencia de sitio condicionada con nicotina

4.5 La inflamación no dolorosa con carragenina no tiene efecto sobre la aversión de sitio condicionada con nicotina; el BCG la bloquea

4.6 La carragenina reduce significativamente la concentración en suero de TNF $\alpha$ , IL12 e INF $\gamma$  y no afecta IL10, el BCG no afecta la concentración de ninguna citocina

## **5. Discusión**

## **6. Conclusiones**

## **7. Perspectivas**

## **8. Referencias**

## **9. Índice de Figuras**

## **10. Abreviaturas**

### **1.- Introducción**

#### **1.1 Conducta de recompensa**

El sistema de motivación del cerebro es un sistema intrincado de estructuras interconectadas con poderosos efectos sobre la conducta, generando un rango de conductas desde normales y necesarias, hasta patológicas e incapacitantes.

La influencia de este sistema es particularmente importante en el contexto de la adicción ya que estudios en modelos animales han mostrado que la exposición repetida a sustancias de abuso genera una robusta autoadministración, preferencia de sitio condicionada (CPP) y preferencia en el consumo de la sustancia (Lynch y Nicholson, 2010). En humanos, se ha observado que la accesibilidad a sustancias de abuso genera uso compulsivo y dependencia. Estos efectos pueden ser vistos en las epidemias actuales de consumo de sustancias como los opioides o el tabaco (Alexander 2015; OMS,



Figura 1. (tomada de Merrer y Becker 2009): Distribución general de los receptores opioides en el cerebro detectados por inmunofluorescencia. Se puede apreciar la ubicuidad de estos receptores, debido a esto tienen efectos importantes sobre la función de casi todas las estructuras cerebrales.

Los agonistas opioidérgicos inducen un efecto de recompensa únicamente cuando activan al MOR y en menor medida al DOR, mientras que el KOR genera disforia y aversión (Merrer y Becker, 2009; Johnson y North, 1992)

En modelos animales los agonistas de los receptores Mu son auto administrados en el VTA y en el NAc, y se ha observado que su administración facilita el desarrollo de CPP a alimentos dulces o a otros fármacos adictivos; lo opuesto sucede con los antagonistas de este receptor (Shaham y Stewart 1996), la morfina administrada en la periferia o en sistema nervioso central provoca conducta de autoadministración y preferencia de sitio condicionada (Shaham y Stewart 1996; Fields y Margolis 2015).

Por otro lado tenemos a la nicotina; el sistema nicotínico se comunica a través de receptores del mismo nombre; todos los receptores de este grupo están acoplados a canales iónicos permeables al sodio ( $\text{Na}^+$ ), por lo que su función es, en términos generales, excitatoria (De Biasi y Salas 2008). Su distribución es también ubicua, pero hay una gran densidad de receptores en las estructuras del sistema de motivación antes mencionado como el NAc, VTA, AM y PFC (De Biasi y Salas 2008; D'Souza y Markou 2011), e interactúa con numerosos neurotransmisores esenciales en el proceso de recompensa como el glutamato, y la dopamina (D'Souza y Markou 2011; Benowitz et. al. 2009) que serán mencionados más adelante (ver tabla 1: se muestra un resumen del efecto de la nicotina sobre la liberación de otros neurotransmisores).

	Glu	ACh	DA	GABA	NA
Cerebellum	$\alpha 7$ (r) [4]				
Cortex	$\alpha 7$ (r) <sup>a</sup> [10] $\beta 2^*$ (r) [11,62]	$\alpha 4\beta 2^*$ (r) [11] $\alpha x\beta 4^*$ (r) [11]	$\alpha 3\beta 2^*$ (h) [63] $\alpha 4\beta 2^*$ (r) <sup>a</sup> [64] $\alpha 3$ and/or $\alpha 6\beta 2^*$ (r) $\alpha 3\beta 4^*$ (r) [11,65]		
Hippocampus	$\alpha 7$ (r) <sup>a</sup> [42]	$\alpha 4\beta 2^*$ (r) <sup>a</sup> [10] $\alpha x\beta 4^*$ (r) <sup>a</sup> [10]		$\alpha 7$ (r) [10] $\alpha 4\beta 2^*$ (r) [11]	$\alpha 3\beta 2^*$ (r) [10] $\alpha 4\beta 2^*$ (r) [11] $\alpha 3\beta 4^*$ (r) <sup>a</sup> [42] $\alpha 7$ (r) [11]
Interpeduncular nucleus		$\beta 4^*$ (m) <sup>a</sup> [10]		$\alpha x\beta 2^*$ (m) [10]	
Hypothalamus					$x\beta 2^*$ (r) [66]
Midbrain			$\alpha 4\beta 2^*$ (m, r) [10]	$\alpha 4\beta 2^*$ (m, r) [10]	
Lateral geniculate nucleus	$\alpha 7$ (c) [10]				
Olfactory tubercle	$\alpha 7$ (r) [10]		$\alpha 4\beta 2^*$ (m) <sup>a</sup> [67], $\alpha 3$ and/or $\alpha 6\beta 2^*$ (m) [67]		
Superior colliculus	$\alpha 7$ (m) [68]			$\alpha 3\beta 2^*$ [68] and/or $\alpha 6\beta 2^*$ (m) [68]	
Striatum	$\alpha 7$ (r) [10]		$\alpha 4\beta 2^*$ (m) <sup>a</sup> [24,64,69] $\alpha 4\alpha 5\beta 2^*$ (m) <sup>a</sup> [24,69] $\alpha 6\alpha 4\beta 2\beta 3$ (m) <sup>a</sup> [24,69] $\alpha 6\beta 2\beta 3$ (m) <sup>a</sup> [24,64,69] $\alpha 7$ (r) [10]		
Thalamus			$\alpha 4\beta 2^*$ (m) [67]	$\alpha 4\beta 2^*$ (m) [10]	

<sup>a</sup>Tested in synaptosomes. Abbreviations: ACh, acetylcholine; c, chick; DA, dopamine; GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid; Glu, glutamate; h, human; m, mouse; NA, noradrenaline; r, rat.

Tabla 1 (tomada de tomado de Gotti 2012).- Efectos de la nicotina sobre la liberación de otros neurotransmisores por región del sistema nervioso central.

La nicotina periférica al ser administrada en ratas genera preferencia de sitio condicionada, existe autoadministración en vena y en VTA, también genera tras una administración crónica un aumento en la motricidad basal del animal (sensibilización motora) y síndrome de abstinencia (Benowitz et. al. 2009; Domino 2001).

Además de su efecto en la recompensa, la nicotina tiene un poderoso efecto tóxico y de aversión, cuando es administrada en dosis mayores la nicotina puede generar alteraciones importantes en la marcha y la coordinación e incluso llevar a convulsiones y a neurotoxicidad importantes (Benowitz et. al. 2009). La nicotina a estas dosis se acopla preferentemente a receptores de una estructura cerebral conocida como habénula lateral (HbL), la cual tiene numerosas proyecciones gabaérgicas a otras estructuras del sistema de recompensa, siendo de las principales el VTA, teniendo un efecto global de inhibición de este sistema y generando una respuesta aversiva (Frahm y Slimak 2011). Tanto en animales como en seres humanos una vez que se desarrolla estos efectos motores y neurológicos a estas sustancias es muy difícil revertir o bloquear estas respuestas, evidencia importante de esto es la falta de tratamientos efectivos para las adicciones en la actualidad (Alexander 2015; OMS 2015).

Para comprender de una manera más precisa la forma en la que estas sustancias afectan el cerebro de animales y humanos, y la compleja tarea que representa encontrar estrategias terapéuticas específicas y efectivas, primero debemos entender cómo funciona en situaciones fisiológicas el sistema de

recompensa y motivación, por lo que en la próxima sección analizaremos los componentes anatómicos y funcionales de este sistema neuronal.

### **1.1 Sustratos anatómicos y funcionales de la conducta de recompensa**

El sistema de recompensa tiene como principal propósito el integrar información sensorial y ambiental de diferentes sustancias o eventos para determinar su importancia en la supervivencia del animal y el mantenimiento de su especie, para después generar respuestas complejas (emocionales, motoras y cognitivas) encaminadas a reforzar conductas positivas y evitar conductas negativas.

Debido a esta compleja interacción es un tanto superficial diferenciar las estructuras del cerebro que pertenecen al sistema de recompensa y las que no, ya que prácticamente todas las estructuras están relacionadas de alguna manera; sin embargo, por motivos didácticos mencionaremos únicamente las más relevantes y más estudiadas.

Como se observa en la figura 2, al realizar una actividad placentera como, por ejemplo: escuchar música, estar con una persona amada, realizar algún deporte, comer algo delicioso, se producen estímulos externos que son procesados por diversas áreas cerebrales (la corteza auditiva, visual, somatosensorial, etc.) y convergen en un sitio del cerebro llamado VTA (Zald y Zatorre 2011).

Este es un sitio muy importante de síntesis del neurotransmisor dopamina (DA); cuyas neuronas proyectan a núcleos muy importantes de integración y es esta liberación dopaminérgica la que asigna la relevancia del estímulo que consumimos, por ejemplo, si estamos por probar por primera vez una barra de chocolate, al ser un alimento nuevo, causará una respuesta vigorosa del área ventral tegmental, aumentando la concentración de dopamina en el cerebro, esto generará la conducta motivada de querer consumir el chocolate (Morales y Margolis 2017; Siegel et al. 2006; Zald y Zatorre 2011).

Las proyecciones más importantes del VTA son 1) hacia la amígdala generando una respuesta emocional, 2) al hipocampo facilitando la consolidación de memorias asociadas al producto que consumimos, 3) a la PFC que procesa y hace consciente la relevancia del consumo que tuvimos y

4) a el NAc (Fields y Margolis 2015). En el NAc, una de las estructuras esenciales en el proceso de recompensa, se integran las proyecciones del sistema dopaminérgico, principalmente del VTA, con proyecciones de otras estructuras relevantes como la corteza (PFC y corteza insular) cuyas proyecciones son principalmente glutamatérgicas; la conjunción de estos estímulos, tanto dopaminérgicos como glutamatérgicos dará en el NAc una respuesta conductual final ya sea de recompensa y reforzamiento o de aversión y des-incentivación de la conducta, finalmente dando lugar a un proceso de potenciación a largo plazo en este núcleo volviendo definitiva la conducta (Morales y Margolis 2017; Wise y Morales 2010). Una vez que el NAc acaba de procesar el conjunto de estímulos que ha recibido, responde a su vez con proyecciones GABAérgicas hacia la PFC; y siendo esta última estructura esencial para el juicio y la inhibición de la conducta, estas proyecciones inhibitorias (gabaérgicas) facilitan la realización de la conducta, también pueden estar asociadas con una mayor impulsividad y eventualmente consumo compulsivo de la sustancia y en seres humanos la adicción (Laviolette y Van Der Kooy 2001; Smith et. al. 2009<sup>[3]</sup>).

Una vez que se ha activado el sistema motivacional se genera una respuesta contra reguladora, el NAc activa proyecciones GABAérgicas hacia el VTA encaminadas a inhibir la función del mismo, generando un circuito de retroalimentación negativo e inhibiendo la función global del sistema (Laviolette y Van Der Kooy 2001; Smith et. al. 2009). En la figura 2 mostramos un esquema simplificado de las principales estructuras y neurotransmisores implicados en la recompensa.

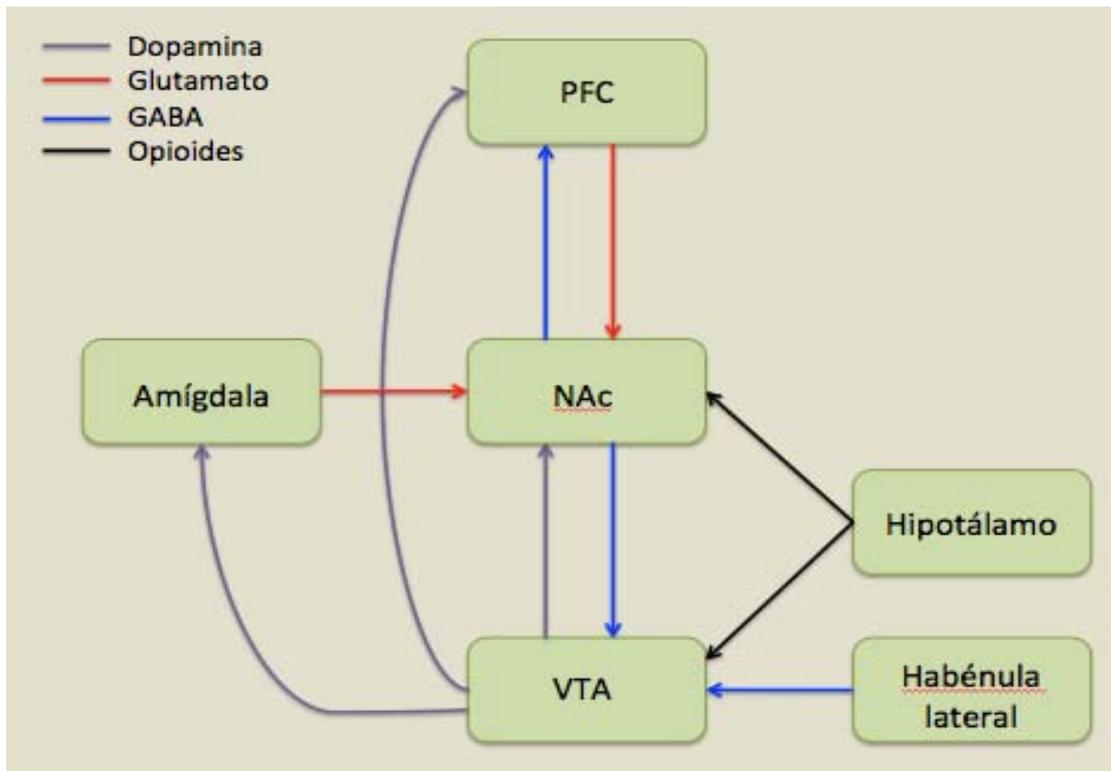


Figura 2: Esquema de las principales vías implicadas en la recompensa y la aversión con sus neurotransmisores implicados.

Como se ha presentado, el sistema de recompensa es un grupo de estructuras complejas comunicándose con numerosos neurotransmisores como el glutamato, GABA, dopamina y opioides endógenos entre otros, por lo que diseñar una estrategia que apunte a un neurotransmisor específico puede no ofrecer una eficacia adecuada como sucede con la naloxona (antagonista opioidérgico) o la vareniclina (antagonista de receptores nicotínicos).

Debido a esto una estrategia que pueda afectar a varios neurotransmisores dentro del sistema podría mostrar una mayor efectividad y ciertas características del sistema inmunológico y del proceso inflamatorio podrían tener este efecto, por lo que en la siguiente sección presentaremos esta evidencia.

## 1.2 Interacciones entre el sistema inmune y el sistema de recompensa

Recientemente la neuroinmunología ha ofrecido un entendimiento más amplio de ciertos procesos patológicos, con el subsecuente desarrollo de estrategias para modular importantes sistemas de neurotransmisores; de

especial interés para este trabajo está la inhibición de los sistemas dopaminérgicos, opioidérgicos y glutamatérgicos por citocinas y quimiocinas específicas (Kress 2010).

Los receptores de quimiocinas CXCR4 y CX3CR1 se coexpresan con el MOR en el hipocampo, la corteza cingulada, la PAG, el NAc y el VTA y colocalizan con NeuN y CD11b, indicando su presencia en neuronas y células microgliales (Kress 2010). Estos receptores parecen tener interacciones funcionales con el MOR en la PAG, ya que se ha observado que los agonistas opioides crean una corriente hiperpolarizante al incrementar la conductancia al  $K^+$ , pero la coadministración de quimiocinas bloquea la corriente eléctrica bloqueando por lo tanto la función de los opioides en cultivos neuronales (Kress 2010). Esto sugiere que la presencia de mediadores inmunológicos asociados al proceso de inflamación puede bloquear la respuesta a agonistas opioidérgicos.

Por otro lado, existe evidencia de que la respuesta inflamatoria también bloquea la liberación de dopamina en ratas; por ejemplo, la administración de carragenina disminuye la concentración de metabolitos dopaminérgicos, así como una disminución de RNA del receptor y una expresión disminuida del transportador vesicular en la corteza insular, una estructura esencial para el procesamiento del dolor y la recompensa (Heinisch y Kirby 2011; Coffeen et al. 2010). En monos *Rhesus* se ha reportado que la administración de IFN $\alpha$  genera un aumento en la conducta tipo ansiedad y disminuye la conducta de exploración. Además, también disminuye los metabolitos dopaminérgicos en líquido cefalorraquídeo e incrementa la ACTH, una hormona relacionada con estados de estrés (Felger et al. 2007; Felger y Miller 2012). Otros estudios en ratas muestran que la pre-administración de formalina inhibe la preferencia de sitio condicionada, y que dicho efecto parece estar asociado a una disminución de dopamina en el NAc, ya que al administrar el antagonista del receptor kappa opioide nor-binaltorfimina se recupera la preferencia de sitio condicionada, sugiriendo que no es sólo un bloqueo del sistema opioide, sino una modulación del mismo (Narita et al. 2005). Estudiemos ahora las interacciones del sistema inmune con cada uno de los principales neurotransmisores del sistema de recompensa.

### **1.2.1 Interacciones con el glutamato**

El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC, su producción y efecto neuronal son ubicuos, en el hipocampo y corteza temporal es esencial para la memoria a largo plazo, por sus funciones en la corteza prefrontal participa en la cognición, la memoria, la atención y el raciocinio, y en amígdala se ha demostrado su papel en estados emocionales (Siegel et al. 2006).

Una vez que se despolariza la neurona se libera este neurotransmisor de las vesículas al espacio sináptico, ahí activa tanto a receptores ionotrópicos (AMPA, NMDA y Kaintato) como metabotrópicos (mGluRs), después de esto es recapturado por los astrocitos sinápticos y metabolizado a glutamina, un compuesto inerte, de manera que el efecto glutamatérgico depende en gran medida de la sensibilidad de sus receptores (neuronas) y de la tasa a la que se metaboliza (astrocitos), por lo que la presencia de inflamación puede generar grandes variaciones en ambos (Sofroniew 2009; Harvey et. al. 2011).

En presencia de TNF, -considerada la principal citocina proinflamatoria- el glutamato sensibiliza a los receptores ionotrópicos, especialmente al receptor NMDA que es naturalmente permeable al calcio y participa por lo tanto en procesos como la potenciación a largo plazo y plasticidad neuronal. Sin embargo, la presencia de TNF puede generar una hiperactividad en el mismo receptor llevando a un proceso de toxicidad conocido como excitotoxicidad (Takeuchi et. al. 2006). Este proceso se caracteriza por la acumulación de  $\text{Na}^+$  intracelular y edema citotóxico, además de un incremento en el  $\text{Ca}^{++}$  libre intracelular, activación de las proteínas caspasas y apoptosis. El receptor AMPA presenta también cambios importantes, aumentando la expresión de la subunidad GluR2, lo cual permite la entrada de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Ca}^{++}$  en grandes cantidades potenciando el proceso antes mencionado de excitotoxicidad (Takeuchi et. al. 2006; Kuno et. al. 2005). La activación del receptor de TNF (TNFr) en los astrocitos lleva a una expresión a la baja de la proteína encargada de la recaptura glutamatérgica, -EAAT1-, lo que provoca la acumulación del glutamato sináptico. Otro efecto importante es la astrogliosis, una respuesta defensiva de las células gliales (Harvey et. al. 2011). Finalmente las citocinas proinflamatorias pueden aumentar la producción de más citocinas, en las células microgliales lo que induce la liberación de TNF causando una retroalimentación positiva, junto con este efecto, la microglia empieza a secretar también BDNF y más glutamato (Kuno et. al. 2005; Saha, Liu y Pahan

2006). Además de la potenciación de la excitotoxicidad y el exceso relativo de glutamato, la inflamación puede también interferir con la función de este neurotransmisor; durante eventos inflamatorios, la estimulación por interferones y prostaglandina E2 aumenta la expresión de la enzima indoleamina-2,3-dioxigenasa, que sintetiza ácido kinurénico a partir de triptófano, en las células del sistema inmune innato. La sobreexpresión de esta enzima puede limitar la disponibilidad de sustrato para la síntesis de serotonina y, al mismo tiempo provocar acumulación de kinureninas, que tienen efectos importantes en el funcionamiento del SNC (Vécsei et al. 2012; Török et al. 2016; veáse la figura 3). Por ejemplo, el ácido kinurénico inhibe la liberación de dopamina y es un antagonista de receptores ionotrópicos de glutamato, principalmente el NMDA, mientras que el ácido quinolínico es un agonista de receptores de glutamato y puede potenciar la excitotoxicidad mediada por glutamato (Török et al. 2016). Esta interacción ha probado ser relevante en la clínica, donde pacientes con la enfermedad neuroinflamatoria, esclerosis múltiple, presentan concentraciones elevadas de kinureninas desde etapas tempranas de la enfermedad (Lim et al. 2017) y, además, se encontró que el perfil de kinureninas en LCR correlaciona con síntomas neurocognitivos como fatiga, depresión y ansiedad, así como con la progresión de la discapacidad (Lim et al. 2017).

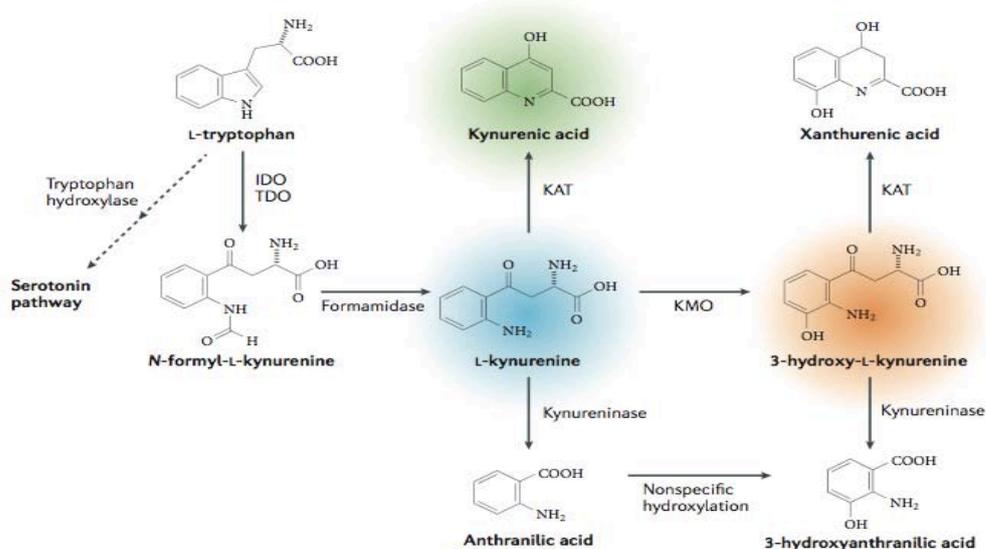


Figura 3 (tomado de Vécsei et al. 2012): Ruta metabólica de la kinurenina.

### 1.2.2 Interacciones con sistemas monoaminérgicos

La noradrenalina y la dopamina son importantes neurotransmisores y neuromoduladores en el cerebro, son elementos esenciales del sistema de la atención a través del sistema activador reticular ascendente, la amígdala y la corteza prefrontal, del sistema motivacional en el área ventral tegmental y el núcleo accumbens (Ventura, Morrone y Puglisi-Allegra 2007). La inflamación puede modificar de manera importante la síntesis, metabolismo y función de estos neurotransmisores.

Como se mencionó antes, ciertas moléculas pueden inducir a la enzima indoleamina-2,3-dioxigenasa, aumentando la síntesis de las kinureninas mencionadas previamente (Vécsei et al. 2012), la acumulación de ácido kinurénico resultante puede bloquear la liberación de dopamina de estructuras como el núcleo estriado (St) (Okuno, Fukuwatari y Shibata 2011) y también disminuye el disparo de neuronas dopaminérgicas en el VTA disminuyendo la concentración de este neurotransmisor (Linderholm et al. 2016).

El estado inflamatorio causa también un aumento en la concentración de especies reactivas de oxígeno como el ácido xanturénico entre otros, esto causa especialmente en las neuronas monoaminérgicas la desnaturalización de un cofactor llamado tetra hidrobiopeterina (Haruki et al. 2016), este cofactor es un componente esencial en la maquinaria para la síntesis de todas las monoaminas (dopamina y noradrenalina), así como de la serotonina (Kapatos 2013).

Esta interacción del proceso inflamatorio con el sistema monoaminérgico y con la serotonina ha mostrado tener consecuencias en la clínica, donde la kinurenina y la inflamación han mostrado correlacionar con depresión resistente a tratamiento, además de servir como un biomarcador para depresión con componente inmunológico (Réus et al. 2015).

En pacientes con procesos inflamatorios crónicos como la esclerosis múltiple, existen alteraciones importantes en el sistema dopaminérgico, principalmente

la conexión entre núcleo estriado y corteza prefrontal (Cui et al. 2017), estas alteraciones tienen una relación importante con algunas de las manifestaciones neurocognitivas de éstas patologías, tal como fatiga, depresión y problemas con la atención (Cui et al. 2017; Nagaraj et al. 2013; Jongen 2012; Bergendal, Fredrikson y Almkvist 2007).

En la esquizofrenia, una patología neuropsiquiátrica compleja, tradicionalmente asociada con alteraciones en la neurotransmisión de dopamina (Patel et al. 2014) se han encontrado datos sólidos de la participación del sistema inmune como niveles incrementados de citocinas en el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Potvin et al. 2008; Wildenauer et al. 1991), una disfunción dopaminérgica inducida por la activación del sistema inmune en el desarrollo neurológico (Winter et al. 2009) y de la acumulación de metabolitos de la vía de la kinurenina (Kegel et al. 2014).

Finalmente se ha demostrado que al activar receptores dopaminérgicos en el VTA, aumenta la respuesta bactericida de monocitos-macrófagos y de células T, así como una reducción significativa en la concentración de *E. Coli* administrado a ratones (Ben-Shaan et al. 2016), esto prueba que existe al menos una relación descendiente, efecto que también se aprecia en pacientes con el efecto placebo, donde el bienestar subjetivo mejora la respuesta inmunológica (Diener et al 2017).

### **1.2.3 Interacciones con acetilcolina**

La acetilcolina es esencial en la adicción al tabaco y a la nicotina, este neurotransmisor como ya se mencionó brevemente, tiene su efecto a través de receptores nicotínicos en el SNC, principalmente en el VTA (De Biasi y Salas 2008, (ver página 7).<sup>[4]</sup>

El receptor nicotínico es un canal iónico que consta de 5 subunidades que pueden pertenecer a 2 familias, las subunidades “ $\alpha$ ” o las “ $\beta$ ”, y pueden acoplarse en unidades homoméricas (todas las subunidades son iguales) o heteroméricas (al menos una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ ), la nicotina puede acoplarse entre una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ , o dos subunidades  $\alpha$  (De Biasi 2008; Siegel et al. 2006).

Los receptores más estudiados en la recompensa asociada a la nicotina debido a su papel en la neurotransmisión dopaminérgica y glutamatérgica son el receptor heteromérico  $\alpha_4\beta_2$ ,  $\alpha_6$  y  $\alpha_7$ , ubicados principalmente en estructuras mesencefálicas(De Biasi 2008).

Estos receptores también son altamente susceptibles a modulación en estados inflamatorios, por ejemplo en cultivos celulares de ganglio simpático, se ha encontrado que el tratamiento con prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) abate la respuesta eléctrica del receptor por lo que se abole la corriente generada en el canal en respuesta a la nicotina, esto debido a un decremento en la probabilidad de apertura del mismo, además cuando el cultivo se trata con ibuprofeno, un inhibidor de la vía metabólica de producción de prostaglandinas, se rescata la respuesta eléctrica de los receptores tratados con  $PGE_2$ (Du et al. 2013).

Al analizar los receptores nicotínicos más prevalentes en los ganglios simpáticos encontramos que aunque los  $\alpha_3\beta_4$  son los más expresados, los homoméricos  $\alpha_7$  son también prevalentes y por su alta conductancia al  $Ca^{++}$  tienen una participación muy importante en el potencial de acción y en cadenas de segundos mensajeros intracelulares (Skok y Vladimir 2002), haciéndolos un buen candidato para esta comunicación neuro-inmune.

La vía de la kinurenina también podría tener un impacto importante en el funcionamiento de los receptores nicotínicos; el ácido kinurénico es un antagonista competitivo de la nicotina, al acoplarse a la subunidad  $\alpha_7$ , usando neuronas corticales se demostró que la pre-administración de kinurenina podía bloquear la liberación glutamatérgica inducida por los receptores nicotínicos en la corteza (Konradsson-Geuken et al. 2009), sin embargo esta relación aún es controvertida.

#### **1.2.4 Interacciones con opioides**

El sistema opioidérgico es uno de los más relevantes en cuanto al sistema de motivación y la modulación de la conducta, mientras que la dopamina es instrumental en la “recompensa”, ese deseo por realizar la actividad; el sistema opioidérgico se ha visto principalmente involucrado en el “placer”, una respuesta hedónica positiva al realizar ciertas actividades (Berridge y Kringelbach 2015).

Se han encontrado puntos anatómicos específicos en los que los agonistas opioides (Mu, Delta y Kappa) al ser administrados directamente inducen preferencia de sitio y generan o potencian respuesta primitivas placenteras, tal como chupeteo, estos son conocidos como “hedonic hotspot” o punto hedónico crítico y se pueden encontrar en el NAc rostro ventral, el núcleo ventral pálido posterior, la corteza orbitofrontal, la corteza insular (Berridge y Kringelbach 2015).

La figura 4 muestra los puntos hedónicos críticos, así como las conductas estereotipadas de “placer”.

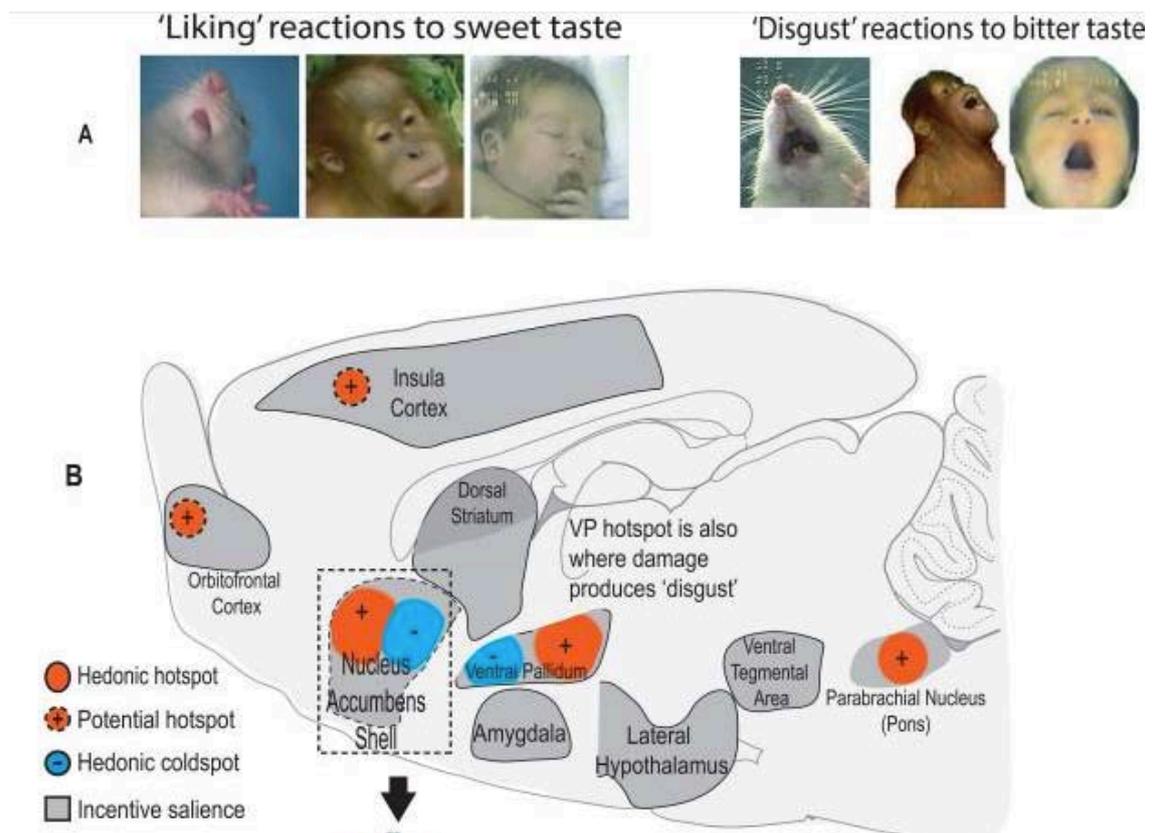


Figura 4 (tomada de Berridge y Kringelbach 2015): Puntos hedónicos críticos positivos y negativos, y conductas estereotipadas de placer y desagrado. A: conductas estereotipadas de placer o agrado del lado izquierdo en 3 especies diferentes, ratas, mono y bebé humano, la conducta es de chupeteo, tras administrar una sustancia dulce se relajan los músculos faciales, y se abren y cierran los labios; se muestra del lado derecho conducta de disgusto, posterior a la administración de una solución amarga se protruye la lengua hacia fuera y se abre la cavidad oral. B: Podemos ver los principales puntos hedónicos críticos, en rojo los positivos principalmente en el núcleo parabraquial, el núcleo ventral pálido posterior, el núcleo accumbens rostral ventral, la corteza orbitofrontal y la corteza insular; se aprecian también puntos hedónicos críticos negativos, cuya activación genera desagrado.

Este sistema de neuropéptidos también es susceptible a modulación por el sistema inmunológico; sin embargo, debido a su complejidad no ha sido estudiado a profundidad; uno de los escenarios más estudiados es durante el dolor inflamatorio, donde los productos del sistema inmune como las quimiocinas aumentan la sensación dolorosa (hiperalgesia), en parte por un bloqueo de la función opioidérgica periférica (Kress 2010): (*vide supra*)

El proceso implicado es la desensibilización cruzada en el que la activación de otros recetores metabotrópicos disminuye la actividad de los receptores opioides debido a internalización del receptor, desacoplamiento con su proteína transductora, presencia de fosfatasa que degradan segundos mensajeros o a fosforilación del receptor opioide o de alguno de sus sustratos inactivándolos (Allouche, Noble, y Marie 2014).

El fenómeno de desensibilización no ha sido estudiado afondo y en ocasiones da resultados inconsistentes, sin embargo los resultados mejor caracterizados se dan con la proteína cinasa dependiente de receptor de proteína G (GIRK) 2, 3 y 5, y con la proteína cinasa C (PKC), siendo los receptores Mu y Delta los más susceptibles (Allouche, Noble, y Marie 2014).

Como ya fue mencionado, estos segundos mensajeros han demostrado efectos sobre la percepción del dolor; en ratones la producción de TNF $\alpha$ , IL 1 y CX3CR1 lleva a una hiperactividad microglial y a hiperalgesia (Willemen et al. 2010); el TNF y la IL 1 también ha mostrado ser una parte esencial de la tolerancia que presentan los pacientes tras exposiciones repetidas a analgésicos opioides, llevando a una pérdida de eficacia clínica (Eidson et al. 2016; Olmos y Lladó 2014) y que el bloqueo de esta citocina con un péptido quelante como XPro1595 revierte este fenómeno (Eidson et al. 2016).

La PKC resulta también de interés debido a su función ubicua en numerosas vías de activación inmunológica, donde tanto la activación de receptores tipo Toll, del receptor de linfocito T y del receptor de linfocito B (Lim, Sutton y Rao 2015), sugiriendo interacciones con receptores a opioides, aunque estas no han sido estudiadas.

Todas estas alteraciones en los neurotransmisores están asociadas a cambios importantes en el funcionamiento cerebral y por lo tanto también a cambios significativos en diversas conductas que serán comentados a continuación.

### **1.3 Efectos de la inflamación sobre la conducta**

Los efectos ya mencionados de la inflamación sobre los diferentes grupos de células, así como sobre los neurotransmisores en el SNC, tiene importantes consecuencias en la conducta y el funcionamiento de diversos sistemas neuronales. El efecto de esta interacción es una serie de conductas estereotipadas conocidas como conducta de enfermedad, caracterizada en modelos animales por presentar fiebre, activación de hormonas del estrés (HPA), anorexia, anhedonia, adinamia y aislamiento social al administrarles moléculas como productos bacterianos (LPS, BCG) o directamente citocinas (TNF, IL 1) (Dantzer 2006).

Estas manifestaciones tiene diferentes mediadores y diferentes vías de influencia sobre el cerebro, por ejemplo en modelos animales donde se administra LPS intraperitoneal se genera la conducta de enfermedad antes mencionada, junto con las alteraciones hormonales y la fiebre, en estos animales cuando se realizaba una ablación selectiva del nervio vago abdominal o al bloquear el núcleo del vago en el bulbo, desaparecía múltiples manifestaciones conductuales como la anorexia y el aislamiento social mientras que la fiebre y la respuesta hormonal HPA no (Dantzer 2006).

La fisiopatología demostrada hasta ahora comienza con la activación de macrófagos en órganos periféricos cercanos al nervio vago (Dantzer 2006), o células microgliales en los órganos circunventriculares (órgano vascular de la lámina terminal, órgano del área postrema, hipotálamo endócrino) y en plexos coroides; una vez activados secretan moléculas proinflamatorias al cerebro tal como el TNF, la IL 1, PGE<sub>2</sub>, teniendo los efectos antes mencionados sobre los sistemas de neurotransmisores (Jin et al. 2016).

En seres humanos esta relación también se ha estudiado, tenemos por ejemplo la mayor incidencia de depresión y fatiga en pacientes que presentan una enfermedad inflamatoria crónica, del mismo modo entre los pacientes diagnosticados con trastorno depresivo mayor, se encuentra un subgrupo asociado a inflamación (Miller y Raison 2015; Akhondzadeh et al. 2009; Mendlewicz et al. 2006), ya sea por la presencia concomitante de marcadores de inflamación elevados (proteína C reactiva ultrasensible, IL 1, actividad HPA), o por presentar un importante efecto antidepresivo al administrar anti

inflamatorios como ácido acetil salicílico o celecoxib (Akhondzadeh et al. 2009; Mendlewicz et al. 2006).

En pacientes con esclerosis múltiple también encontramos efectos similares, un 80% de los pacientes reportan fatiga como síntoma importante (Nagaraj et al. 2013; Jongen et al. 2012), mientras que la mitad reportan otros trastornos cognitivos (Jongen et al. 2012) y otro porcentaje importante alteraciones neuropsiquiátricas como depresión o ansiedad (Marrie et al. 2015).

En la tabla 2 se reporta la frecuencia de diversos trastornos neuropsiquiátricos en pacientes con esclerosis múltiple, una de las patologías neuroinflamatorias más comunes y más estudiadas.

Alteración	Frecuencia reportada	Referencia
Fatiga	85-95%	Nagaraj et al. 2013; Jongen et al. 2012
Depresión	23.7%	Marrie et al. 2015
Ansiedad	21.9- 26.4%	Marrie et al. 2015
Déficit cognitivo general	45-60%	Borghini et al. 2013
Velocidad de procesamiento	20-30%	Bergendal, Fredrikson y Almkvist 2007
Atención	25%	Nebel et al. 2007

Tabla 2.- Principales alteraciones neuro-psiquiátricas en pacientes con esclerosis múltiple.

Con estos antecedentes, nuestro objetivo fue demostrar que la inflamación periférica no dolorosa podía alterar la preferencia de sitio condicionada a fármacos de abuso como los opiáceos o la nicotina; para lo cual decidimos utilizar modelos que ya han sido ampliamente estudiados y de los cuales se conoce su inmunopatología, (Tabla 3) por lo que nuestra elección incluyó la inflamación inducida por la administración intraplantar de carragenina y la administración intraperitoneal del bacilo de *Calmette Guerin*. (Narita et al. 2005, O'Connor 2009)

<b>Modelo de inflamación</b>	<b>Carragenina intraplantar</b>	<b>Bacilo de Calmette Guerin</b>
<b>Sustancia administrada</b>	Carragenina 1%, 250 o 750 ul	Bacilo completo $1 \times 10^7$ unidades formadoras de colonias
<b>Sitio del proceso inflamatorio</b>	Cojinete plantar	Peritoneo
<b>Células implicadas</b>	Macrófagos plantares	Macrófagos peritoneales
<b>Principales mediadores</b>	Prostaglandina E2	Interleucina 12 e Interferón gamma
<b>Principal vía de acceso al cerebro</b>	Hematógena	Transmisión por nervio vago abdominal
<b>Efectos conductuales demostrados</b>	Ninguno	Depresión en modelo de nado forzado

## **2. Razonamiento científico**

### **2.1. Justificación**

El consumo de sustancias de abuso es una importante causa de morbilidad y mortalidad en el mundo, es uno de los principales factores de riesgo prevenible en la fisiopatología de numerosas enfermedades, entre ellas el infarto cerebral, el infarto al corazón, la neumonía y numerosos tipos de cáncer, como el de laringe, el de pulmón e inclusive el de mama. La evidencia epidemiológica permite estimar que 6 millones de personas fallecen cada año por causa del consumo directo o indirecto de tabaco, mientras que se estima que en Estados Unidos alrededor de 91 personas mueren todos los días por el consumo de opioides.

Debido a lo anterior, se han realizado grandes esfuerzos para facilitar la suspensión del consumo de estos productos; sin embargo, los resultados hasta

ahora son pobres en estudios a largo plazo, con un alto riesgo de recaídas con los tratamientos actuales que sólo modifican la neurotransmisión. Esto hace que el desarrollo de nuevas terapias para las adicciones sea una prioridad, en la que destaca la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos. En este sentido, el estudio de la posible relación entre el sistema inmune y el sistema de recompensa permitiría entender con mayor claridad la fisiopatología de la adicción y eventualmente podría permitir el desarrollo de nuevos blancos farmacológicos y terapéuticos.

La evidencia experimental generada hasta ahora sugiere que la inflamación pudiera ser un blanco terapéutico interesante; es decir, la inflamación periférica ha demostrado generar alteraciones en el metabolismo de la serotonina, la dopamina y el glutamato al activar la vía de la kinurenina. Además, en estudios de recompensa inducida por opioides, la administración de un estímulo pro inflamatorio doloroso, como la carragenina o la formalina inhiben la conducta condicionada de recompensa. Por lo que consideramos importante analizar si la modulación del sistema inmune puede alterar la respuesta de recompensa a fármacos de abuso como los opioides y la nicotina.

## **2.2. Hipótesis**

La respuesta inflamatoria periférica modificará la respuesta de preferencia/aversión de sitio condicionada a morfina y a nicotina en ratas.

### **2.3. Hipótesis particulares**

2.3.1. Un modelo de inflamación mediado por carragenina intraplantar inhibirá la preferencia de sitio condicionada con morfina y con nicotina.

2.3.2. El efecto será sensible a la administración de un inhibidor de la COX como el ibuprofeno.

2.3.3. Un modelo de inflamación mediado por el bacilo de *Calmette-Guerin* inhibirá la preferencia de sitio condicionada con morfina y con nicotina.

2.3.4. El efecto será resistente a la modulación por parte de un inhibidor de la COX como el ibuprofeno.

2.3.5. Un modelo de inflamación mediado por carragenina intraplantar inhibirá la aversión a un sitio condicionada con nicotina.

2.3.6. El efecto será sensible a la administración de un inhibidor de la COX como el ibuprofeno.

2.3.7. Un modelo de inflamación mediado por el bacilo de *Calmette-Guerin* inhibirá la aversión a un sitio condicionada con nicotina.

2.3.8. El efecto será resistente a la modulación por parte de un inhibidor de la COX como el ibuprofeno.

2.3.9. Cada modelo inflamatorio tendrá una respuesta citocinérgica particular.

## **2.4. Objetivos**

2.4.1 Establecer, validar y caracterizar un modelo de infección primaria por el bacilo de *Calmette Guerin*: Ratas wistar macho recibieron *Mycobacterium bovis*, cepa danesa a una dosis de  $1 \times 10^7$  UFC por vía intraperitoneal. Posteriormente, se determinó la respuesta de citosinas ¿cuáles? en suero.

2.4.2 Establecer, validar y caracterizar un modelo de inflamación mediado por carragenina: Ratas wistar macho recibieron 750 ul de carragenina al 1% por vía intraplantar. Posteriormente, se determinó la respuesta de citocinas (TNFa, INFg, IL4 e IL10) en suero.

2.4.3 Determinar conductualmente si la preferencia/aversión de sitio condicionada puede inhibirse con el modelo de BCG.

2.4.4 Determinar conductualmente si la preferencia/aversión de sitio condicionada puede inhibirse con el modelo de carragenina.

2.4.5 Determinar si la administración de fármacos antiinflamatorios (ibuprofeno), en modelos animales inflamados, modulan el proceso de condicionamiento

### **3.- Metodología**

Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de bioética de la facultad de medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, y fueron realizados bajo las especificaciones de la NOM ZOO-069.

Se utilizaron ratas Wistar macho de 200-350 g, con alimentación e hidratación *ad libitum*, los animales se encontraban en ciclo luz/oscuridad de 12 horas invertido (luces encendidas a las 7 de la noche y apagadas 7 de la mañana).

Todos los experimentos conductuales se realizaron en un cuarto de experimentación conductual con iluminación controlada y atenuación de ruidos externos.

#### **3.1. Preferencia de sitio condicionada**

Utilizamos una caja de condicionamiento de sitio dividida en 3 compartimentos, en los extremos los compartimentos tienen el mismo tamaño pero diferente color y textura en el piso: El compartimento A es transparente con una rejilla de alambre en el piso, el compartimento B tiene líneas negras y lija negra en el piso; el tercer compartimento, C, conecta ambos compartimentos (A y B), y tiene el piso liso.

El proceso de condicionamiento se realizó durante 8 días divididos en 4 fases: habituación, prueba de preferencia pre-condicionamiento, condicionamiento y prueba de preferencia postcondicionamiento. Usamos un modelo sesgado, es decir consideramos como basal el sitio preferido por cada rata.

##### **3.1.1 Fase de habituación**

Del día 1 al día 3 cada animal fue colocado en el compartimento C permitiéndole explorar libremente la caja completa por 30 minutos.

##### **3.1.2 Prueba de preferencia pre-condicionamiento**

Al cuarto día las ratas se colocaban en el compartimento C y se les permitía explorar libremente la caja completa, las ratas eran videograbadas por 900 segundos para determinar la preferencia basal.

### 3.1.3 Condicionamiento

Las sesiones de condicionamiento se realizaron del día 5 al día 8; previo al inicio de la sesión se administró vía subcutánea vehículo (solución salina al 0.9%) o nicotina (1 mg/kg o 2 mg/kg) o morfina (5 mg/kg) e inmediatamente después se colocó en uno de los compartimentos laterales (A o B) y se mantuvo ahí por 30 minutos. Las sesiones se realizaron 2 veces al día con 6 horas de separación entre ellas (11am-5pm).

### 3.1.4 Prueba de preferencia postcondicionamiento

En el día 9 los animales fueron colocados en el compartimento C de nuevo con libre acceso a la totalidad de la caja y se les permitió explorar libremente, se videograbó la conducta de la rata por 900 segundos determinando cuál era el compartimento preferido después del condicionamiento. La conducta del animal era analizada utilizando el programa "Omniaiva".

Un resumen del diseño experimental es presentado en la figura 5.

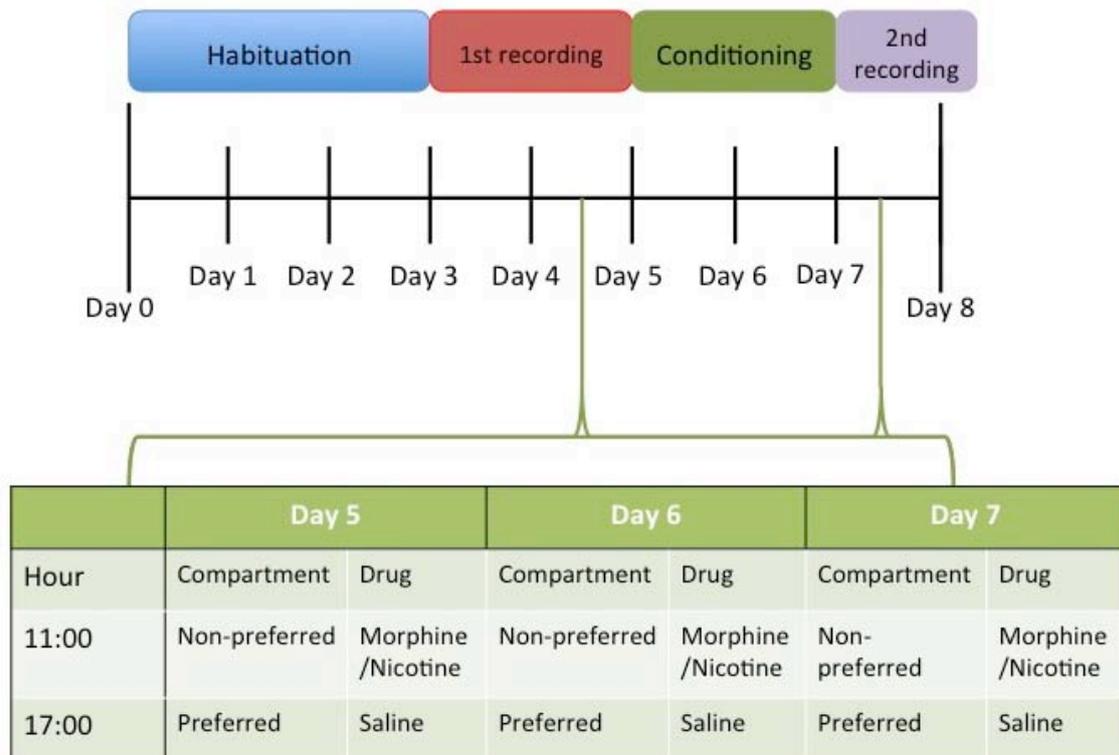


Figura 5.- Diseño experimental.

### 3.2 Administración de fármacos

La nicotina (SIGMA Nicotine hydrogen tartrate salt) fue diluida en solución salina al 0.9% y se tituló el pH a un rango entre 7.0 y 7.4. El fármaco fue administrado subcutáneo inmediatamente antes de la sesión de condicionamiento, las dosis y le compartimento se establecen en la tabla 3.

Grupo	Dosis	Compartimento	NaCl 0.9%	Compartimento
<b>Morfina</b>	5mg/kg	No preferido basal	1ml/kg	Preferido basal
<b>Nicotina recompensa</b>	1mg/kg	No preferido basal	1ml/kg	Preferido basal
<b>Nicotina aversión</b>	2mg/kg	Preferido basal	1ml/kg	No preferido basal

Tabla 3.- Resumen de las sesiones de administración de fármacos.

### 3.3 Grupos experimentales

**Grupo control (n=12):** Se realizó el proceso de condicionamiento administrando únicamente solución salina al 0.9% en ambos compartimentos en los 2 horarios al día.

**Grupo droga (n=10):** Se realizó el proceso de condicionamiento administrando nicotina o morfina dependiendo del grupo (recompensa/aversión) y en el siguiente horario se administró solución salina. Se intercambió el orden de administración cada 24 horas.

**Grupo inflamación no dolorosa infecciosa (n=20):** Los sujetos fueron inoculados (ip.) con el bacilo de *Calmette Guerin* (BCG, de la cepa danesa) a una dosis de  $1 \times 10^7$  UFC, 24 horas previas al condicionamiento, más adelante se asignaron de manera aleatoria al grupo de aversión (n=10) o recompensa (n=10) a nicotina. Sólo aquellos animales con una pérdida de al menos el 5% de peso corporal total y que no presentaran conducta de guardia abdominal, irritabilidad, vocalización a la manipulación abdominal o cualquier otro dato de dolor abdominal fueron incluidos en el experimento.

**Grupo inflamación no dolorosa no infecciosa (n=20):** Se realizó una denervación no dolorosa del nervio ciático derecho (la técnica completa está descrita más adelante) y, posteriormente se permitió una semana de recuperación a los animales, durante la cual se observó la aparición de datos de dolor neuropático como la conducta de autotomía. Al término de la semana, se administraron 750 µl de carragenina al % por vía intraplantar (ipl) en la misma pata en la que se realizó la denervación, y se asignaron los animales a grupos de recompensa o aversión y, 24 horas después se inició con las sesiones de condicionamiento.

Sólo aquellos animales con una pérdida de al menos el 5% de peso corporal total, con enrojecimiento y edema persistente en la pata inyectada, pero sin defensa de la pata, vocalización a la manipulación o evidencia de dolor neuropático como conducta de autotomía, fueron incluidos en el experimento.

### **3.4 Técnica quirúrgica de denervación**

Para la denervación no dolorosa los animales fueron anestesiados con pentobarbital (30 mg/kg) administrado vía intraperitoneal y se utilizó clorhexidina como antiséptico local sobre el área de la articulación femoro-pélvica derecha de la rata. Para infiltrar el área con lidocaína (20 mg/ml), se insertó la aguja postero medial al trocánter mayor en una dirección ateromedial, y al contacto con hueso se retiró 0.5 mm la aguja, se inyectó la lidocaína (0.5ml) y se esperó 1 minuto buscando el efecto anestésico, el volumen final administrado fue de 1 ml de lidocaína. El nervio ciático fue expuesto posterior a realizar una incisión de 10 mm sobre la articulación pélvica, se separó la fascia entre el músculo vasto lateral del cuádriceps y la cabeza larga del bíceps femoral, las fibras de este último fueron separadas para extraer el nervio sin generarle daño (en la figura 6 se muestra la exposición del nervio).



Figura 6.- Técnica quirúrgica y exposición del nervio ciático de la rata. Posterior a este punto se bloqueaba la transmisión nerviosa usando lidocaína hasta que desaparecía cualquier respuesta motora o sensitiva.

Una vez expuesto el nervio ciático se aplicó 0.2 ml de lidocaína y se esperó 30 segundos más, la eficacia del bloqueo se comprobó midiendo la latencia del retiro de pata a un estímulo nociceptivo por presión en el cojinete plantar ipsilateral. Una vez que no existió respuesta defensiva ni vocalización a la estimulación ipsilateral pero sí a la contralateral, se consideró un bloqueo completo, tras lo cual se cortó un segmento de 2 mm del nervio proximal a la bifurcación en tibial y peroneal. Se suturó la incisión con sutura nylon 2-0s y se aplicó clorexhidina en la herida como antiséptico para prevenir infección.

La técnica fue modificada de Beloeil et al. 2009.

### **3.5 Fármacos antiinflamatorios**

El efecto de fármacos antiinflamatorios en nuestro modelo fue determinado mediante la administración de ibuprofeno (50 mg/kg, i.p. SIGMA-ALDRICH) y, adicionalmente se les proporcionó ibuprofeno (0.6 mg/ml) disuelto en agua 24 horas previo a las sesiones de condicionamiento y hasta el final del experimento.

### **3.6 Análisis de datos**

Calculamos la “Preferencia de Sitio Condicionada” CPP, que es la diferencia en el tiempo que pasaba el animal en cada compartimento antes de las sesiones de condicionamiento y después, como un indicador de la conducta de la rata.

CPP= Tiempo total en el compartimento no preferido postcondicionamiento-  
Tiempo total en el compartimento no preferido pre-condicionamiento

CPA= Tiempo total en el compartimento preferido postcondicionamiento-  
Tiempo total en el compartimento preferido pre-condicionamiento

Se calculó la normalidad de la distribución de los PSC utilizando la prueba de normalidad D'Agostino & Pearson ómnibus, en los datos que seguían una distribución estándar usamos un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si había diferencias significativas, con el post hoc Dunnett comparando cada grupo con el que recibía el fármaco de abuso. En todos los casos se consideró como significativo una  $p < 0.05$ , se calcularon y reportaron también los intervalos de confianza al 95%.

Para determinar el tamaño del efecto se calcularon las diferencias de medias entre los grupos, realizamos una tabla de contingencia calculando el riesgo relativo de disminución en la respuesta a los grupos que recibían la nicotina en comparación con los que recibían nicotina y tenían inflamación.

## **4. Resultados**

### **4.1. La inflamación dolorosa con carragenina inhibe la preferencia de sitio condicionada con morfina**

La figura 7 muestra los valores de condicionamiento de preferencia de sitio inducido por morfina; como se puede observar la administración de morfina causa un CPP de 180.5 s, a diferencia del tiempo inducido por la administración de solución salina cuyo tiempo fue de tan solo -3.5; por otro lado, la administración de carragenina disminuyó significativamente el condicionamiento inducido por morfina a un valor de 63.5 s.

Estos resultados confirman lo publicado por Narita y colaboradores, y validan el modelo conductual utilizado en el presente proyecto, y sugieren que cuando existe inflamación dolorosa las ratas son menos propensas a mostrar recompensa a la morfina. Sin embargo, este modelo no permite discriminar si el

decremento en la CPP es por los mediadores inflamatorios o por el estímulo doloroso.

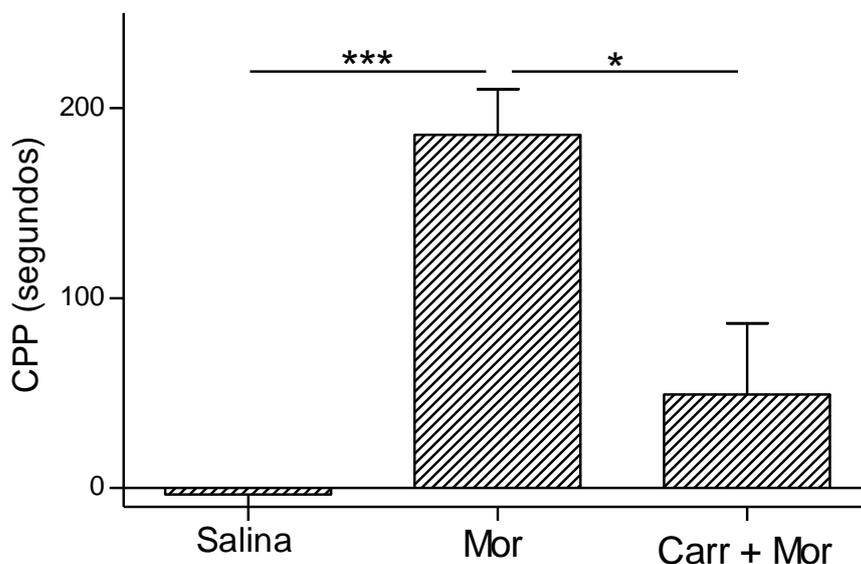


Figura [5]7: La inflamación dolorosa inhibe el condicionamiento de preferencia de sitio. La gráfica muestra los tiempos (en segundos) del condicionamiento en el sitio no preferido después de la administración de morfina con y sin inflamación. Cada barra representa la media de un número variable de animales (9-10). Las líneas verticales indican errores estándar. Se compararon los grupos con ANOVA seguida de Dunnett \* $p < 0.05$ , \*\* $p < .005$

#### 4.2. La inflamación no dolorosa con carragenina inhibe la preferencia de sitio condicionada con morfina

Para separar el efecto del dolor del efecto de los mediadores inflamatorios evaluamos el efecto de la carragenina en la CPP posterior a una denervación del nervio ciático en la pata de la rata en la que se administra la carragenina.

En la figura 8 mostramos que al aplicar 250 $\mu$ l de carragenina al 1% no había ningún efecto sobre la CPP, pero al incrementar la dosis a 750 $\mu$ l al 1%, ésta si fue capaz de reducir en un 93% la CPP (180.5 vs 11.6 s). Este resultado representa nuestra primera evidencia experimental de que la inflamación no dolorosa bloquea la CPP; sin embargo, la falta de respuesta con la dosis menor sugiere que en presencia de dolor, la inflamación puede funcionar como un coadyuvante, pero en dosis mayores la inflamación por sí sola puede inhibir la recompensa. Para corroborar estos resultados, utilizamos un segundo modelo con un perfil inmunológico diferente, pero de nuevo sin dolor, para lo cual

administramos  $1 \times 10^7$  unidades formadoras de colonias del Bacilo *Calmette Guerin* (BCG, de la cepa danesa), por vía intraperitoneal, 24 horas previas a las sesiones de condicionamiento. Los resultados de este grupo se muestran una importante reducción de la CPP (97.3%, 180.5 vs. 3.9 s), lo cual señala que los 2 modelos de inflamación no dolorosa presentados en este trabajo son capaces de inhibir la CPP inducida por morfina (ver Fig. 9)

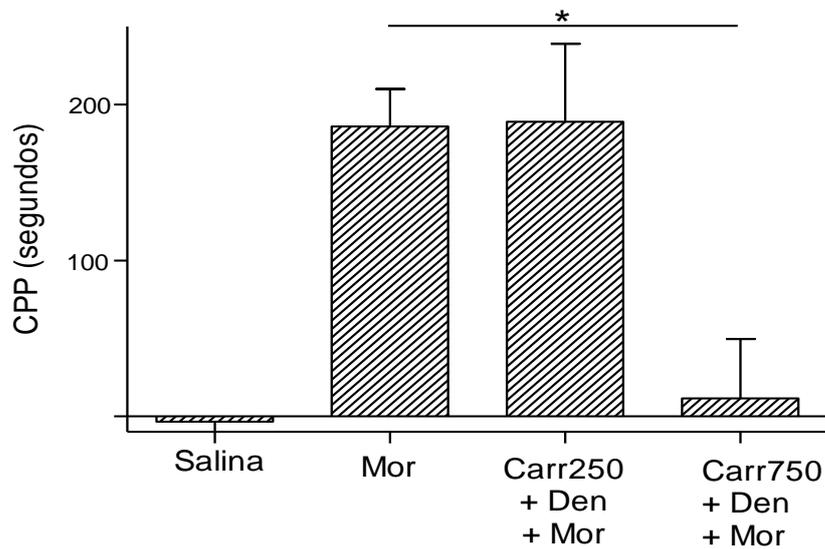


Figura 8: La inflamación no dolorosa con carragenina en dosis alta, pero no con dosis baja inhibe la preferencia de sitio condicionada con morfina. La gráfica muestra los tiempos (en segundos) del condicionamiento en el sitio no preferido después de la administración de morfina con y sin inflamación no dolorosa. Cada barra representa la media de un número variable de animales (9-10). Las líneas verticales indican errores estándar. Se compararon los grupos con ANOVA seguida de Dunnett  $*p < 0.05$

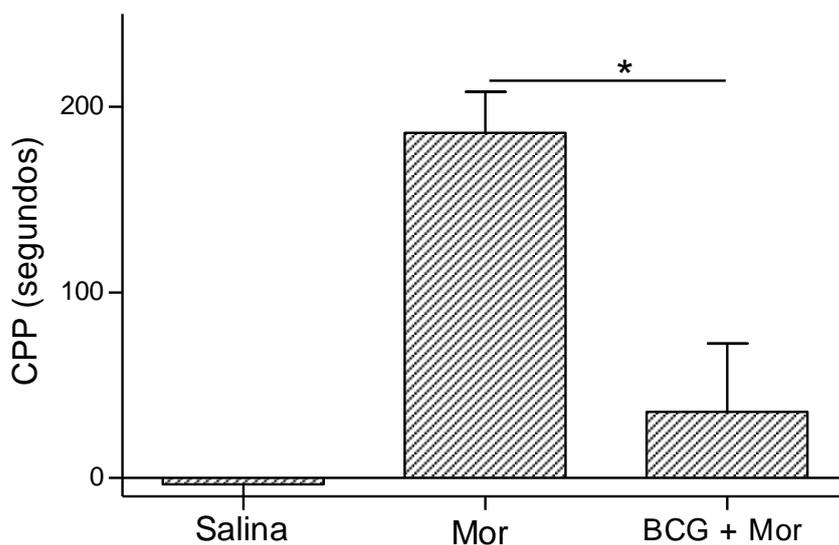


Figura 9: La inflamación no dolorosa con BCG inhibe la preferencia de sitio condicionada con morfina. La gráfica muestra los tiempos (en segundos) del condicionamiento en el sitio no preferido después de la administración de morfina con y sin inflamación no dolorosa inducida por BCG. Cada barra representa la media de un número variable de animales (9-10). Las líneas verticales indican errores estándar. Se compararon los grupos con ANOVA seguida de Dunnett  $*p < 0.05$

#### 4.3. El ibuprofeno re-establece la CPP en el modelo de carragenina, pero no en el de BCG

Después de establecer que los dos modelos diferentes de inflamación utilizados en este proyecto bloquean la CPP inducida por morfina, nos propusimos determinar si ambos modelos respondían a la administración de un inhibidor de la COX, para lo cual administramos ibuprofeno. La administración de un inhibidor de la COX nos permitiría obtener evidencia acerca de las posibles diferencias en el mecanismo a través del cual tanto carragenina como BCG son capaces de inhibir condicionamiento inducido por morfina.

Previo al experimento descartamos la posibilidad de cualquier interacción farmacológica entre el ibuprofeno y la morfina, para lo cual en la figura 10 mostramos que la administración de ambos fármacos de manera simultánea no modifica la CPP inducida por morfina.

Los resultados obtenidos muestran (Fig. 10) que la administración de ibuprofeno en el modelo de carragenina (750 $\mu$ l 1%) induce una importante recuperación en el condicionamiento de preferencia de sitio inducido por

morfina (media 487.9 vs 11.6,  $r^2= 0.79$ ,  $F( 5, 47)= 37.3$ ,  $p< 0.00005$ , 95% CI [-627.1, -325.4]); y que dicha recuperación es también evidente al comparar los resultados de condicionamiento de sitio sin inflamación (media 487.9 vs 180.5,  $r^2= 0.79$ ,  $F( 5, 47)= 37.3$ ,  $p< 0.00005$ , 95% CI [-307.4, 47.6]). Estos datos sugieren que la síntesis de prostaglandinas es un paso esencial en la inhibición de la CPP inducida por morfina dependiente de carragenina.

Por otro lado, cuando intentamos identificar el efecto de la administración de ibuprofeno en el modelo de inflamación inducido por BCG, no solo no encontramos efecto sobre el condicionamiento de preferencia de sitio, sino que la administración de ibuprofeno generó un condicionamiento de aversión (media -150.7 vs 34.1,  $r^2= 0.79$ ,  $F( 5, 47)= 37.3$ ,  $p< 0.005$ , 95% CI [37.5, 332.1]). Con estos resultados podemos sugerir que los modelos de inflamación utilizados en este proyecto tienen una respuesta diferencial a la administración de un inhibidor de prostaglandinas (ibuprofeno), lo cual nos permite suponer que son mecánicamente distintos.

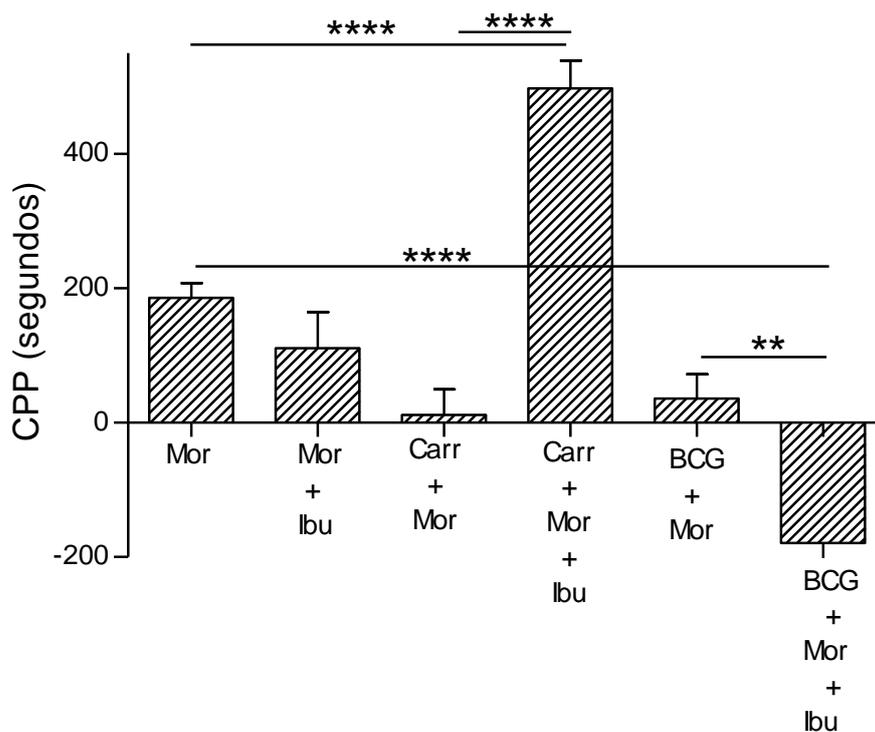


Figura 10: El ibuprofeno restablece la CPP inducida por morfina en el modelo de carragenina pero no en el de BCG. La gráfica muestra los tiempos (en segundos) del condicionamiento en el sitio no preferido después de la administración de morfina e ibuprofeno con y sin inflamación no dolorosa inducida por BCG o carragenina. Cada barra representa la media de un número variable de animales (8-10). Las líneas verticales indican errores estándar. Se compararon los grupos con ANOVA seguida de Dunnett \*\* $p < 0.005$  \*\*\*\* $p < 0.00005$

#### **4.4. La inflamación no dolorosa con carragenina y BCG inhibe la preferencia de sitio condicionada con nicotina**

Una vez demostrado el efecto con morfina, decidimos explorar el efecto de la inflamación no dolorosa en el condicionamiento de preferencia de sitio inducido por otro fármaco de abuso; la nicotina (1mg/kg). Creemos que este experimento provee información valiosa ya que el condicionamiento por nicotina depende mucho más de la transmisión dopaminérgica y no tanto de la opioidérgica, además de que con este fármaco puede estudiarse también la aversión.

Al igual que con morfina, la administración de carragenina inhibe de manera significativa el CPP inducida por nicotina, en la figura 11 podemos ver que los animales que recibieron el estímulo inflamatorio presentaban una disminución del 114% en el condicionamiento de preferencia de sitio (Media 136.6 vs -19.3  $p < 0.005$ ), y que dicho CPP inducido por nicotina se recupera al administrar ibuprofeno (Media -19.3 vs 258.5  $p < 0.005$ ).

De la misma manera, los animales que recibieron BCG mostraron una disminución en la conducta de condicionamiento a la nicotina (CPP), esta vez de un 95.2% (Media 136.6 vs 6.6  $p < 0.005$ ), pero en este caso la administración de ibuprofeno no recupero los valores observados en ausencia de la inflamación (media 6.6 vs -16.6  $p > 0.05$ ).

Con estos resultados determinamos que los modelos inflamatorios utilizados en este proyecto pueden inhibir la CPP inducida por nicotina; sin embargo solo la inflamación inducida por carragenina es sensible a la administración de ibuprofeno, mientras que la inflamación inducida por la administración del BCG no se modifica por la administración de este inhibidor de COX.

Estos resultados sugieren, además, que aunque los mecanismos involucrados en la generación de inflamación son diferentes, ambos modelos de inflamación no dolorosa pueden inhibir este efecto conductual condicionado tanto de la morfina como de la nicotina.

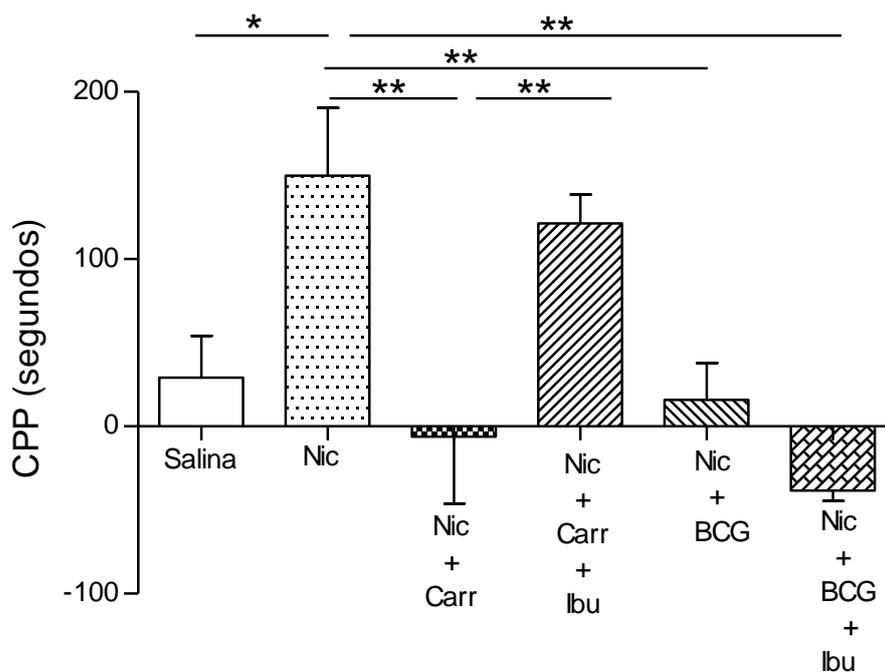


Figura 11: La inflamación no dolorosa con carragenina y BCG inhiben la preferencia de sitio inducida por nicotina (nicotina 1mg/kg). La gráfica muestra los tiempos (en segundos) del condicionamiento en el sitio no preferido después de la administración de nicotina e ibuprofeno con y sin inflamación no dolorosa inducida por BCG o carragenina. Cada barra representa la media de un número variable de animales (8-10). Las líneas verticales indican errores estándar. Se compararon los grupos con ANOVA seguida de Dunnett \* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.005$  \*\*\*\* $p < 0.00005$

#### 4.5. La inflamación no dolorosa con carragenina no tiene efecto sobre la aversión de sitio condicionada con nicotina; el BCG la bloquea

Por último decidimos evaluar nuestros 2 modelos de inflamación pero ahora con aversión condicionada de sitio (CPA) inducida por nicotina (vía i.p., 2mg/kg).

En la figura 12 mostramos que la inflamación inducida con carragenina no tiene ningún efecto en la CPA (-129.1 vs -182.2  $p > 0.05$ ). Y tampoco encontramos efecto al administrar ibuprofeno (-182.2 vs -115.9  $p > 0.05$ ).

Por otro lado, la inflamación inducida por la administración de BCG inhibe la CPA (-129.1 vs 35.2  $p < 0.005$ ) con una RR de 30, y este efecto no fue modificado por la administración de ibuprofeno (35.2 vs -63.9  $p > 0.05$ ).

Estos resultados sugieren que los mediadores de la inflamación producidos en el modelo de carragenina no afectan el proceso de aversión en general, mientras que los mediadores inflamatorios inducidos por la administración de BCG alteran la conducta de aversión a la nicotina en nuestro modelo.

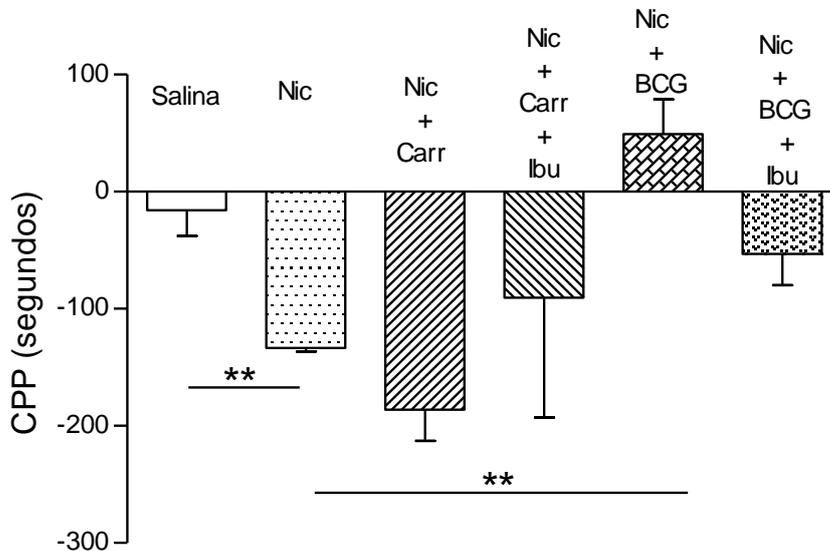


Figura 12: La inflamación no dolorosa con carragenina no tiene efecto en la aversión a un sitio condicionada con nicotina (nicotina 2mg/kg), el BCG la bloquea. La gráfica muestra los tiempos (en segundos) del condicionamiento de aversión en el sitio no preferido después de la administración de nicotina e ibuprofeno con y sin inflamación no dolorosa inducida por BCG o carragenina. Cada barra representa la media de un número variable de animales (8-10). Las líneas verticales indican errores estándar. Se compararon los grupos con ANOVA seguida de Dunnett \*\*p<0.005

#### 4.6. La carragenina reduce significativamente la concentración en suero de TNF $\alpha$ , IL12 e INF $\gamma$ y no afecta IL10, el BCG no afecta la concentración de ninguna citocina

Finalmente buscamos determinar los mediadores inflamatorios implicados en cada uno de nuestros modelos tomando como referencia las citocinas más comunes, por lo que decidimos medir la concentración en suero de TNF  $\alpha$ , IL12, INF  $\gamma$  e IL10.

En la figura 13 se puede apreciar que la carragenina presentaba una reducción significativa de la concentración de TNF  $\alpha$ , IL12 e INF $\gamma$ , pero no se observó ningún efecto en IL 10.

El BCG no mostró ningún efecto en la concentración de citocinas al menos al momento de hacer la medición a las 48 horas.

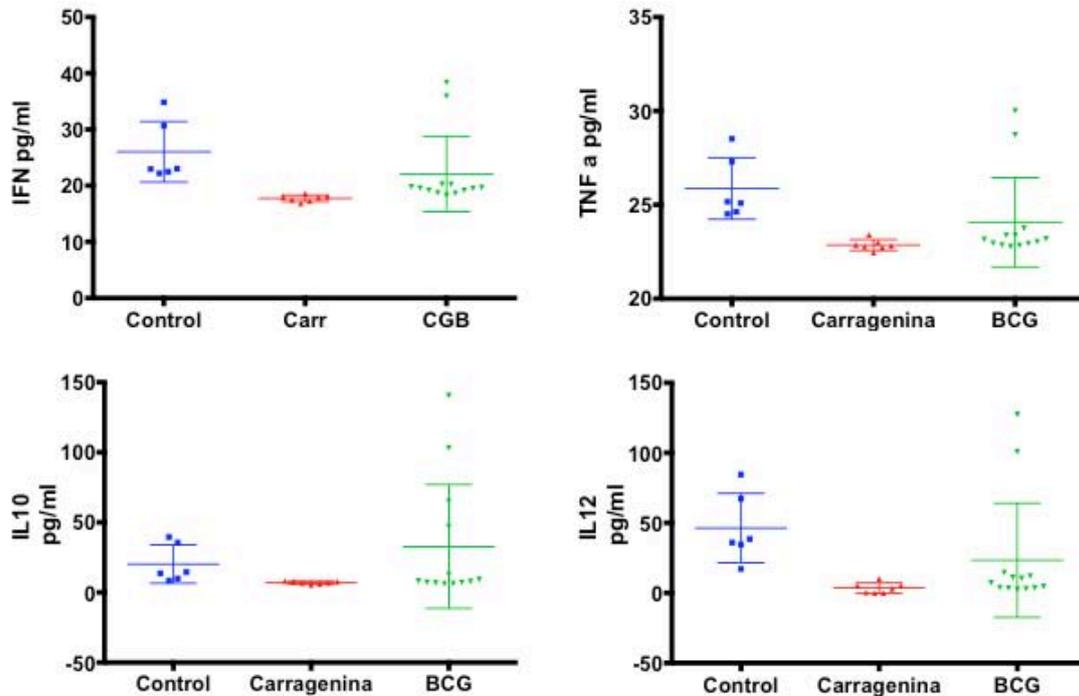


Figura 13: La carragenina reduce significativamente la concentración en suero de TNF $\alpha$ , IL12 e INF $\gamma$  y no tiene efecto sobre IL10, el BCG no tiene efectos sobre la concentración de citocinas. ANOVA post hoc Tukey, para encontrar diferencias significativas entre el modelo inflamatorio y las que recibieron ibuprofeno usamos la prueba t. Cada barra representa la media con el error estándar para 8 o 10 ratas. \*\*p<0.005.

En la tabla 4 resumimos el número de animales por grupo, la CPP o CPA promedio y el intervalo de confianza 95%.

Grupo	n	Mean CPP	95% CI
Control	10	-3.5	-79.1, 72.2
Morfina	10	180.5	127.6, 233.3
Carr250+Mor	9	63.6	-25.8, 153
Carr250+Den+Mor	9	190	39.6, 340.3
Carr750+Den+Mor	9	11.6	-76.7, 99.9
BCG+Mor	10	34.1	-40.4, 108.6
Mor + Ibu	8	111.9	31.7, 192.2
Carr750+Den+Mor +Ibu	8	487.9	399.1, 576.6
BCG + Mor + Ibu	8	-150.7	-238.9, -62.5
Nicotina 1mg/kg	12	136.6	57.1, 215.1
Carr750 +Den+Nic1mg/kg	12	-6.1	-66.1, 53.8
BCG+Nic1mg/kg	12	6.6	-52.7, 65.9
Carr750+Den+Nic1mg/kg+Ibu	10	88.7	7.2, 170.2
BCG+Nic1mg/kg+Ibu	10	-16.2	-65.7, 33.4
Nicotina 2mg/kg	12	-129.1	-139.9, -118.3
Carr750 +Den+Nic2mg/kg	12	-182.2	-270.4, -93.9
BCG+Nic2mg/kg	12	35.2	-63.7, 134.1
Carr750+Den+Nic2mg/kg+Ibu	10	-115.9	-306.8, 75.1
BCG+Nic2mg/kg+Ibu	10	-63.9	-98.2, -29.5

Tabla 4: Resumen de población CPP o CPA medios e intervalo de confianza 95%.

## 5. **Discusión**<sup>[6]</sup>

En este estudio logramos demostrar que: 1) la inflamación periférica no dolorosa inducida tanto con la administración intraplantar de carragenina como con la administración intraperitoneal del bacilo de *Calmette-Guerin*, pueden inhibir la conducta de preferencia de sitio condicionada inducida con morfina y nicotina, 2) el efecto de la carragenina desaparece al administrarse un fármaco que bloquea la síntesis de prostaglandinas (ibuprofeno), pero el efecto inducido por la administración intraperitoneal del bacilo de *Calmette-Guerin* se mantiene a pesar de la administración de ibuprofeno, y 3) la inflamación periférica no dolorosa inducida con la administración de carragenina no tiene efecto sobre la aversión de sitio condicionada con nicotina, mientras que la inflamación periférica no dolorosa inducida con el bacilo de *Calmette-Guerin* bloquea este efecto aversivo a la nicotina, y la administración de ibuprofeno no la modifica.

Con relación al primer punto, primero validamos nuestro modelo de inflamación periférica replicando los hallazgos previos reportados por Narita y colaboradores (2005) en donde se demuestra que la inflamación dolorosa puede disminuir el condicionamiento de preferencia de sitio inducida por la administración de morfina. Sin embargo, encontramos que la inflamación no dolorosa también puede bloquear del condicionamiento de aversión además del de preferencia.

En la primera fase de nuestro proyecto decidimos usar el modelo de administración intraplantar de carragenina ya que en estudios previos se demostró éste fármaco que logra inhibir la preferencia de sitio condicionada con morfina (Narita et al. 2005). Sin embargo, en un trabajo posterior Narita y Kishimoto reportaron que las ratas sometidas a la administración intraplantar de carragenina presentaban inflamación pero también dolor; por lo que consideramos importante hacer una modificación a este modelo que nos permitiera separar estos dos componentes. Para lo cual se procedió a realizar una denervación del nervio ciático previo a la administración del agente inflamatorio para asegurar que los sujetos presentaran inflamación sin la percepción dolorosa.

Encontramos que las ratas que eran expuestas a dosis bajas de carragenina (Carr250 + Den +Mor; Fig. 7) tenían un condicionamiento de preferencia de sitio (CPP) comparable a las que no recibían carragenina, lo cual señala que niveles bajos de inflamación sin dolor no son suficientes para prevenir la recompensa, sugiriendo que existe un efecto sinérgico entre el estímulo inflamatorio y el doloroso en la inhibición del condicionamiento inducido por opioides. Estos resultados deben ser considerados con cautela ya que se ha demostrado que el dolor es un importante estímulo pro inflamatorio y que el bloqueo nervioso puede disminuir la respuesta del sistema inmunológico inducida por la administración de carragenina (Beloil et al. 2009). Considerando estos resultados decidimos incrementar la dosis de carragenina y administramos 750 µl (vía intraplantar) y encontramos que el CPP también disminuía significativamente, fortaleciendo la hipótesis de que los estímulos inflamatorios no dolorosos son capaces de inhibir la respuesta de recompensa inducida por morfina (Fig. 7)

Con respecto a la nicotina, encontramos que la inflamación no dolorosa inducida por la administración intraplantar de 750 µl de carragenina inhibe la respuesta condicionada de sitio, pero no produce ningún cambio en la conducta de aversión a nicotina. Estos resultados podría deberse a los neurotransmisores asociados a cada una de estas sustancias, mientras que la nicotina en dosis bajas (utilizada para inducir preferencia) incrementa la liberación de dopamina y glutamato (De Biasi y Salas 2008), las dosis mayores (utilizadas para inducir aversión) incrementan la liberación de GABA desde la habénula lateral hacia el VTA inhibiendo la función global del sistema de recompensa y la liberación dopaminérgica, y por lo tanto generando la conducta de aversión, lo cual confirma observaciones previas (Frahm y Slimak 2011).

Como se mencionó anteriormente, la administración de carragenina previene la CPP condicionada con morfina; efecto que aparentemente se debe a un bloqueo del sistema opioidérgico, ya que la administración del agonista del receptor opioide mu **DAMGO** <sup>[7]</sup> recuperaba la recompensa inducida por la administración de morfina (Narita et al. 2005). Sin embargo, deben considerarse otros efectos que se han probado con la administración de carragenina. En este sentido, este modelo está caracterizado por la producción

principalmente de prostaglandinas, principalmente PGE<sub>2</sub> (Guay et al. 2004) y como hemos mencionado, estos mensajeros tienen una gran capacidad para modificar la función de numerosos neurotransmisores como la acetilcolina y los opioides (*vide supra*). La PGE<sub>2</sub> es esencial para generar depresión en modelos de estrés social y cuando se administra un antagonista o se desarrolla un knock-out condicional del receptor de prostaglandinas, esto genera un aumento de la transmisión dopaminérgica y previene la conducta depresiva (Tanaka et al. 2012); en el mismo sentido, la síntesis de prostaglandinas en SNC puede generar aversión condicionada de sitio (CPA) en presencia de una respuesta inflamatoria (Fritz et al. 2016).

Estos efectos podrían explicar lo observado en nuestro experimento, es decir, el bloqueo de la preferencia condicionada de sitio tanto a morfina como a nicotina, inducido por la administración de carragenina, ya que es posible suponer que en principio la carragenina bloquea la activación del receptor opioide (Heinisch y Kirby 2011) y disminuye la liberación dopaminérgica en el sistema mesocorticolímbico (Felger et al. 2007), pero no presenta ningún efecto en la CPA condicionada por nicotina ya que este efecto aversivo es principalmente mediado por GABA (Frahm y Slimak 2011).

En el segundo modelo inflamatorio utilizado en este proyecto administramos el bacilo de *Calmette-Guerin*, debido a que ha demostrado inducir conducta depresiva en modelos animales, además de que las micobacterias en general disminuyen la síntesis de PGE<sub>2</sub> (Yamashita et al. 2007). Esto nos permitió trabajar con 2 modelos de inducción de inflamación periférica bien caracterizados en el campo de la activación inmunológica y que son mutuamente excluyentes.

En el modelo del BCG se ha reportado un incremento rápido y localizado de IL-12, por parte de los macrófagos peritoneales, lo que da lugar a la respuesta inmune adaptativa con un incremento en la concentración de INFγ por parte de los linfocitos T (Van Crevel et al. 2002). La administración del bacilo también incrementa de manera importante la actividad de la enzima degradadora de triptófano IDO incrementando la concentración de los mediadores de la vía de la kinurenina, siendo este incremento dependiente del incremento de INF (O'Connor et al. 2009). La vía de la kinurenina, como ya se explicó con mayor detalle en la introducción, tiene propiedades como antagonista del receptor

NMDA y AMPA, así como en el metabolismo dopaminérgico (Török et al. 2016; Okuno, Fukuwatari y Shibata 2011). En nuestro trabajo el BCG bloqueó el CPP condicionado con morfina y con nicotina, pero a diferencia de la carragenina, la administración intraperitoneal del bacilo (BCG) también antagonizó el efecto aversivo condicionado con nicotina (CPA), lo cual sugiere que ambos modelos ejercen su efecto en alguno de los puntos convergentes del sistema de recompensa.

Para determinar si nuestros modelos eran susceptibles a modulación farmacológica administramos ibuprofeno, un inhibidor no selectivo de la enzima ciclo-oxigenasa (COX), esencial en la producción de prostaglandinas.

En las dosis usadas en nuestro estudio el ibuprofeno demostró reducir en un 76% la producción de PGE<sub>2</sub> (Bassem 2013), en el modelo de carragenina, resultado que confirma lo reportado por otros (Press 2013).

El efecto que encontramos con la administración de ibuprofeno fue en la modulación de la respuesta inflamatoria inducida por carragenina, donde el pretratamiento con nuestro fármaco anti inflamatorio consistentemente recuperaba la CPP condicionada con morfina y nicotina (Fig. 10), incluso incrementándola en algunos experimentos (Fig. 10), mientras que los animales que recibían ibuprofeno y morfina o nicotina, sin inflamación no presentaban ningún efecto (Fig. 10). Estos resultados sugieren que los cambios inducidos por la administración de ibuprofeno se deben a su interacción con la respuesta inflamatoria inducida por carragenina, lo cual apoya nuestra hipótesis.

Por otro lado, los animales tratados con BCG no mostraron cambios en el condicionamiento a morfina o nicotina después de la administración de ibuprofeno (Fig. 10).<sup>[8][9]</sup>

Una vez determinada la respuesta conductual, decidimos obtener un perfil de citocinas a las 48 horas de administrado el estímulo inflamatorio, y encontramos que la carragenina disminuye de manera significativa los niveles de TNF $\alpha$ , IL1, IL 12 e INF $\gamma$  (Fig. 13).

Estos resultados confirman lo publicado en la literatura por Loram y colaboradores (2007) que encontró que después de un intervalo corto de tiempo no existe cambio en las citocinas en respuesta a la administración intraplantar de carragenina (Loram et al. 2007). Es posible que en la situación de nuestro modelo (con una dosis de carragenina más alta) y un seguimiento

de tan solo 48 horas, haya causado la expresión a la baja de estos mensajeros (Dooper et al. 2002), sin embargo no podemos decir que el cambio detectado en la concentración plasmática de citocinas esté relacionado con los cambios observados en la conducta condicionada a morfina y nicotina.

Nuestra evidencia sugiere que existen al menos dos fenómenos inflamatorios periféricos diferentes e independientes que modifican la respuesta de preferencia de sitio condicionada a dos fármacos de abuso con un sustrato neural diferente, y que uno de los modelos de inflamación es susceptible a la modulación con un inhibidor de la COX (ibuprofeno), mientras que el otro no responde a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas.

Por último, creemos que la interacción encontrada en este trabajo entre los mediadores inflamatorios y el sistema de motivación podría llevar al desarrollo de terapias más efectivas contra el abuso de sustancias y eventualmente también al desarrollo de terapias más seguras para el dolor crónico y para el trastorno depresivo.

## **6. Conclusiones**

1. La inflamación periférica no dolorosa inducida tanto con la administración intraplantar de carragenina como con la administración intraperitoneal del bacilo de *Calmette-Guerin*, pueden inhibir la conducta de preferencia de sitio condicionada inducida con morfina y nicotina

2. El efecto de la carragenina desaparece al administrarse un fármaco que bloquea la síntesis de prostaglandinas (ibuprofeno), pero el efecto inducido por la administración intraperitoneal del bacilo de *Calmette-Guerin* se mantiene a pesar de la administración de ibuprofeno

3. La inflamación periférica no dolorosa inducida con la administración de carragenina no tiene efecto sobre la aversión de sitio condicionada con nicotina, mientras que la inflamación periférica no dolorosa inducida con el bacilo de *Calmette-Guerin* bloquea este efecto aversivo a la nicotina, y la administración de ibuprofeno no la modifica

## 7. Perspectivas

1. Con los resultados obtenidos en este proyecto, podemos decir que la inflamación no dolorosa afecta la respuesta de condicionamiento en el modelo de preferencia de sitio condicionado; sin embargo el diseño experimental utilizado no identifica si el bloqueo en la respuesta condicionada a morfina y/o nicotina podría deberse a problemas de movilidad (motores) o de memoria (cognitivos) por lo que es necesario agregar una prueba que nos permita identificar la participación motora y cognitiva en nuestro diseño, para lo cual proponemos utilizar el modelo de preferencia de las dos botellas (Yamamoto 2011). Y eventualmente, sería interesante evaluar el efecto de la inflamación periférica en modelos de autoadministración de fármacos de abuso. (esta es una sugerencia doctora)
2. Otro punto importante que queda por resolver es determinar los mediadores inflamatorios implicados en estos modelos a lo largo de los días del experimento, hasta ahora no se ha realizado una evaluación de todos los mediadores que puedan estar implicados, especialmente el rastreo de prostaglandinas; además en la literatura reportada y en el presente trabajo no se hizo y sería importante entender la dinámica de estos mediadores.
3. Es importante también comprender como se alteran a un nivel molecular la función de los receptores opioidérgicos y nicotínicos, por lo que sería importante determinar en presencia de los mediadores inflamatorios de nuestro modelo, cómo se altera la respuesta de estos receptores a sus ligandos endógenos.

## 8.- Referencias

- 1.- Lynch, W. J., Nicholson, K. L., Dance, M. E., Morgan, R. W., & Foley, P. L. (2010). Animal Models of Substance Abuse and Addiction: Implications for Science, Animal Welfare, and Society. *Comparative Medicine*, 60(3), 177–188.
- 2.-Alexander, G. C. (2015). The Prescription Opioid Epidemic: An Evidence-Based Approach, 1–46. Retrieved from papers3://publication/uuid/86333084-4D74-423B-8BA3-050B84A6F6EB
- 3.- World Health Organization. (2015). WHO global report on trends in prevalence of tobacco smoking 2015. WHO Magazine, 359. [http://doi.org/978 92 4 156492 2](http://doi.org/978_92_4_156492_2)
- 4.- Mercuri, N., Calabresi, P., Stanzione, P. & Bernardi, G. (1985). Electrical stimulation of mesencephalic cell groups (A9-A10) produces monosynaptic excitatory potentials in rat frontal cortex. *Brain Res.* 338, 192–195
- 5.- Morales, M., & Margolis, E. B. (2017). Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(2), 73–85. <http://doi.org/10.1038/nrn.2016.165>
- 6.- Badiani, A., Belin, D., Epstein, D., Calu, D., & Shaham, Y. (2011). Opiate versus psychostimulant addiction: the differences do matter. *Nat Rev Neurosci*, 12(11), 685–700. <http://doi.org/10.1038/nrn3104>
- 7.- Siegel G. Et. al. (2006) *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects*, Chapter 12, Catecholamines, Seventh edition, Elsevier
- 8.- Merrer J., Becker J., et. al., Reward Processing by the Opioid System in the Brain, *Physiol Rev* 89: 1379–1412, 2009; doi:10.1152/physrev.00005.2009
- 9.- Johnson, S. W. & North, R. A. (1992) Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J. Neurosci.* 12, 483–488.
- 10.- Shaham, Y., & Stewart, J. (1996). Effects of opioid and dopamine receptor antagonists on relapse induced by stress and re-exposure to heroin in rats. *Psychopharmacology*, 125(4), 385–391. <http://doi.org/10.1007/BF02246022>
- 11.- Fields, H. L., & Margolis, E. B. (2015). Understanding Opioid Reward. *Trends in Neurosciences*, 38(4), 217–225. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2015.01.002>
- 12.- De Biasi, M., & Salas, R. (2008). Influence of Neuronal Nicotinic Receptors over Nicotine Addiction and Withdrawal. *Experimental Biology and Medicine*, 233(8), 917–929. <http://doi.org/10.3181/0712-MR-355>
- 13.- D'Souza, M. S., & Markou, A. (2011). Neuronal mechanisms underlying development of nicotine dependence: implications for novel smoking-cessation treatments. *Addiction Science & Clinical Practice*, 6(1), 4–16. <http://doi.org/10.2144/000113884>
- 14.- Benowitz, N. L., Hukkanen, J., & Jacob, P. (2009). Nicotine *Psychopharmacology. Handbook of Experimental Pharmacology*, 192(192), 29–60. <http://doi.org/10.1007/978-3-540-69248-5>
- 15.- Domino, E. F. (2001). Nicotine induced behavioral locomotor sensitization. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 25(1), 59–71. [http://doi.org/10.1016/S02785846\(00\)00148-2](http://doi.org/10.1016/S02785846(00)00148-2)

- 16.- De Biasi, M., & Salas, R. (2008). Influence of Neuronal Nicotinic Receptors over Nicotine Addiction and Withdrawal. *Experimental Biology and Medicine*, 233(8), 917–929. <http://doi.org/10.3181/0712-MR-355>
- 17.- Frahm, S., & Slimak, M. A. (2011). Molecular Dissection of Neural Circuits Controlling Nicotine Aversion.
- 18.- Zald, D., Zatorre, R. (2011). Neurobiology of Sensation and Reward, Chapter 19 Music, Gottfried JA, editor. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis.
- 19.- Wise, R. A., & Morales, M. (2010). A ventral tegmental CRF-glutamate-dopamine interaction in addiction. *Brain Research*, 1314, 38. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.101>
- 20.- Laviolette, S. R., & Van Der Kooy, D. (2001). GABA A receptors in the ventral tegmental area control bidirectional reward signalling between dopaminergic and non-dopaminergic neural motivational systems. *European Journal of Neuroscience*, 13(5), 1009–1015. <http://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2001.01458.x>
- 21.- Smith, K. S., Tindell, A. J., Aldridge, J. W., & Berridge, K. C. (2009). Ventral Pallidum Roles in Reward and Motivation. *Behavioural Brain Research*, 196(2), 155–167. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.09.038>
- 22.- Kress, M. (2010). Nociceptor Sensitization by Proinflammatory Cytokines And Chemokines. *Open Pain J*, 97–107. <http://doi.org/10.2174/1876386301003010097>
- 23.- Heinisch, S., Palma, J., & Kirby, L. G. (2011). Interactions between chemokine and mu-opioid receptors: Anatomical findings and electrophysiological studies in the rat periaqueductal grey. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(2), 360–372. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.10.020>
- 24.- Coffeen, U., Ortega-Legaspi, J. M., de Gortari, P., Simón-Arceo, K., Jaimes, O., Amaya, M. I., & Pellicer, F. (2010). Inflammatory nociception diminishes dopamine release and increases dopamine D2 receptor mRNA in the rat's insular cortex. *Molecular Pain*, 6, 75. <http://doi.org/10.1186/1744-8069-6-75>
- 25.- Felger, J. C., Alagbe, O., Hu, F., Mook, D., Freeman, A. A., Sanchez, M. M., ... Miller, A. H. (2007). Effects of Interferon-alpha on Rhesus Monkeys: A Non-Human Primate Model of Cytokine-Induced Depression. *Biological Psychiatry*, 62(11), 1324–1333. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.05.026>
- 26.- Felger, J. C., & Miller, A. H. (2012). Cytokine effects on the basal ganglia and dopamine function: The subcortical source of inflammatory malaise. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 33(3), 315–327. <http://doi.org/10.1016/j.yfrne.2012.09.003>
- 27.- Narita, M., Kishimoto, Y., Ise, Y., Yajima, Y., Misawa, K., & Suzuki, T. (2005). Direct Evidence for the Involvement of the Mesolimbic k -Opioid System in the Morphine-Induced Rewarding Effect Under an Inflammatory Pain-Like State, 111–118. <http://doi.org/10.1038/sj.npp.1300527>
- 28.- Siegel G. Et. al. (2006) *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects*, Chapter 15, Glutamate, Seventh edition, Elsevier
- 29.- Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences*, 32(12), 638–647. <http://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002>

- 30.- Harvey, B. K., Airavaara, M., Hinzman, J., Wires, E. M., Chiocco, M. J., Howard, D. B., ... Wang, Y. (2011). Targeted over-expression of glutamate transporter 1 (GLT-1) reduces ischemic brain injury in a rat model of stroke. *PLoS ONE*, 6(8), 1–7. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0022135>
- 31.- Takeuchi, H., Jin, S., Wang, J., Zhang, G., Kawanokuchi, J., Kuno, R., ... Suzumura, A. (2006). Tumor necrosis factor-alpha induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *Journal of Biological Chemistry*, 281(30), 21362–21368. <http://doi.org/10.1074/jbc.M600504200>
- 32.- Kuno, R., Wang, J., Kawanokuchi, J., Takeuchi, H., Mizuno, T., & Suzumura, A. (2005). Autocrine activation of microglia by tumor necrosis factor-alpha. *Journal of Neuroimmunology*, 162(1-2), 89–96. <http://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.01.015>
- 33.- Saha, R. N., Liu, X., & Pahan, K. (2006). Up-regulation of BDNF in astrocytes by TNF-alpha: A case for the neuroprotective role of cytokine. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 1(3), 212–222. <http://doi.org/10.1007/s11481-006-9020-8>
- 34.- Vécsei, L., Szalárdy, L., Fülöp, F., & Toldi, J. (2012). Kynurenines in the CNS: recent advances and new questions. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(1), 64–82. <http://doi.org/10.1038/nrd3793>
- 35.- Török, N., Majláth, Z., Fülöp, F., & Vécsei, J. T. and L. (2016). Brain Aging and Disorders of the Central Nervous System: Kynurenines and Drug Metabolism. *Current Drug Metabolism*. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/1389200217666151222155043>
- 36.- Lim, C. K. et al. (2017) Kynurenine pathway metabolomics predicts and provides mechanistic insight into multiple sclerosis progression. *Sci. Rep.* 7, 41473; doi: 10.1038/srep41473.
- 37.- Ventura, R., Morrone, C., & Puglisi-Allegra, S. (2007). Prefrontal/accumbal catecholamine system determines motivational salience attribution to both reward- and aversion-related stimuli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(12), 5181–5186. <http://doi.org/10.1073/pnas.0610178104>
- 38.- Okuno, A., Fukuwatari, T., & Shibata, K. (2011). High tryptophan diet reduces extracellular dopamine release via kynurenic acid production in rat striatum. *Journal of Neurochemistry*, 118(5), 796–805. <http://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07369.x>
- 39.- Linderholm, K. R., Alm, M. T., Larsson, M. K., Olsson, S. K., Goiny, M., Hajos, M., ... Engberg, G. (2016). Inhibition of kynurenine aminotransferase II reduces activity of midbrain dopamine neurons. *Neuropharmacology*, 102, 42–47. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.028>
- 40.- Haruki, H., Hovius, R., Pedersen, M. G., & Johnsson, K. (2016). Tetrahydrobiopterin Biosynthesis as a Potential Target of the Kynurenine Pathway Metabolite Xanthurenic Acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(2), 652–657. <http://doi.org/10.1074/jbc.C115.680488>
- 41.- Kapatos, G. (2013). The neurobiology of tetrahydrobiopterin biosynthesis: A model for regulation of GTP cyclohydrolase I gene transcription within nigrostriatal dopamine neurons. *IUBMB Life*, 65(4), 323–333. <http://doi.org/10.1002/iub.1140>
- 42.- Réus, G. Z., Jansen, K., Titus, S., Carvalho, A. F., Gabbay, V., & Quevedo, J. (2015). Kynurenine pathway dysfunction in the pathophysiology and treatment of depression: evidences from animal and human studies. *Journal of Psychiatric Research*, 68, 316–328. <http://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2015.05.007>

- 43.- Cui, F., Zhou, L., Wang, Z., Lang, C., Park, J., Tan, Z., ... Kong, J. (2017). Altered Functional Connectivity of Striatal Subregions in Patients with Multiple Sclerosis. *Frontiers in Neurology*, 8, 129. <http://doi.org/10.3389/fneur.2017.00129>
- 44.- Nagaraj K, Taly AB, Gupta A, Prasad C, Christopher R. (2013) Prevalence of fatigue in 626 patients with multiple sclerosis and its effect on the quality of life. *J Neurosci Rural Pract*;4:278–82.
- 45.-Jongen PJ, Ter Horst AT, Brands AM. (2012) Cognitive impairment in multiple sclerosis. *Minerva Med.*;103:73–96 Página 18 de 124
- 46.- Bergendal G, Fredrikson S, Almkvist O. (2007) Selective decline in information processing in subgroups of multiple sclerosis: An 8-year longitudinal study. *Eur Neurol*;57:193–202
- 47.- Patel, K. R., Cherian, J., Gohil, K., & Atkinson, D. (2014). Schizophrenia: Overview and Treatment Options. *Pharmacy and Therapeutics*, 39(9), 638–645.
- 48.- Potvin S, Stip E, Sepehry AA, Gendron A, Bah R, Kouassi E: (2008) Inflammatory cytokine alterations in schizophrenia: a systematic quantitative review. *Biol Psychiatry*;63:801-808.
- 49.- Wildenauer DB, Körschenhausen D, Hoechtlen W, Ackenheil M, Kehl M, Lottspeich F: (1991) Analysis of cerebrospinal fluid from patients with psychiatric and neurological disorders by two-dimensional electrophoresis: identification of disease-associated polypeptides as fibrin fragments. *Electrophoresis*;12:487-492.
- 50.- Winter C, Djodari-Irani A, Sohr R, Morgenstern R, Feldon J, Juckel G, Meyer U: (2009) Prenatal immune activation leads to multiple changes in basal neurotransmitter levels in the adult brain: implications for brain disorders of neurodevelopmental origin such as schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol*;12:513-524.
- 51.- Kegel, M. E., Bhat, M., Skogh, E., Samuelsson, M., Lundberg, K., Dahl, M.-L., ... Erhardt, S. (2014). Imbalanced Kynurenine Pathway in Schizophrenia. *International Journal of Tryptophan Research : IJTR*, 7, 15–22. <http://doi.org/10.4137/IJTR.S16800>
- 52.- Ben-Shaanan, T. L., Azulay-Debby, H., Dubovik, T., Starosvetsky, E., Korin, B., Schiller, M., ... Rolls, A. (2016). Activation of the reward system boosts innate and adaptive immunity. *Nature Medicine*, 22, 940. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4133>
- 53.- Diener, E., Pressman, S. D., Hunter, J., & Delgado-Chase, D. (2017). If, Why, and When Subjective Well-Being Influences Health, and Future Needed Research. *Applied Psychology: Health and Well-Being*, 9(2), 133–167. <http://doi.org/10.1111/aphw.12090>
- 54.- Siegel G. Et. al. (2006) *Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects*, Chapter 11, Acetylcholine, Seventh edition, Elsevier
- 55.- Du, C., Siegelbaum, S. A., Role, L. W., & Tan, W. E. N. (2013). Modulation of Nicotinic AChR Channels by Prostaglandin E 2 in Chick Sympathetic Ganglion Neurons Modulation of Nicotinic AChR Channels by Prostaglandin E 2 in Chick Sympathetic Ganglion Neurons, 870–878.
- 56.- Skok, Vladimir I. (2002), Nicotinic acetylcholine receptors in autonomic ganglia, *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, Volume 97, Issue 1, 1 – 11. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1566-0702\(01\)00386-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1566-0702(01)00386-1)
- 57.- Konradsson-Geuken, Å., Gash, C. R., Alexander, K., Pomerleau, F., Huettl, P., Gerhardt, G. A., & Bruno, J. P. (2009). Second-By-Second Analysis of Alpha 7 Nicotine Receptor

Regulation of Glutamate Release in the Prefrontal Cortex of Awake Rats. *Synapse* (New York, N.Y.), 63(12), 1069–1082. <http://doi.org/10.1002/syn.20693>

- 58.- Berridge, K. C., & Kringelbach, M. L. (2015). Pleasure systems in the brain. *Neuron*, 86(3), 646–664. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.018>
- 59.- Allouche, S., Noble, F., & Marie, N. (2014). Opioid receptor desensitization: mechanisms and its link to tolerance. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 280. <http://doi.org/10.3389/fphar.2014.00280>
- 60.- Willemsen, H. L. D. M., Eijkelkamp, N., Wang, H., Dantzer, R., Dorn, G. W., Kelley, K. W., Kavelaars, A. (2010). Microglial/macrophage GRK2 determines duration of peripheral IL-1 $\beta$ -induced hyperalgesia: contribution of spinal cord CX3CR1, p38 and IL-1 signaling. *Pain*, 150(3), 550–560. <http://doi.org/10.1016/j.pain.2010.06.015>
- 61.- Eidson, L. N., Inoue, K., Young, L. J., Tansey, M. G., & Murphy, A. Z. (2016). Toll-like Receptor 4 Mediates Morphine-Induced Neuroinflammation and Tolerance via Soluble Tumor Necrosis Factor Signaling. *Neuropsychopharmacology*, 42, 661. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2016.131>
- 62.- Gabriel Olmos and Jerònia Lladó., (2014), Tumor Necrosis Factor Alpha: A Link between Neuroinflammation and Excitotoxicity, *Mediators of Inflammation*, vol. 2014, Article ID 861231, 12 pages. doi:10.1155/2014/861231
- 63.- Lim, P. S., Sutton, C. R., & Rao, S. (2015). Protein kinase C in the immune system: from signalling to chromatin regulation. *Immunology*, 146(4), 508–522. <http://doi.org/10.1111/imm.12510>
- 64.- Dantzer, R. (2006). Cytokine, Sickness Behavior, and Depression. *Neurologic Clinics*, 24(3), 441–460. <http://doi.org/10.1016/j.ncl.2006.03.003>
- 65.- Jin, S., Kim, J. G., Park, J. W., Koch, M., Horvath, T. L., & Lee, B. J. (2016). Hypothalamic TLR2 triggers sickness behavior via a microglia-neuronal axis. *Scientific Reports*, 6, 29424. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/srep29424>
- 66.- Miller, A. H., & Raison, C. L. (2015). The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nature Reviews Immunology*, 16(1), 22–34. <http://doi.org/10.1038/nri.2015.5>
- 67.- Akhondzadeh, S., Jafari, S., Raisi, F., Nasehi, A. A., Ghoreishi, A., Salehi, B., Mohebbi-Rasa, S., Raznahan, M. and Kamalipour, A. (2009), Clinical trial of adjunctive celecoxib treatment in patients with major depression: a double blind and placebo controlled trial. *Depress. Anxiety*, 26: 607–611. doi:10.1002/da.20589
- 68.- Mendlewicz, J., Kriwin, P., Oswald, P., Souery, D., Alboni, S., & Brunello, N. (2006). Shortened onset of action of antidepressants in major depression using acetylsalicylic acid augmentation: a pilot open-label study. *International Clinical Psychopharmacology*, 21(4), 227–231. <http://doi.org/10.1097/00004850-200607000-00005>
- 69.- Nagaraj K, Taly AB, Gupta A, Prasad C, Christopher R. (2013) Prevalence of fatigue in 626 patients with multiple sclerosis and its effect on the quality of life. *J Neurosci* 627 Rural Pract;4:278–82.
- 70.- Jongen PJ, Ter Horst AT, Brands AM. (2012) Cognitive impairment in multiple sclerosis. *Minerva Med.*;103:73–96

- 71.- Marrie, R. A., Reingold, S., Cohen, J., Stuve, O., Trojano, M., Sorensen, P. S., ... Reider, N. (2015). The incidence and prevalence of psychiatric disorders in multiple sclerosis: A systematic review. *Multiple Sclerosis* (Houndmills, Basingstoke, England), 21(3), 305–317. <http://doi.org/10.1177/1352458514564487>
- 72.- Borghi M, Cavallo M, Carletto S, Ostacoli L, Zuffranieri M, Picci RL, et al. (2013) Presence and Significant Determinants of Cognitive Impairment in a Large Sample of Patients with Multiple Sclerosis. *PLoS ONE* 8(7): e69820. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069820>
- 73.- Bergendal G, Fredrikson S, Almkvist O. (2007) Selective decline in information processing in subgroups of multiple sclerosis: An 8-year longitudinal study. *Eur Neurol*;57:193–202
- 74.- Nebel K, Wiese H, Seyfarth J, Gizewski ER, Stude P, Diener HC, et al. (2007) Activity of attention related structures in multiple sclerosis patients. *Brain Res.*;1151:150–60.
- 75.- Beloeil, H., Gentili, M., Benhamou, D., & Mazoit, J. X. (2009). The effect of a peripheral block on inflammation-induced prostaglandin E2 and cyclooxygenase expression in rats. *Anesthesia and Analgesia*, 109(3), 943–950. <http://doi.org/10.1213/ane.0b013e3181aff25e>
- 76.- Narita, M., Kishimoto, Y., Ise, Y., Yajima, Y., Misawa, K., & Suzuki, T. (2005). Direct Evidence for the Involvement of the Mesolimbic k -Opioid System in the Morphine-Induced Rewarding Effect Under an Inflammatory Pain-Like State, 111–118. <http://doi.org/10.1038/sj.npp.1300527>
- 77.- Beloeil, H., Gentili, M., Benhamou, D., & Mazoit, J. X. (2009). The effect of a peripheral block on inflammation-induced prostaglandin E2 and cyclooxygenase expression in rats. *Anesthesia and Analgesia*, 109(3), 943–950. <http://doi.org/10.1213/ane.0b013e3181aff25e>
- 78.- Guay, J., Bateman, K., Gordon, R., Mancini, J., & Riendeau, D. (2004). Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E2 (PGE2) response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE2 synthase-1. *Journal of Biological Chemistry*, 279(23), 24866–24872. <http://doi.org/10.1074/jbc.M403106200>
- 79.- Tanaka, K., Furuyashiki, T., Kitaoka, S., Senzai, Y., Imoto, Y., Segi-Nishida, E., ... Narumiya, S. (2012). Prostaglandin E2-mediated attenuation of mesocortical dopaminergic pathway is critical for susceptibility to repeated social defeat stress in mice. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(12), 4319–29. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5952-11.2012>
- 80.- Fritz, M., Klawonn, A. M., Nilsson, A., Singh, A. K., Zajdel, J., Björk Wilhelms, D., ... Engblom, D. (2016). Prostaglandin-dependent modulation of dopaminergic neurotransmission elicits inflammation-induced aversion in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 126(2), 695–705. <http://doi.org/10.1172/JCI8384>
- 81.- Yamashita, M., Shinohara, T., Tsuji, S., Myrvik, Q. N., Nishiyama, A., Henriksen, R. A., & Shibata, Y. (2007). Catalytically inactive cyclooxygenase 2 and absence of prostaglandin E2 biosynthesis in murine peritoneal macrophages following in vivo phagocytosis of heat-killed *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 179(10), 7072–8. <http://doi.org/10.1093/infdis/jim100> [pii]
- 82.- Van Crevel, R., Ottenhoff, T. H. M., & van der Meer, J. W. M. (2002). Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 294–309. <http://doi.org/10.1128/CMR.15.2.294>
- 83.- O'Connor, J. C., Lawson, M. A., André, C., Briley, E. M., Szegedi, S. S., Lestage, J., ... Kelley, K. W. (2009). Induction of IDO by bacille Calmette-Guérin is responsible for

development of murine depressive-like behavior. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), 182(5), 3202–12. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0802722>

- 84.- Press, D. (2013). Anti-inflammatory agents of the carbamoylmethyl ester class : synthesis , characterization , and pharmacological evaluation, 35–43.
- 85.- Loram, L.C. et al. (2007) Cytokine Profiles During Carrageenan-Induced Inflammatory Hyperalgesia in Rat Muscle and Hind Paw *The Journal of Pain* , Volume 8 , Issue 2 , 127 – 136. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2006.06.010>
- 86.- Dooper, M. M. B. W., Wassink, L., M'Rabet, L., & Graus, Y. M. F. (2002). The modulatory effects of prostaglandin-E on cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells are independent of the prostaglandin subtype. *Immunology*, 107(1), 152–159. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2002.01474.x>
- 87.- Yamamoto, T., & Ueji, K. (2011). Brain Mechanisms of Flavor Learning. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5(September), 1–7. <http://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00076>

## **9.- Índice de figuras**

Figura 1: Distribución general de receptores opioides.

Figura 2: Esquema de las principales vías implicadas en la recompensa y la aversión con sus neurotransmisores implicados.

Figura 3: Ruta metabólica de la kinurenina.

Figura 4: Puntos hedónicos críticos positivos y negativos, y conductas estereotipadas de placer y desagrado.

Figura 5: Diseño experimental.

Figura 6: Técnica quirúrgica y exposición del nervio ciático de la rata.

Figura 7: La inflamación dolorosa inhibe la CPP.

Figura 8: La inflamación no dolorosa con carragenina en dosis alta, pero no dosis baja inhibe la preferencia de sitio condicionada con morfina.

Figura 9: La inflamación no dolorosa con BCG inhibe la preferencia de sitio condicionada con morfina.

Figura 10: El ibuprofeno restablece la CPP inducida por morfina en el modelo de carragenina pero no en el de BCG.

Figura 11: La inflamación no dolorosa con carragenina y BCG inhiben la preferencia de sitio inducida por nicotina (nicotina 1mg/kg).

Figura 12: La inflamación no dolorosa con carragenina no tiene efecto en la aversión a un sitio condicionada con nicotina (nicotina 2mg/kg), el BCG la bloquea.

Figura 13: La carragenina reduce significativamente la concentración en suero de TNF $\alpha$ , IL12 e IFN $\gamma$  y no tiene efecto sobre IL10, el BCG no tiene efectos sobre la concentración de citocinas.

Tabla 1: Efectos de la nicotina sobre la liberación de otros neurotransmisores por región del sistema nervioso central.

Tabla 2: Principales alteraciones neuro-psiquiátricas en pacientes con esclerosis múltiple.

Tabla 3: Resumen de las sesiones de administración de fármacos.

Tabla 4: Resumen de población CPP o CPA medios e intervalo de confianza 95%.

## 10.- Abreviaturas

5HT: 5-hidroxitriptamina/ Serotonina

ACTH: Hormona Adrenocorticotrófica

Amg: Amígdala

AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

ANOVA: Análisis de varianza

ASC: Aversión de sitio condicionada

BCG: Bacilo de Calmette-Guerin

Carr: Carragenina

CPA: Aversión de sitio condicionada

CPP: Preferencia de sitio condicionada

COX: Ciclo-oxigenasa

DA: Dopamina

Den: Denervación

DOR: Receptor opioide Delta

EAAT1: Transportador de Aminoácido Excitatorios 1

GABA: Ácido Gamma Aminobutírico

GIRK: Canal de Potasio Rectificador Acoplado a Proteínas G

HPA: Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal

Hc: Hipocampo

Hyp: Hipocampo

IDO: Indolamina dioxigenasa

Ibu: Ibuprofeno

IFN: Interferón gamma

IL: Interleucina

Ip: Intraperitoneal

Ipl: Intraplantar

K: Potasio

KOR: Receptor opioide Kappa

Kg: Kilogramo

LCR: Líquido Cefalorraquídeo

LPS: Lipopolisacárido

Mg: Miligramo

mGlur: Receptor Metabotrópico de Glutamato  
MI: Mililitro  
Mm: Milímetro  
MOR: Receptor opioide Mu  
Mor: Morfina  
Na: Sodio  
NA: Noradrenalina  
NAc: Núcleo accumbens  
NMDA: N-Metil-D-Aspartato  
NOM: Norma Oficial Mexicana  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
PAG: Área Gris Periacueductal  
PFC: Corteza Prefrontal  
PGE: Prostaglandina E  
PKC: Proteína Kinasa C  
SC: Subcutánea  
Seg: Segundos  
SNC: Sistema Nervioso Central  
TNF: Factor de Necrosis Tumoral alfa  
UFC: Unidades Formadoras de Colonias  
VTA: Área Ventral Tegmental