



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA



Consumo individual de nicotina y presencia de Δ FosB en el núcleo acumbens de ratas macho Wistar crecidas bajo enriquecimiento ambiental y posteriormente aisladas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO

PRESENTA

Julia Tere Morales Morales

DIRECTOR

Dr. Arturo Venebra Muñoz

Toluca, Junio, 2016

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	1
RESUMEN.....	3
INTRODUCCIÓN	4
ANTECEDENTES.....	5
Dependencia a sustancias	5
Tabaco, nicotina y farmacocinética.....	7
Consumo de tabaco.....	9
Sistema de recompensa	14
Síntesis de dopamina	18
Sistema de recompensa y su relación con las drogas de abuso, específicamente nicotina	19
Δ FosB.....	21
Ambiente enriquecido.....	21
JUSTIFICACIÓN	24
HIPOTESIS	25
OBJETIVO GENERAL	26
OBJETIVOS PARTICULARES	26
MÉTODO	27
Organismos	27
Diseño de ambiente enriquecido	27
Condiciones de crecimiento de las ratas (día 21 al 50 posnatal)	27
Estimación de consumo individual de nicotina y agua (día 51 al 74 posnatal).....	28
Preparación de nicotina	29
Identificación del núcleo acumbens (Nissl).....	29
Eutanasia y preparación de tejidos	31
Técnica inmunohistoquímica a Δ FosB.....	31
Conteo celular	32
Análisis estadístico	33
RESULTADOS.....	35

Consumo	35
Inmunohistoquímica	39
DISCUSIONES	44
CONCLUSIÓN	48
LITERATURA	49

LISTA DE ABREVIATURAS

1EN	Periodo 1 del grupo enriquecido
1ES	Periodo 1 del grupo estándar
2EN	Periodo 2 del grupo enriquecido
2ES	Periodo 2 del grupo estándar
3EN	Periodo 3 del grupo enriquecido
3ES	Periodo 3 del grupo estándar
4EN	Periodo 4 del grupo enriquecido
4ES	Periodo 4 del grupo estándar
aca	comisura anterior
AEN	grupo agua enriquecido
AES	grupo agua estándar
ATV	área tegmental ventral
CPF	corteza prefrontal
DA	dopamina
EN	grupo estándar
ES	grupo enriquecido
fmi	fóreps menor del cuerpo calloso
gcc	cuerpo calloso
LV	ventrículos laterales

NAC	núcleo acumbens
NACc	núcleo acumbens core
NACs	núcleo acumbens shell
NEN	grupo nicotina enriquecido
NES	grupo nicotina estándar
NR	núcleos del rafe

RESUMEN

El ambiente al que son expuestos los organismos durante su crecimiento tiene consecuencias sobre la vulnerabilidad del consumo de sustancias. Esta investigación expuso a enriquecimiento ambiental a ratas Wistar macho durante su crecimiento y evaluó su efecto sobre el consumo de nicotina en condiciones de aislamiento. Las ratas Wistar se dividieron en dos grupos, el grupo en ambiente estándar (ES) con cuatro ratas por caja (47x33x1cm) y el grupo en enriquecimiento ambiental (EN) con 8 organismos por caja (75x60x60cm), desde el día 21 al día 50 de vida. En el día 51 y hasta el día 74 todos los animales fueron colocados en cajas individuales, 5 ratas EN y 5 ratas ES se les colocó un bebedero con solución de nicotina (0.0006%) por 12 horas con alimento *ad libitum*. Las 6 ratas restantes consumieron agua potable y alimento *ad libitum*. Al día 75 los animales fueron eutanasiados con pentobarbital sódico (60mg/kg), se extrajo el cerebro y se cortó a 40 micras, se seleccionaron los cortes correspondientes al núcleo acumbens core y shell para ser procesado por la técnica de inmunohistoquímica a Δ FosB. Los resultados muestran que no se encontraron diferencias significativas en el consumo de nicotina de los animales que crecieron en ambiente estándar (ES 8.0026 ± 0.2541 mg/kg/día) y en ambiente enriquecido (EN 8.1907 ± 0.2407 mg/kg/día), pero se encontraron diferencias en el consumo respecto a la edad, la pubertad presentó el mayor consumo en ambos grupos (1ES 9.9131 ± 0.5438 mg/kg/día, 2ES 9.0549 ± 0.4663 mg/kg/día, 1EN 9.1583 ± 0.5438 mg/kg/día y 2EN 9.1301 ± 0.4917 mg/kg/día), en comparación con la adultez (3ES 6.6825 ± 0.3493 mg/kg/día, 4ES 6.3599 ± 0.3694 mg/kg/día, 3EN 7.4344 ± 0.4054 mg/kg/día y 4EN 7.0399 ± 0.3482 mg/kg/día). Los resultados de la inmunohistoquímica no son concluyentes, lo que indica que hay factores individuales que contribuyen a la acumulación de Δ FosB y no solo la cantidad de nicotina consumida. En conclusión podemos ver que el consumo de nicotina es más alto durante la pubertad que durante la adultez, además de que el efecto protector del enriquecimiento ambiental sobre el consumo de nicotina desaparece al aislar a los animales, por lo tanto es necesario mantener las condiciones de enriquecimiento ambiental para usarlo como agente protector al consumo de nicotina.

Palabras clave: adicción, nicotina, enriquecimiento ambiental, Δ FosB

INTRODUCCIÓN

El tabaquismo es la causa de muerte del 8.4% de todas las muertes en México, se relaciona con enfermedades tales como cáncer de pulmón, accidentes cerebrovasculares, neumonía y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC; Pichón-Riviere et al., 2013), la raíz de este problema de salud es el ingrediente activo del tabaco, la nicotina, que es la responsable de la adicción y por lo tanto del tabaquismo, sin embargo no todas las personas que fuman se convierten en adictos, lo que evidencia la participación del ambiente en distintas etapas de vida así como de la genética. Bien se sabe que en la pubertad ocurre el primer contacto con la nicotina llegando a consolidarse hacia la adultez, pero es durante la infancia, la pubertad y la adolescencia donde los humanos se exponen mayormente a ambientes y experiencias diversas que forman su personalidad y dejan una huella biológica, considerándose como un periodo de mayor plasticidad y de prevención al consumo excesivo de sustancias. Es por esto que la presente tesis se enfocó en averiguar como el ambiente en que se desarrollaron nuestros modelos animales afecta el consumo de nicotina y por lo tanto la composición del núcleo accumbens el cual está relacionado con el consumo desmedido de sustancias.

ANTECEDENTES

Dependencia a sustancias

El manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-V, 2014) considera la dependencia como un grupo de tres o más de los síntomas enumerados a continuación, que aparecen en cualquier momento dentro de un mismo período de 12 meses.

- a) Tolerancia: necesidad de recurrir a cantidades crecientes de la sustancia para alcanzar la intoxicación (o el efecto deseado) o una notable disminución de los efectos de la sustancia con su uso continuado a las mismas dosis, en el caso de fumadores, estos suelen consumir más de 20 cigarrillos al día, una cantidad que les hubiera producido síntomas de toxicidad cuando empezaron a fumar.
- b) Abstinencia: cambio de comportamiento desadaptativo, con concomitantes cognoscitivos y fisiológicos, que tiene lugar cuando la concentración en la sangre o los tejidos de una sustancia disminuye en un individuo que ha mantenido un consumo prolongado de grandes cantidades de esa sustancia. Después de la aparición de los desagradables síntomas de abstinencia, el sujeto toma la sustancia a lo largo del día para eliminarlos o aliviarlos normalmente desde que se despierta.
- c) Aumento en el tiempo de exposición a la sustancia
- d) El sujeto puede expresar el deseo persistente de regular o abandonar el consumo de la sustancia.
- e) Es posible que el sujeto dedique mucho tiempo a obtener la sustancia, a tomarla y a recuperarse de sus efectos.
- f) En algunos casos de dependencia de sustancias, todas las actividades de la persona giran virtualmente en torno a la sustancia. Importantes actividades sociales, laborales o recreativas pueden abandonarse o reducirse debido al consumo de la sustancia
- g) También puede ocurrir que, a pesar de reconocer la implicación de la sustancia en un problema tanto psicológico como fisiológico, la persona continúe consumiendo la sustancia.

En el caso de la tolerancia esta se puede deber o bien a cambios funcionales en los lugares de unión de la sustancia (por ejemplo, disminución del número de receptores) o bien a un aumento de la capacidad del organismo para metabolizarla y eliminarla. Los efectos de la tolerancia se pueden condicionar al lugar donde se administra la sustancia, y se presentan de manera completa solo cuando la droga se administra en este contexto (Redolar, 2008). Además se produce en determinado momento una señal de intoxicación, que se convierte en un “feedback” negativo para seguir consumiendo, lo cual se convierte en un poderoso mecanismo que protege a muchos individuos del consumo abusivo (Ahmed y Koob, 2005 En Pereira, 2008).

La pregunta clave en el estudio de la adicción es porque algunos individuos hacen la transición de uso casual de la droga al uso compulsivo (adicción), mientras otros no lo hacen y por qué la recaída es tan común independientemente del tiempo transcurrido desde pasado el consumo de drogas (Chao y Nestler, 2004). Han surgido diversas teorías del porque se desarrolla la adicción, las cuales se describirán a continuación.

La teoría hedónica caracteriza la transición a la adicción en términos de estados afectivos, positivos y negativos, experiencias del individuo. El principio básico de esta teoría se basa en la visión tradicional de la adicción, donde la ingesta inicial de alguna droga resulta en un estado afectivo positivo (euforia o placer) pero tras el cese de la droga, se produce una reacción de retirada y anhedonia o disforia y la necesidad de aliviar estos efectos negativos podría ser la base del elemento compulsivo de la adicción (Chao y Nestler, 2004).

Teoría de los procesos oponentes, habla de los procesos de duelo de euforia y disforia medidos en una escala hedónica, donde se eleva el punto de ajuste hedónico, por lo cual la misma cantidad de droga tiene efectos hedónicos más débiles y más secuelas negativas cuando de retira la droga. La transición desde el estado hedónico positivo inicial a un estado hedónico negativo que va en aumento, señala al individuo a un espiral de desregulación homeostática de las vías de la recompensa en el cerebro, lo que resulta en el desarrollo de la adicción y la vulnerabilidad a la recaída (Chao y Nestler, 2004).

La teoría de la sensibilización al incentivo establece una distinción entre el “gusto” por la droga y el “querer” la droga. Esta teoría propone que el exceso de querer la droga y el incentivo excesivo unido a estímulos asociados con la droga impulsa la búsqueda compulsiva, el consumo y la recaída. (Chao y Nestler, 2004).

La teoría basada en el aprendizaje propone una fuerte exposición repetida de la droga está asociada con recuerdos particularmente fuertes, mediada por los cambios inducidos por la droga en regiones de recompensa del cerebro. En respuesta, el consumo de drogas es una respuesta aprendida a estímulos condicionados, tales como señales asociadas con las drogas (Chao y Nestler, 2004).

Lo más probable es que todas las teorías propuestas tengan razón, como veremos más adelante, el sistema neuronal encargado de la adicción está relacionado con partes del sistema nervioso que no solo están involucradas con el placer, sino también, con el aprendizaje, la memoria, el displacer y la toma de decisiones.

Tabaco, nicotina y farmacocinética

La planta del tabaco (*Nicotiana tabacum*), pertenece a la familia solanaceae, es originaria de las zonas costeras del continente americano. El primer contacto que se estableció entre los europeos y el tabaco fue a partir del descubrimiento de América por los españoles, ya que los antiguos pobladores de América celebraban ritos y ceremonias aspirando el humo que desprendían las hojas secas de tabaco dispuestas sobre una gran hoguera (López, 2000). Además se han encontrado evidencias arqueológicas de aproximadamente 8000 años como pipas rusticas utilizadas para quemar sus hojas, también las mascaban o las bebían, en infusiones o en jugo (Pascual y Vecéns, 2004 en Moreno-Coutiño y Coutiño, 2012). Sin embargo fue hacia finales del siglo XIX que comenzó la industrialización del uso de tabaco en paquetes de cigarrillos y ya en el siglo XX su consumo se expandió a todo el mundo (López, 2000).



Figura 1. Planta del tabaco (*Nicotiana tabacum*) sintetiza nicotina, la cual es responsable de la adicción.

El tabaco produce un alcaloide llamado nicotina que se sintetiza en las áreas meristemáticas de la raíz (Azcón-Bieto y Talón, 2008), esta sustancia es el mayor componente en el humo de tabaco (Koob y Le Moal, 2006) y es absolutamente requerida para el proceso de adicción, como se ha visto con fumadores de cigarros sin nicotina que encuentran un refuerzo menor que con cigarros que contienen nicotina (Barret, 2010; Robinson et al., 2000; Rose, 2006; Rose et al., 2010, en Collins et al., 2012), sin embargo, también es evidente que la nicotina no es el único factor que interviene en el proceso de adicción (Collins et al., 2012).

En humanos la nicotina produce efectos de reforzamiento, incluyendo una leve euforia, incremento de la energía, incremento en la excitación, reduce el estrés, reduce la ansiedad. Además fumadores de cigarros reportan que fumar produce excitación, particularmente con el primer cigarro del día y relajación cuando se está bajo estrés (Koob y Le Moal, 2006). Razón por la cual la nicotina produce un efecto similar al ansiolítico y una disminución en la tensión probablemente relacionado con el decremento del tono

muscular esquelético y la subsecuente reducción en la tensión muscular, lo cual lleva posiblemente a un efecto analgésico (Koob y Le Moal, 2006).

Respecto a la ingesta de alimentos la nicotina tiene efectos sobre esta, ya que disminuye el apetito, particularmente el deseo por la comida dulce y carbohidratos, tanto en humanos como en ratas, esta supresión del apetito es acompañada de una disminución de insulina en sangre, y cambios en la función serotoninérgica, también se ha reportado que aumenta el metabolismo (oxidación de la grasa; Koob y Le Moal, 2006).

A nivel cognitivo, se sabe que la nicotina aumenta la ejecución en tareas de memoria, pues el consumo de tabaco provoca un incremento del estado de alerta y mejora el rendimiento de tareas cognitivas, tanto en personas sanas, como en fumadores y pacientes con Alzheimer (Picciotto, 1998 en Moreno-Coutiño y Coutiño, 2012), provee atención y cognición en animales, así mismo afecta el aprendizaje, el tiempo de reacción y la resolución de problemas en fumadores con abstinencia (Moreno-Coutiño y Coutiño, 2012.)

Consumo de tabaco

En la actualidad existen diferentes formas de consumir tabaco, como en forma de rapé, en infusiones, o mascarlos, pero la principal forma de consumo es el inhalar el humo principalmente en cigarros. El acto de fumar, muestra la estrecha asociación entre los aspectos sensoriales de fumar (que actuaría como estímulo condicionado) y los efectos farmacológicos de la nicotina (que se podría considerar como el estímulo incondicionado; Rose y Levin, 1991 en Redolat, et al., 1994). Por lo que se considera que la nicotina actúa como un refuerzo positivo, tanto en animales como en humanos (Redolat, et al., 1994).

La capacidad relativa de estos productos para provocar dependencia o inducir abstinencia está en función de la rapidez de la vía de administración (fumada, oral o transdérmica) y del contenido en nicotina del producto consumido (DSM-V, 2014). La nicotina administrada de forma inhalada actúa como un fármaco psicoactivo muy potente con acciones tanto a nivel central como periférico (efectos cardiovasculares, endocrinos,

gastrointestinales, musculares etc.). Tales efectos dependen de una gran diversidad de factores como la dosis de nicotina, la topografía de la conducta de fumar, la exposición previa y la tolerancia a la nicotina. Esta forma de administración es el método más rápido y eficiente para administrar nicotina, solo 7 segundos bastan para que la nicotina llegue al cerebro después de la inhalación del humo, permaneciendo allí de 15 a 20 mn, sin embargo las acciones secundarias de la nicotina persisten durante más tiempo (Redolat, et al., 1994). Los cigarrillos contienen aproximadamente 10-20 mg de nicotina (Koob, Le Moal, 2006), siendo el consumo diario de nicotina en humanos en promedio 1mg/kg/día (Benowitz y Jacob, 1984 en Dadmarz y Vogel, 2003) y la dosis oral fatal para un adulto es de 60 mg (Koob y Le Moal, 2006) y a dosis altas induce aversión, malestar e incluso vómitos y si el animal no puede regular su autoadministración, ésta le produce aversión en lugar de preferencia (Caille et al., 2012, en Pastor et al., 2013).

La vía de absorción de la nicotina inhalada es a través de los pulmones, donde un 79 a un 90% de la nicotina pasa de la circulación pulmonar a la circulación arterial, por lo que accede al cerebro muy rápidamente, actuando como un agonista de la acetilcolina, siendo uno de los pocos agonistas colinérgicos que puede atravesar la barrera hematoencefálica (Redolat, et al., 1994; Benowitz, 2010 en Pastor 2013). Posteriormente se distribuye vía sanguínea por otros tejidos, como pulmón o hígado y ya que el 90% de la nicotina presente en circulación sistémica está libre en el plasma, esto facilita el transporte hacia el interior de las células y su unión a receptores específicos. La metabolización ocurre mayoritariamente en el hígado, formándose metabolitos sin capacidad adictiva, así como de la nicotina no metabolizada (entre un 5 y un 10%) ocurre principalmente a través del riñón, otras vías de eliminación son la saliva, el sudor, la leche materna y a través de la placenta (Zaragoza y Llanos, 1980, Solano y Jiménez., 2002 citados en Martín et al., 2004).

Se ha postulado que cuanto más rápida es la velocidad de absorción y entrada en el cerebro de una droga, mayor es el efecto y el refuerzo positivo que genera, en el caso de fumar, la rapidez en el aumento de los niveles plasmáticos de la nicotina produce una leve sensación aversiva, lo cual lleva al fumador a ajustar la dosis para obtener el efecto farmacológico deseado, reforzando de este modo la autoadministración y facilitando el

desarrollo de la adicción (Benowitz, et al., 2009 en Pastor, 2013). Sin embargo el humo de cigarro no solo contiene nicotina, también componentes tóxicos capaces de provocar daños por inflamación e irritación, sofocación, carcinogénesis y otros mecanismos (Samet, 2002) por lo cual se convierte en un grave problema de salud mundial ya que cada año mueren en el mundo 6 millones de personas relacionadas con el tabaco (OMS, 2015).

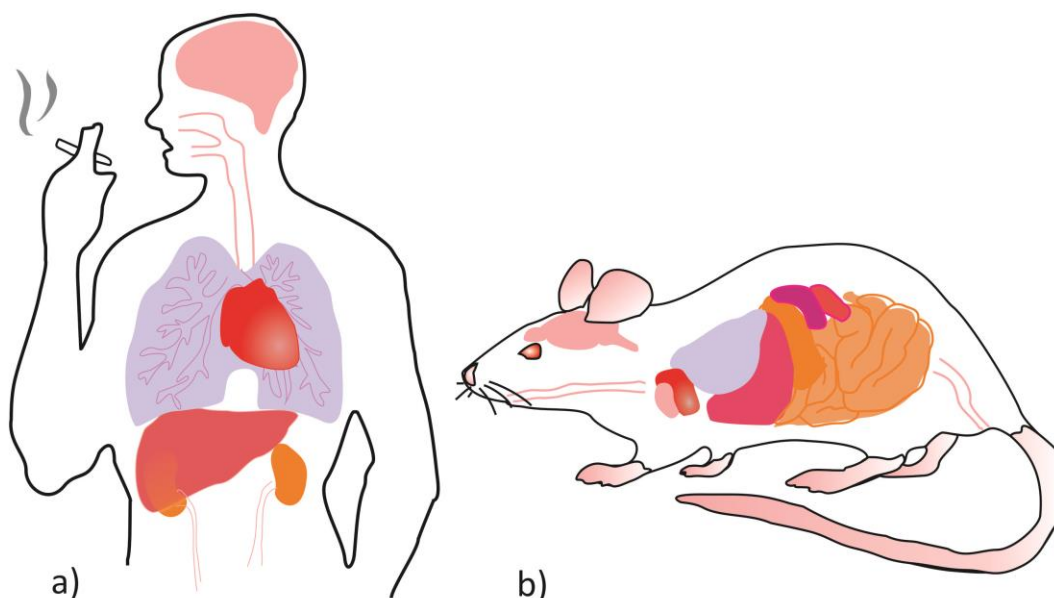


Figura 2. a) Se muestra la ruta que toma la nicotina al ser ingerida por inhalación. El humo de tabaco llega a pulmones, después a circulación pulmonar, circulación arterial y finalmente al cerebro. b) Se muestra la ruta por la cual la nicotina via oral llega el cerebro, se absorbe en boca, estómago e intestinos llegando al sistema circulatorio y finalmente el cerebro.

Tabla 1. Muestra las sustancias contenidas en el humo de cigarro (modificado de Samet, 2002).

CONCENTRACIONES DE ALGUNOS AGENTES ACTIVOS EN EL HUMO DE LA CORRIENTE PRINCIPAL DEL CIGARRILLO SIN FILTRO	
Constituyente del humo	concentración/cigarrillo
Material particulado total	15-40 mg
Monóxido de carbono	10-23 mg
Nicotina	1.0-23 mg
Acetaldehído	0.5-1.2 mg
Cianuro de hidrógeno	110-300 mg
Benceno	20-50 mg
N´nitrosornicotina	200-300 ng
N´nitrosopirrolidina	0-110 ng
Cloruro de vinilo	1.3-16 ng
Benzo(a)pirina	20-40 ng
4 aminobifenil	2.4-4.6 mg

En cambio la administración de nicotina mediante la ingesta de agua potable, se absorbe en la boca, el estómago y los intestinos, pero no toda se metaboliza en el hígado durante el primer paso (Nesil, 2011; Matta et al., 2007 en Collins et al., 2012). Rowell y colaboradores (1983), sugiere que menos del 10% del total de la dosis de nicotina es absorbida intacta del agua bebida por ratones. Por lo tanto, en comparación con la vía intravenosa, la autoadministración en roedores o la inhalación en humanos, la tasa de nicotina consumida vía oral que entra en el cerebro es más lenta y las cantidades son mas bajas y más variable (Collins et al., 2012)

La autoadministración de drogas es un método efectivo para medir directamente la recompensa causada por drogas (Stairs y Bardo, 2010), por lo cual es una de las formas más usadas de evaluar la ingesta de sustancias, por ejemplo Dadmarz y Vogel (2003) analizaron el consumo de nicotina en tres concentraciones (0.003%, 0.012%, 0.006%) sus resultados sugieren que el consumo de nicotina a 0.006% es ligeramente mayor (2.67 ± 1.79 mg/kg/día) lo que indica una posible preferencia para esta concentración (Dadmarz y Vogel, 2003), con un consumo promedio de 1-2 mg/kg/día, sin embargo las respuestas individuales a la interacción entre nicotina y animal parece estar altamente individualizado y parece estar determinada por ciertas características del animal (Dadmarz y Vogel, 2003), esto apoya la observación de que en humanos muchos individuos jóvenes experimentan con drogas, pero no todos se convierten en adictos (Adams et al., 1999 en Stairs y Bardo, 2010).

Existen investigaciones sobre el consumo de nicotina y el estadio de edad de algunos organismos, Klein y colaboradores (2004) así como Nesil y colaboradores (2011) han demostrado que tanto ratas hembras como machos y ratones adolescentes (de 40-42 días de edad) consumen más nicotina que organismos adultos (de 60 días de edad) al igual que autoadministrada de forma intravenosa (Levin et al., 2003), en el caso del test de preferencia de lugar Kota y colaboradores (2007) reportan que los efectos reforzantes de la nicotina es mayor en ratones adolescentes que en machos adultos (Collins et al., 2012). También se ha evidenciado que ratas adolescentes son mas resistentes a los efectos

aversivos de la nicotina que las ratas adultas (Shram et al., 2006, Wilmouth y Spear, 2004 en Pastor, 2013).

En el caso de humanos se ha visto que adolescentes que usan tabaco, presentan a nivel individual variaciones a la susceptibilidad a la dependencia ya que algunas personas se convierten en adictos después de un corto periodo de tiempo de la primera exposición a productos del tabaco y otros no (DiFranza et al., 2000 en Collins et al., 2012). Sin embargo los primeros síntomas de dependencia usualmente predice el uso continuado y pérdida de control, las chicas reportan el desarrollo de síntomas más rápido que los chicos (Collins et al., 2012). Esto es importante porque es durante la adolescencia cuando ocurre el primer encuentro con la nicotina y esta interacción en los procesos biológicos resulta en efectos duraderos en la estructura cerebro, la función y la vulnerabilidad a la adicción (Collins et al., 2012), además de que fumar en esta etapa del desarrollo ha sido asociado con una mayor tendencia a desarrollar dependencia a otras drogas de abuso (Taioli y Wynder, 1991; Breslau y Peterson, 1996; Chen y Millar, 1998, en Pastor, 2013). Se ha visto que el riesgo de fumar es tres veces mayor entre los familiares de primer grado de los fumadores, además los estudios de gemelos y adopciones indican que hay factores genéticos que contribuyen en el inicio y la continuación de fumar (DSM-V, 2014).

A nivel conductual se han evidenciado factores sociales asociados a la adicción, principalmente los ambientes adversos en la infancia ya que la experimentación de estrés en esta etapa se corresponde con un menor grosor del cortex prefrontal medial en la edad adulta (Van Harmelen et al., 2010). En animales de experimentación y en estudios post mórtem del cerebro de personas adictas se ha detectado una disminución del número de receptores celulares que responden a la droga en las neuronas de la vía mesolímbica y se detectó un aumento de factores de transcripción, entre ellos Δ FosB, que se sabe intervienen en la remodelación sináptica (Pérez-Rubio et al., 2011). Por el contrario factores que parecen proteger de la adicción a adultos y adolescentes genéticamente vulnerables o no, como es el control parental, actividades después de la escuela, actividades sociales y estímulos enriquecedores (Hopfer et al., 2003 en Stairs y Bardo, 2010).

Sistema de recompensa

Las drogas de abuso actúan usurpando circuitos neurales en el cerebro que normalmente controlan respuesta a recompensas naturales como la comida, el sexo y las interacciones sociales. El mediador más importante de las drogas de recompensa es el sistema mesolímbico dopaminérgico, compuesto en resumen por neuronas dopaminérgicas con cuerpos celulares en el área tegmental ventral del mesencéfalo, que tiene proyecciones hacia al prosencefalo límbico en particular al núcleo acumbens, siendo este circuito ATV-NAc el responsable del estímulo de recompensa (Chao y Nestler, 2004).

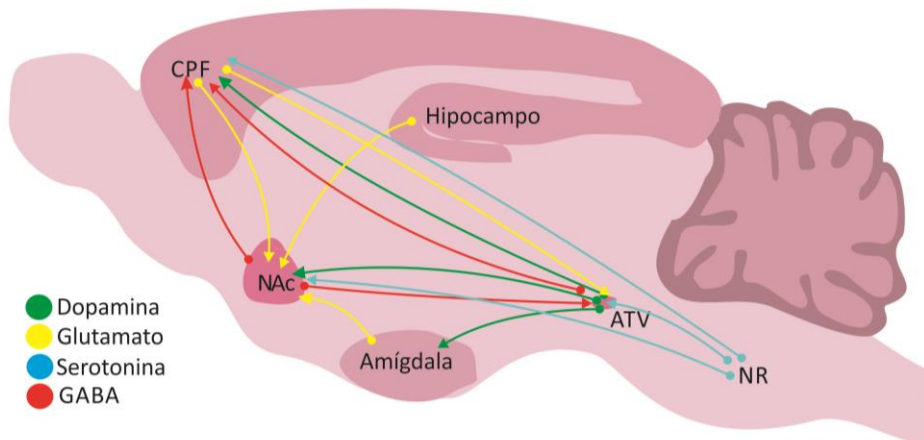


Figura 3. Representación del sistema de recompensa de rata, se pueden ver las áreas más importantes involucradas en este circuito, corteza prefrontal (CPF), núcleo accumbens (NAc), área tegmental ventral (ATV), núcleos del rafe (NR), amígdala e hipocampo. Además del tipo de conexiones entre ellas, proyecciones dopaminérgicas desde el ATV hasta el NAc, la amígdala y la CPF; proyecciones glutamatérgicas desde la CPF al NAc y al ATV; proyecciones de neuronas gabaérgicas del NAc a la CPF y proyecciones serotoninérgicas de los NR hasta el ATV y el NAc.

El sistema de recompensa comienza en el área tegmental ventral (ATV) la cual está implicada en la puesta en marcha de la sensibilización, recibe proyecciones serotoninérgicas de los núcleos del rafe y manda conexiones dopaminérgicas hacia la amígdala, la corteza prefrontal y el núcleo accumbens (Redolar, 2008; Camí et al., 2005).

El núcleo acumbens (NAc) se ha involucrado clásicamente en la integración entre motivación y acción motora (interfase límbica-motora; Mongerson et al., 1980 en Fernández-Espejo, 2000). Se sabe que participa en procesos diversos como la ingesta, la conducta sexual, la recompensa, la autoadministración de drogas, la respuesta al estrés etc. (Groenewegen, et al., 1996; Maldonado-Irizarry, et al., 1995; Stratford y Kelley, 1997, Damsma et al., 1992; Pfaus, et al., 1990; Robbins y Koob, 1980; Abercrombie et al., 1989; Schultz, et al., 1992; en Fernández-Espejo, 2000). Es evidente que su principal papel neurobiológico es transferir información motivacional relevante para que se codifiquen actos motores, o en otras palabras, reconocer situaciones de importancia adaptativa para que el animal desarrolle una conducta motora apropiada (Spanagel y Weiss, 1999 en Fernández-Espejo, 2000). El NAc recibe una importante entrada neuromodulatoria, tanto dopaminérgica como serotoninérgica, que parece desempeñar un papel relevante en el control del flujo de información (Johansson, Hökfelt, 1981; Deutch y Cameron, 1992; en Fernández-Espejo, 2000), recibe directamente fibras excitadoras glutamatérgicas de corteza prefrontal, amígdala e hipocampo, además manda axones hacia el ATV de naturaleza GABAérgica, que silencia las neuronas del ATV e impide que la dopamina se libere (Linden, 2011).

Este NAc está dividido en dos zonas diferentes tanto neuroquímicamente como por sus conexiones: el core conocido también como centro y la shell o corteza (Herkenham et al., 1984; Zaborsky et al., 1985; Heimer, 1991; Jongen-Rêlo et al., 1994; en Fernández-Espejo, 2000). La shell presenta conexiones de carácter límbico, recibe importantes entradas glutamatérgicas desde el hipocampo y la amígdala centromedial, así como dopaminérgicas desde el tegmento ventral, serotoninérgicas del rafe mediano (Fernández-Espejo, 2000). Además manda eferencias gabaérgicas hacia el ATV (formando un bucle de control recíproco), hacia el talamo dorsomedial y la corteza dorsal prefrontal a través del núcleo pálido ventral (Pérez de Cobos, 2006). Mientras que el core es una extensión del estriado dorsal, de acusado carácter motor, que recibe aferencias glutamatérgicas de la corteza motora, dopaminérgicas de la sustancia negra y serotoninérgicas del rafe dorsal y

presenta conexiones gabaérgicas de salida hacia el pálido ventral (Fernández-Espejo, 2000).

Se cree que el proceso de integración limbicomotora tiene lugar principalmente en la Shell, la cual modificaría los patrones de actividad motora del core, a través de la corteza prefrontal que actúa como enlace entre los dos territorios (Fernández-Espejo, 2000).

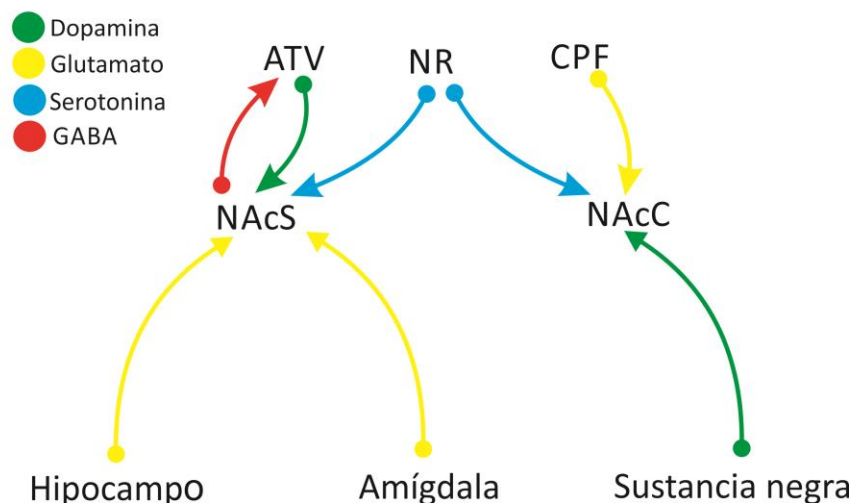


Figura 4. Se muestran las conexiones que proyecta y recibe el núcleo acumbens shell (NAcS) y el núcleo acumbens core (NAcC). NR. Núcleos del rafe; CPF, corteza prefrontal; ATV, área tegmental ventral.

Algunos estudios han evidenciado que prácticamente todas las neuronas principales de la shell (las espinosas de mediano tamaño), poseen campos dendríticos con entradas hipocámpicas, amigdalinas y prefrontocorticales, sin embargo estas aferencias no están solapadas. Las aferencias corticofrontales se distribuyen en los extremos dendríticos, mientras que las entradas hipocámpicas y amigdalinas se sitúan en los tallos proximales dendríticos. Esta distribución indica que las entradas de origen amigdalino hipocámpico pueden cortocircuitar las entradas corticofrontales, pero no al revés, es importante notar que la estimulación de la corteza prefrontal sin la hipocámpica o amigdalina no induce la transición del estado bajo al alto. Por lo tanto, parece ser que la actividad hipocámpica y amigdalina da paso a las entradas corticofrontales, en concordancia con la disposición

anatómica sináptica ya comentada. Es importante resaltar la necesidad de simultaneidad entre las distintas aferencias, lo que ha llevado a diversos autores a postular que la shell del núcleo accumbens actúa como un detector de coincidencia (O'Donnell y Grace 1998; Plenz, Aertsen, 1994 en Fernández-Espejo, 2000). Una vez que en la shell del NAc se ha relacionado con una determinada situación apetitiva o aversiva de valor adaptativo, se reforzaría la respuesta motora asociada a dicha situación adaptativa, probablemente por medio de la consolidación de los grupos neurales activos en el core y la CPF, los actos motores que se programan son instrumentales dirigidos a un fin (Salamone, 1992 en Fernández-Espejo, 2000). En resumen la shell del núcleo accumbens capta situaciones de importancia adaptativa de forma emocional mientras que el core se encarga de mediar movimientos en respuesta o búsqueda de la situación.

Un área importante del sistema de recompensa es la corteza prefrontal (CPF), la cual es parte del lóbulo frontal, y se relaciona con las funciones cognitivas y emocionales más complejas (Soriano et al., 2007). La CPF envía proyecciones glutamatérgicas hacia el NAc y al ATV, mientras que recibe proyecciones GABAérgicas del NAc (Camí et al., 2005). Además desde la corteza dorsal prefrontal se mandan eferencias glutamatergicas al centro del NAcC y a la sustancia negra, desde esta última, se envían eferencias dopaminérgicas de salida del sistema hacia los sistemas motores piramidal y extrapiramidal (Pérez de Cobos, 2006). La CPF recibe aferencias serotoninérgicas de los núcleos de rafe, dopaminérgicas y gabaérgicas del ATV (Carr y Sesack, 2000a en Vázquez, 2008), inerva neuronas dopaminérgicas que vuelven a la CPF y neuronas GABAérgicas que proyectan al núcleo accumbens (Carr y Sessack, 2000b en Vázquez, 2008).

La principal función de las neuronas de la corteza prefrontal es la de excitar o inhibir otras áreas del encéfalo. La corteza prefrontal es una estructura extensamente conectada con todas las cortezas de asociación y límbicas. Asimismo, estas conexiones son recíprocas, por lo que la corteza prefrontal también recibe gran cantidad de aferencias que codifican distinta información. Este patrón de conexiones bidimensional le permite ejercer una función de control y de supervisión de gran parte de la actividad cognitiva, conductual y emocional (Soriano et al., 2007). Por lo tanto la corteza prefrontal es clave en los procesos

atencionales, de evaluación cognitiva y de programación premotora, y constituye un área de alto grado integrativo.

Sin embargo también existen otras áreas del cerebro que intervienen en el sistema de recompensa particularmente es importante la amígdala para condicionar los aspectos de la exposición a drogas, por ejemplo establece asociaciones entre señales ambientales, reforzamiento y exposición a drogas y los síntomas aversivos durante la abstinencia. El hipocampo es crucial para los recuerdos del contexto de la exposición a la droga y la retirada y el hipotálamo es importante en la mediación de muchos efectos de drogas en el cuerpo (Chao y Nestler, 2004).

En resumen la corteza prefrontal junto con el núcleo acumbens shell permite fijar la atención sobre una determinada situación y valorar su importancia adaptativa, y si esta acción es acompañada de una sensación placentera, dada por la liberación de dopamina del ATV, entonces se buscará la repetición de la acción relevante por una respuesta motora por parte del núcleo acumbens core, y se guardara en la memoria gracias a la acción del hipocampo.

Síntesis de dopamina

La dopamina (DA) es un neurotransmisor del tipo catecolaminérgico sintetizado en el citoplasma de terminales nerviosos de las neuronas dopaminérgicas, a través de un aminoácido precursor que es la tirosina. La tirosina es transportada al cerebro y concentrada en neuronas catecolaminérgicas, donde es hidroxilada en la posición 3 del anillo bencílico por la TH, para formar dihidroxifenilalanina (L-Dopa; Elsworth y Roth 1997, en Silva, et al., 2014). Finalmente, en neuronas dopaminérgicas la enzima descarboxilasa de aminoácidos aromáticos, descarboxila la L-Dopa para formar DA (Silva, et al., 2014)

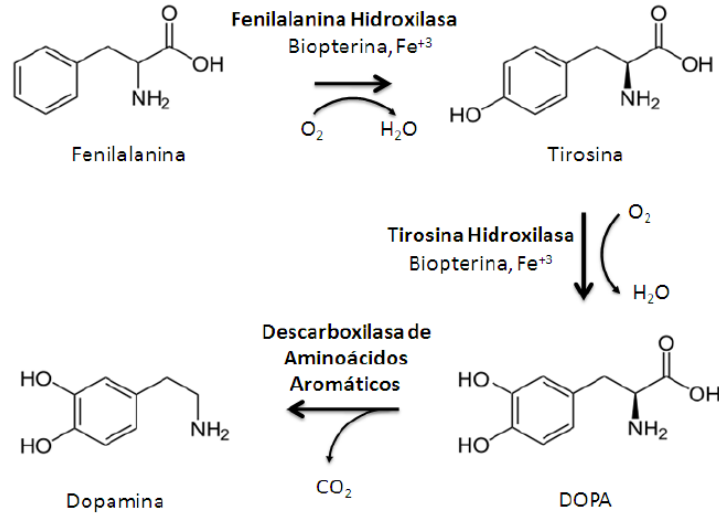


Figura 5. Se muestra la síntesis de dopamina (obtenido de Silva et al., 2014).

La DA se almacena en vesículas especializadas que se fusionan con la membrana de la terminal y liberan su contenido una vez llegado el potencial de acción. La DA liberada y que no es degradada enzimáticamente por la monoamino oxidasa (MAO) o por la catecol o-metiltransferasa (COMT), puede activar receptores específicos para DA o ser reincorporada a la terminal dopaminérgica por el transportador de dopamina (DAT; Elsworth y Roth 1997 en Silva et al., 2014).

Sistema de recompensa y su relación con las drogas de abuso, específicamente nicotina

Como ya se vio, el NAc y la CPF reciben inervaciones dopaminérgicas provenientes del VTA, las cuales se activan y liberan dopamina (DA) en respuesta al estímulo de los recompensantes naturales (Bassareo y Di Chiara 1997, Pfaus et al., 1990 en Silva et al., 2014) pero también por drogas de abuso. En este último caso, a pesar que la mayoría de las drogas adictivas como la cocaína, la anfetamina, los opioides, la nicotina y el etanol tienen distintos mecanismos de acción, todas estas producen efectos placenteros a través del aumento de los niveles extracelulares de DA en NAc (Di Chiara e Imperato 1988 en Silva et al., 2014). La dopamina se libera en estas regiones, donde se difunde por la hendidura sináptica para unirse a los receptores de las células destinadas y activarlos para que realicen su función, una vez liberada, la dopamina no se pierde; la mayor parte de ella

es devuelta a los terminales axonales mediante la acción del DAT, la dopamina así reciclada se almacena otra vez en vesículas para volver a ser liberada (Linden, 2011).

Una vez inhalado el humo del cigarrillo, la nicotina entra en la circulación arterial y se distribuye rápidamente a todos los tejidos, tardando entre 10-20 segundos en llegar al cerebro, allí encontrará su blanco; los receptores nicotínicos de acetilcolina. Los receptores de nicotina asociados a la adicción son los receptores nicotínicos localizados principalmente en sistema nervioso central, ganglios del sistema autónomo y glándulas suprarrenales; se han caracterizado cuatro subtipos (los musculares, los neuronales sensibles a α -bungarotoxina, neuronales resistentes a α -bungarotoxina y los epiteliales) de los cuales los resistentes α -bungarotoxina tienen mayor evidencia en la adicción a nicotina, estos últimos forman un pentámero formando un muro que rodea un canal iónico, están constituidos por tres subunidades α , (de ellas se conocen 5 subunidades: $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$) y dos β (se conocen 3 subunidades: $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$), entre ellas pueden formar múltiples combinaciones para formar el canal, sin embargo es la estructura molecular $\alpha 4$ - $\beta 2$ la más frecuente y de mayor afinidad por la nicotina, se ubica en el hipocampo y ATV de mamíferos, mientras que la subunidad $\alpha 4$ ejerce un poderoso control de la secreción de dopamina (Sharma y Vijayaaraghavan, 2008; Markou, 2008; Thorgeirsson et al., 2008; en Pérez-Rubio et al., 2011). La activación de los receptores induce la apertura de canales iónicos para permitir el paso de calcio y sodio al interior celular originando así liberación de dopamina, glutamato y noradrenalina (Markou, 2008; Saccone, et al., 2007 en Pérez-Rubio et al., 2011).

Tras la exposición inicial a la droga se dan cambios plásticos en el ATV que inducirán adaptaciones a largo plazo en las regiones inervadas por las neuronas dopaminérgicas de esta región del mesencéfalo (redolar, 2008). A nivel cortical, la exposición repetida a estas drogas de abuso, genera cambios neuroplásticos en la CPF que afectan la conducta de los individuos (toma de decisiones y la motivación dirigida al cumplimiento de objetivos) y llevan a favorecer la conducta de consumo compulsivo que es característica de la adicción (Silva et al., 2014), por lo que estos cambios neuroadaptativos y neuroplásticos inducidos por el consumo crónico de drogas producen lo que se llama hipofrontalidad, que

compromete las capacidades emocionales y cognitivas de orden superior y por lo tanto, la capacidad del cortex prefrontal para dirigir la conducta (Corominas et al., 2009)

Δ FosB

Como hemos visto la exposición a drogas provoca cambios a largo plazo en el cerebro, lo cual causa anomalías conductuales, para comprobarlo se han analizado factores de transcripción como las pertenecientes a la familia Fos que son inducidos rápidamente en regiones específicas del cerebro después de la administración de muchas drogas de abuso (Graybiel et al., 1990; Young et al., 1991; Hope et al., 1992, en Nestler, 2008). Uno de estos factores es Δ FosB, inducido en las regiones de recompensa del cerebro por la exposición crónica a prácticamente todas las drogas de abuso, debido a que es una proteína altamente estable. El consumo repetido de drogas hace que se acumule en distintas regiones como el NAc, estriado dorsal, amígdala y CPF, manteniéndose elevada su expresión durante semanas o meses. La acumulación de Δ FosB modula ciertas proteínas que inducen cambios morfológicos en las neuronas, como la formación de nuevas espinas dendríticas y distintas alteraciones de la plasticidad neuronal, responsables de las alteraciones que se observan en los trastornos adictivos (Pereira, 2008).

Ambiente enriquecido

A finales de 1940, Hebb fue el primero en proponer el ambiente enriquecido como un concepto experimental, informó anecdóticamente que las ratas que se llevó a casa como mascotas mostraron mejorías conductuales sobre sus compañeros de camada que fueron mantenidas en el laboratorio (Hebb, 1947 en Van Praag et al., 2000). En general los animales en ambientes enriquecidos son mantenidos en encierros y grupos más grandes con la oportunidad de tener una compleja interacción social y el ambiente varía durante el periodo de los experimentos, en el caso de roedores el ambiente cuenta con túneles, material de anidación, juguetes, entre otros (Van Praag et al., 2000). Todo esto facilita el incremento de la estimulación sensorial, cognitiva y motora con respecto a las condiciones estándar de estabulación, también cuentan con un incremento de la estimulación social

mediante el aumento del número de animales por jaula (Nithianantharajal y Hannan, 2006, en Blázquez, 2011).

Se ha reportado que en roedores, el enriquecimiento ambiental que se inicia antes de la edad adulta, tiene efectos adicionales en el desarrollo del cerebro, comparado con aquellos obtenidos si el enriquecimiento ambiental inicia en la adultez (Nithianantharajah y Hannan, 2006, en Blázquez, 2011). A nivel neuronal se ha visto que el enriquecimiento incrementa el tamaño de cuerpos celulares neuronales y el núcleo, así como incrementa las ramificaciones dendríticas y el número de espinas dendríticas (Diamond, 2001: Rosenzweig y Bennett, 1996 en Stairs y Bardo, 2010), incrementa el número de capilares en el cerebro, así como la actividad metabólica indicada por el incremento en el número de mitocondrias (Kolb y Whishaw, 1998 en Stairs y Bardo, 2010), además se ve incrementado el espesor cortical, especialmente en corteza occipital (Diamond, et al., 1964 en Stairs y Bardo, 2010), incremento en la arborización dendrítica sobre espinas neuronales en núcleo acumbens en ratas (Kolb, 2003 en Stairs y Bardo, 2010). Se han encontrado diferencias en los niveles de dopamina en el NAc y el putamen caudado entre ratas sin objetos y con compañeros y ratas sin objetos y sin compañeros (Heidbreder et al., 2001 en Stairs y Bardo, 2010).

En el caso de la nicotina, las ratas en enriquecimiento y con compañeros son menos sensibles que las ratas sin objetos y con compañeros a los efectos estimulantes de la nicotina (Green et al., 2003 en Stairs y Bardo, 2010). Además las ratas bajo enriquecimiento y con compañeros son menos impulsivas que las ratas sin objetos y sin compañeros. La diferencia inducida por el enriquecimiento en la impulsividad podría resultar de la disminución de dopamina en CPFm en ratas bajo enriquecimiento y con compañeros comparado con ratas sin objetos y sin compañeros (Zhu et al., 2005, en Stairs y Bardo, 2010) esto sugiere que las ratas en enriquecimiento muestran un nivel más bajo de autoadministración de drogas que las ratas sin objetos y sin compañeros, ya que tienen un mayor control inhibitorio (Stair y Bardo, 2010).

Venebra-Muñoz y colaboradores (2011) señala que ratas macho de la cepa Wistar mantenidas en condiciones enriquecidas presentaron un menor consumo de nicotina diaria (0.006%) que los que crecieron en condiciones estándar, lo cual sugiere un papel protector del ambiente enriquecido en el desarrollo de la adicción a la nicotina, así que en términos generales, el enriquecimiento ambiental es un modelo experimental que ha mostrado tener efectos protectores ante el consumo, la susceptibilidad y el efecto reforzante de drogas, así como reducir los efectos conductuales producidos por las drogas de abuso (Páez, 2012; Stairs y Bardo, 2010).

Si bien resulta difícil transpolar de manera directa los resultados de los estudios de enriquecimiento ambiental en humanos, existe información que describe cómo la mejora en la calidad de vida puede llevar a reducir el consumo de drogas (Páez, 2012), como en el caso de la aplicación de programas proactivos, sociales y culturales implementados a jóvenes de 12 a 26 años con adicción a inhalantes, los cuales mostraron una mejora en su calidad de vida, la mitad mostraron una abstinencia completa por 90 días y el 74% se mantuvieron en abstinencia a por 180 días, además el 84% regreso a la escuela y el 81% estuvo libre de problemas legales (Dell y Hopkins, 2011, en Páez, 2012).

Lo cual evidencia el gran papel que juega el ambiente sobre la vulnerabilidad, el desarrollo y mantenimiento de una adicción, el Instituto Nacional de Drogas de Abuso de los Estados Unidos (NIDA) ha sugerido que los factores genéticos y epigenéticos constituyen del 40 al 60% de la vulnerabilidad a la adicción (Volkow, 2008 en Pastor, 2013), por lo tanto el estudio del ambiente donde se desarrolla un individuo puede darnos una idea de como se comportara el sujeto frente al consumo de alguna sustancia.

JUSTIFICACIÓN

La Encuesta Nacional sobre Adicciones del 2011 revelaron que un 23.6% de adultos de 18 a 65 años son fumadores activos, siendo el inicio de consumo de tabaco alrededor de los 14 años, sin embargo solo un porcentaje de estos, el 7.1%, son considerados como sujetos con una posible adicción lo que sugiere que otros factores como el ambiental influyen en el tabaquismo. Por lo que es necesario analizar el factor ambiente en las primeras etapas de vida y su repercusión en el consumo de nicotina, debido a que durante ese periodo los organismos son más susceptibles a adquirir un consumo desmedido de sustancias y modificar sus estructuras cerebrales.

HIPOTESIS

Ya que el ambiente enriquecido actúa como una protección en contra del consumo desmedido de nicotina, el aislamiento después de un enriquecimiento ambiental revocará sus efectos positivos y el consumo de nicotina será similar en el grupo crecido bajo enriquecimiento y el crecido en ambiente estándar.

Debido a que el factor de transcripción Δ FosB se expresa en NAc por exposición a drogas de abuso entonces los individuos con mayor consumo de nicotina, tendrán un mayor número de células inmunoreactivas a Δ FosB.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si el enriquecimiento ambiental durante el crecimiento de los individuos seguido de un aislamiento, modifica el consumo individual oral de nicotina y la expresión del factor de transcripción Δ FosB en el núcleo acumbens.

OBJETIVOS PARTICULARES

Analizar el consumo de nicotina durante parte de la pubertad y la adultez en ratas Wistar macho.

Analizar si la exposición a diferencias ambientales durante el crecimiento altera el consumo de nicotina y la presencia de Δ FosB en el núcleo acumbens.

Analizar la inmunoreactividad del factor de transcripción Δ FosB en el núcleo acumbens shell y núcleo acumbens core de los individuos y si existe una relación entre este y el consumo de nicotina individual.

MÉTODO

Organismos

En total se usaron 18 ratas macho de la cepa Wistar, 16 organismos de 21 días de vida, obtenidas del Laboratorio de Conducta Animal de la Facultad de Ciencias de la UAEMéx, que se mantuvieron en ciclo invertido de luz (12/12), se eligió usar ratas de la cepa Wistar para reducir los factores genéticos y evidenciar los epigenéticos. Los dos organismos restantes fueron usados para identificar el núcleo acumbens con la técnica de Nissl.

Los procedimientos fueron aceptados por los comités de ética de UAEMéx.

Diseño de ambiente enriquecido

Se diseñaron cajas para enriquecimiento ambiental, basada en investigaciones anteriores, de material acrílico con un tamaño de 75x60x60cm, con orificios para ventilación, rampas, plataformas y un comedero, además como parte del enriquecimiento a esta caja se le agregaron diversos elementos como túneles, rampas, pelotas, cuerdas, tubos y cajas de cartón etc. todo esto cuidando que no amenazara la salud de las ratas, este material se cambió cada tercer día.

Condiciones de crecimiento de las ratas (día 21 al 50 posnatal)

Al inicio del experimento las ratas fueron divididas azarosamente en dos grupos con 8 ratas cada uno; el primero denominado grupo estándar (ES) fueron mantenidos en 2 cajas normales de laboratorio (47x33x19cm) con 4 ratas por caja con sustrato. El segundo grupo llamado enriquecido (EN), se mantuvo en una caja especial para enriquecimiento ambiental de dimensiones mayores (75x60x60cm), provista de rampas y objetos a los cuales los animales tenían acceso, además la configuración de espacio se cambió cada tercer día. Las 16 ratas eran pesadas y marcadas cada tercer día y contaban con líquido y alimento *ad libitum*.

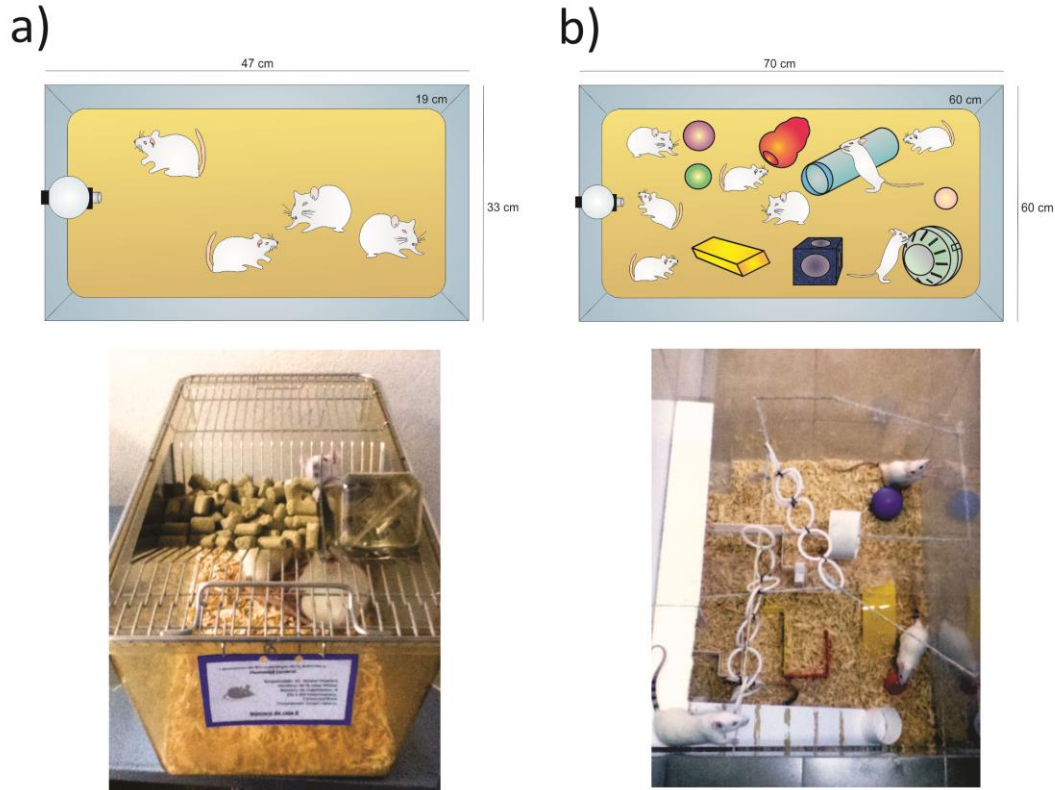


Figura 6. a) Caja del grupo estándar (ES) b) Caja del grupo enriquecido (EN) se pueden observar diversos objetos que cambiaron a lo largo del experimento. Las ratas vivieron en estas condiciones del día 21 al 51 de vida.

Estimación de consumo individual de nicotina y agua (día 51 al 74 posnatal)

En el día 51 posnatal se colocó por separado a cada una de las 16 ratas en cajas normales de laboratorio (47x33x19cm) y se eligieron de manera azarosa 5 ratas de cada grupo para colocarles un bebedero con solución de nicotina (0.006%) por 12 hrs durante el periodo de oscuridad. El consumo diario de nicotina se obtuvo pesando el bebedero al inicio y al final de las 12 hrs de exposición a nicotina. Para estimar la dosis de nicotina diaria consumida se aplicó la siguiente ecuación, por lo cual se pesó todos los días a las ratas.

$$Dosis\ de\ nicotina\ diaria\ (mg/Kg/día) = \frac{(0.06\ mg/ml)\ (ml\ diarios\ ingeridos\ de\ la\ solución\ de\ nicotina)}{peso\ corporal\ en\ kg}$$

Las 3 ratas restantes de cada grupo (3 del grupo estándar y 3 del grupo enriquecido) se les colocó un bebedero con agua potable durante las 12 hrs de oscuridad, y se obtuvo la cantidad de mililitros consumidos diariamente, como la diferencia entre el peso inicial del bebedero y el final, menos 3 ml de pérdida por goteo.

Preparación de nicotina

Diariamente se preparó una solución de nicotina al 0.006% (Sigma-aldrich N5260) bajo normas de bioseguridad, según Venebra-Muñoz, (2010).

Identificación del núcleo acumbens (Nissl)

Para la identificación de regiones se usaron los cerebros de dos ratas, sin tratamiento alguno, las cuales se cortaron coronalmente a 40 micras en criostato, desde 0.7 hasta 2.7 mm de Bregma, estos cortes se montaron en laminillas gelatinizadas y se procedió a ser tratados con la técnica de Nissl. Al finalizar el procedimiento dichas laminillas fueron analizadas bajo el microscopio con el objetivo de seleccionar los niveles de Bregma idóneos para la inmunohistoquímica, los cuales fueron de 1.70 a 1.20 mm de Bregma de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1998) para el núcleo accumbens.

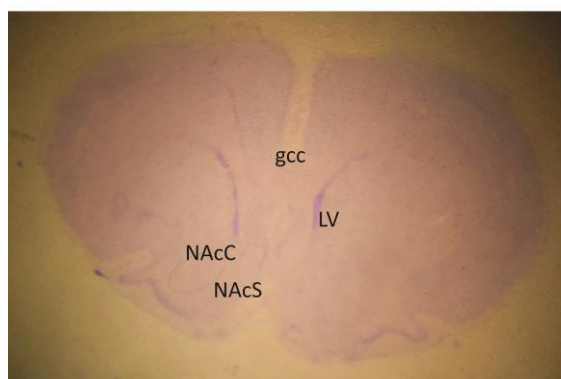


Figura 7. Corte de núcleo acumbens (1.20 mm Bregma) procesado con la técnica de Nissl. Se observa el núcleo acumbens core (NAcC), el núcleo acumbens shell (NAcS), los ventrículos laterales (LV) y el cuerpo calloso (gcc).

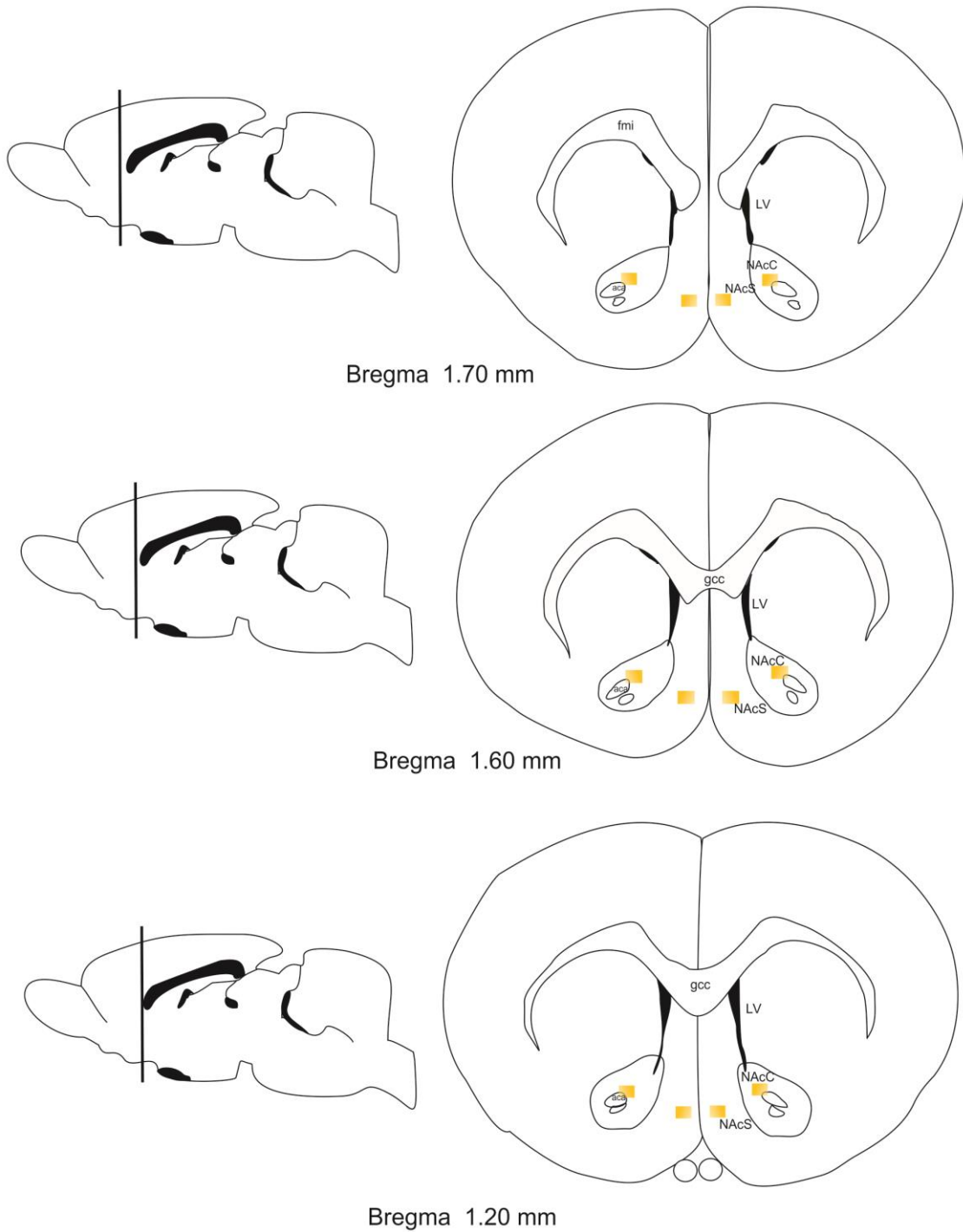


Figura 8. Esquema de niveles seleccionados para el análisis de inmunoreactividad de Δ FosB, de acuerdo al atlas Paxinos y Watson (1998). Los cuadros amarillos muestran las áreas donde se tomaron las fotografías para analizar la inmunoreactividad. Ventriculos laterales (LV), cuerpo calloso (gcc), comisura anterior (aca), fórceps menor del cuerpo calloso (fmi), núcleo acumbens shell (NAcS), núcleo acumbens core (NAcC).

Eutanasia y preparación de tejidos

En el día 75 posnatal los organismos de todos los grupos se anestesiaron con pentobarbital sódico (60 mg/Kg) y se perfundieron transcardialmente usando solución salina (0.9 %) y después paraformaldehído (4%). Inmediatamente se extrajo el cerebro y se crioprotegió con sacarosa al 10% y 30% por 12 hrs respectivamente. Ya crioprotejido el tejido, fue cortado a 40 micras en un criostato.

Se seleccionaron los cortes pertenecientes a los niveles de Bregma 1.20 a 1.70 mm para ser analizados con la técnica inmunohistoquímica a Δ FosB según Venebra-Muñoz (2010).

Técnica inmunohistoquímica a Δ FosB

Los cortes se lavaron 4 veces en PB al 0.1 M por 5 min por lavado en agitación moderada, después se colocaron por 5 min en peróxido de hidrógeno al 0.05%, e inmediatamente se lavaron 4 veces en PB 0.1 M en agitación moderada. Inmediatamente, los cortes se colocaron en una solución con suero de cabra al 3% (MP Biomedicals 1.800.854.0530), Tritón X100 (sigma-aldrich t9284) al 0.03% por una hora. Después los cortes se incubaron con el anticuerpo primario FosB 1:500 (sc-48 Santa Cruz Biotechnology) en una solución de suero de cabra al 3% y Tritón X100 0.03% en PB 0.1 M (PBT) por dos días. Al terminar el periodo de incubación se lavaron 4 veces en PB 0.1 M en agitación moderada y se procedió a colocar el anticuerpo secundario biotinilado policlonal anticonejo (molecularprobes B2770) diluido 1:250 en PBT por 1 hrs en agitación moderada, posteriormente a la incubación en el anticuerpo secundario se realizaron 4 lavados con PB 0.1 M en agitación constante e inmediatamente se realizaron las reacciones Biotina-avidina siguiendo las instrucciones del fabricante del Kit ABC (Vectastain Elite PK-4000, Vector Laboratories, CA, USA) por 1 hrs. Se lavaron 4 veces en PB 0.1 M por 5 min cada lavado.

La inmunoreactividad se reveló con 3,3-diaminobenzidina (sigma-aldrich d8001) al 0.06% y 0.1 ml de H₂O₂ 3% diluidos en PB. La inmunoreactividad se resalto al añadir una solución de Ni y Co al 1%. Después los cortes se lavaron 2 veces con PB 0.1 M por 5 mn. Finalmente

se montaron en portaobjetos gelatinizados, se deshidrataron y aclararon en un tren gradual de alcohol y xilol. Se cubrieron con resina sintética y cubreobjetos.

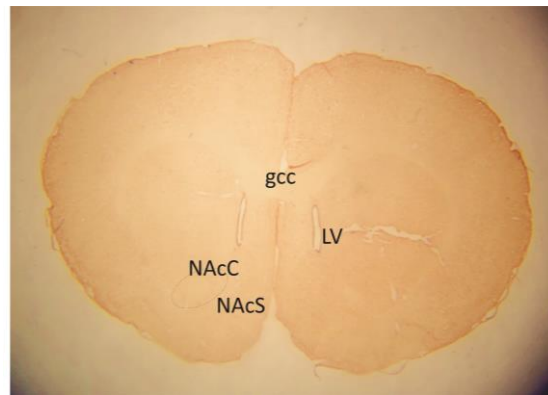


Figura 9. Corte de núcleo acumbens (1.60 mm Bregma) procesado con la técnica inmunohistoquímica a Δ FosB (4x), se observa el núcleo acumbens core (NAcC), el núcleo acumbens shell (NAcS), ventrículos laterales (LV) y el cuerpo calloso (gcc).

Conteo celular

Se tomaron fotografías a 40X del núcleo acumbens core y núcleo acumbens shell en las regiones que muestran los cuadros amarillos en la figura 8. El conteo celular se llevó a cabo con el programa ImageJ.

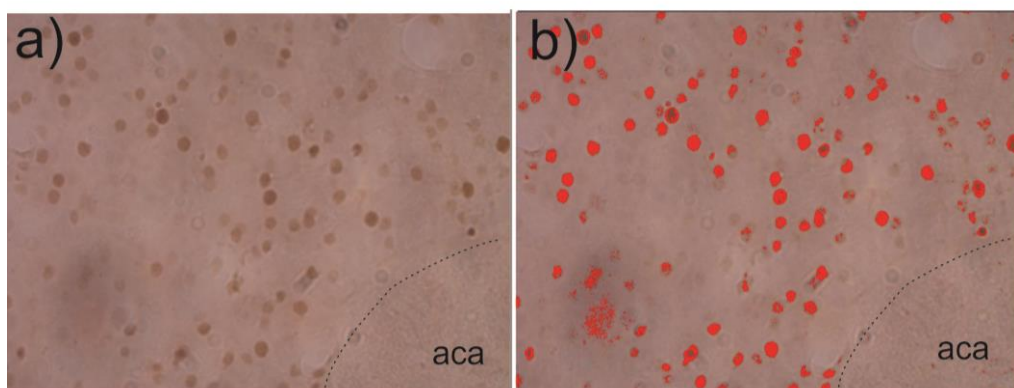


Figura 10. Fotografía a 40X del núcleo acumbens core, en el panel a) se observan células inmunoreactivas a Δ FosB en color café, en el panel b) se observan células inmunoreactivas marcadas en rojo por el programa imageJ. La comisura anterior (aca) se tomó como referencia anatómica.

Análisis estadístico

Las dosis de consumo individual obtenidos diariamente se dividieron en cuatro periodos (6 días cada uno) para analizar el consumo de nicotina con respecto a la edad de las ratas, ya sea pubertad o adultez, esto analizado por una ANOVA y un análisis post-hoc.

El comienzo de la pubertad es aceptado a los 40 días de edad en ratas, antes de esto son considerados periadolescentes (28-40 días de edad), después del día 60 las ratas son designadas como adultos (Izenwasser, 2005; Spear y Brake, 1983 citados en Nesil et al., 2011), por lo tanto las ratas crecieron bajo condiciones enriquecidas y estándar después del destete hasta aproximadamente la mitad de adolescencia, y consumieron nicotina desde aproximadamente la mitad de la adolescencia hasta la adultez.

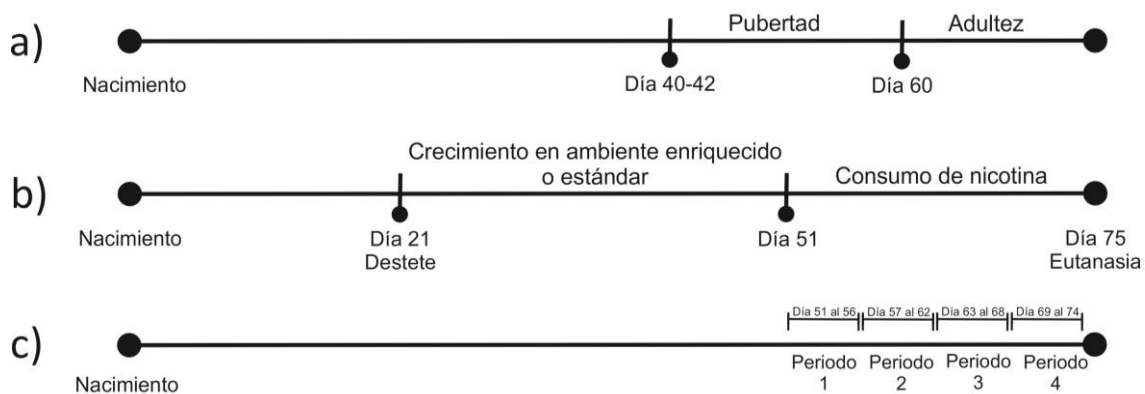


Figura 11. a) Muestra el estadio de las ratas según la edad en días, b) Diagrama general del experimento, c) los datos obtenidos del consumo de nicotina se dividieron en 4 periodos para su análisis.

Se graficó el consumo individual diario (mg/Kg/día) y se obtuvo el valor de correlación (r), además se procesaron con una ANOVA para determinar diferencias por individuo y una prueba post-hoc que subgrupo a los organismos (grupos A, B y C) según su nivel de consumo. También se aplicó una t de student para ver si había diferencias significativas sobre el consumo de nicotina por grupo (ES y EN). Así mismo se analizó el consumo de líquidos tanto de agua como de nicotina (ml/gr/día) a nivel individual y a nivel grupal con una ANOVA y una prueba post-hoc, lo que dio como resultado subgrupos (A, B y C).

Respecto al análisis inmunohistoquímico se analizó el número de células inmunoreactivas a Δ FosB usando una ANOVA y una prueba post-hoc para ver diferencias entre los animales y entre los grupos tanto del núcleo acumbens core como de la shell, encontrando dos subgrupos (A y B). Finalmente se graficó el consumo promedio diario de nicotina por animal y el número de células correspondientes a ese organismo, tanto del núcleo acumbens core como de la shell.

Todo análisis estadístico se realizó con el programa Statgraphics Centurion XV.

RESULTADOS

Consumo

Los resultados de la prueba de ANOVA para el consumo de nicotina (mg/Kg/día) muestra diferencias significativas durante el avance del experimento ($F_{.05(1)(7,232)}=9.48$ $p<0.05$). La prueba post hoc demostró que la ingesta de nicotina en el primer y segundo periodo es significativamente mayor que el tercer y cuarto periodo tanto en los animales crecidos en un ambiente enriquecido como los que crecieron en un ambiente estándar.

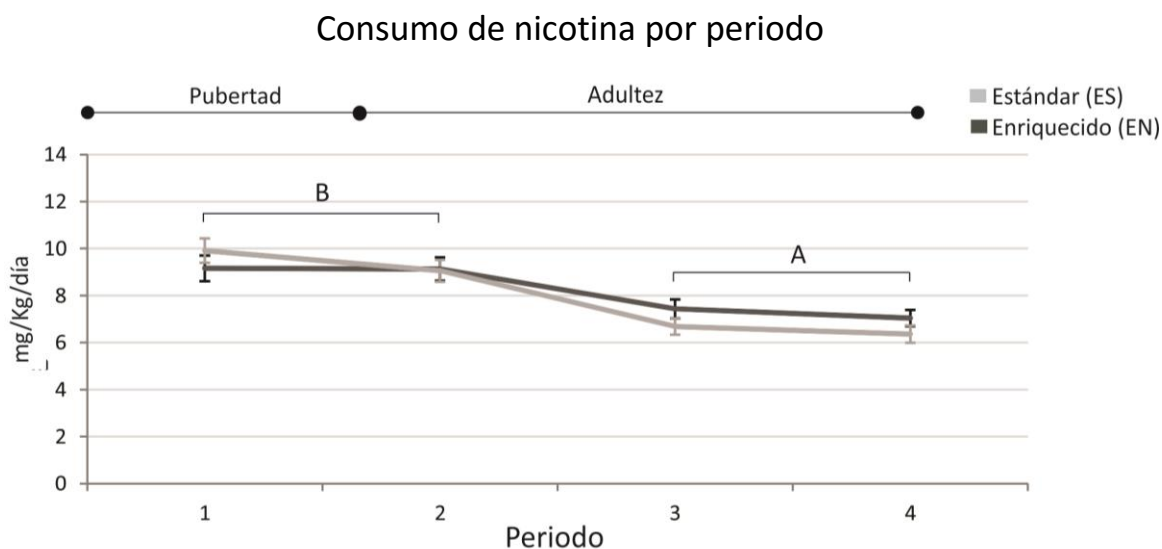


Figura 12. Medias \pm error estándar de la progresión del consumo de nicotina (mg/Kg/día) durante el experimento, en los cuatro periodos evaluados.

La prueba de ANOVA sobre el consumo de nicotina a nivel individual mostro diferencias significativas entre los individuos ($F_{.05(1)(9,230)}=23.38$ $p<0.05$). La prueba post hoc demostró que los individuos 3 (ES) y 6 (EN) presentaron el menor consumo de nicotina del grupo experimental mientras que los individuos 2 (ES) y 8 (EN) presentaron el mayor consumo de nicotina.

Consumo de nicotina por individuo

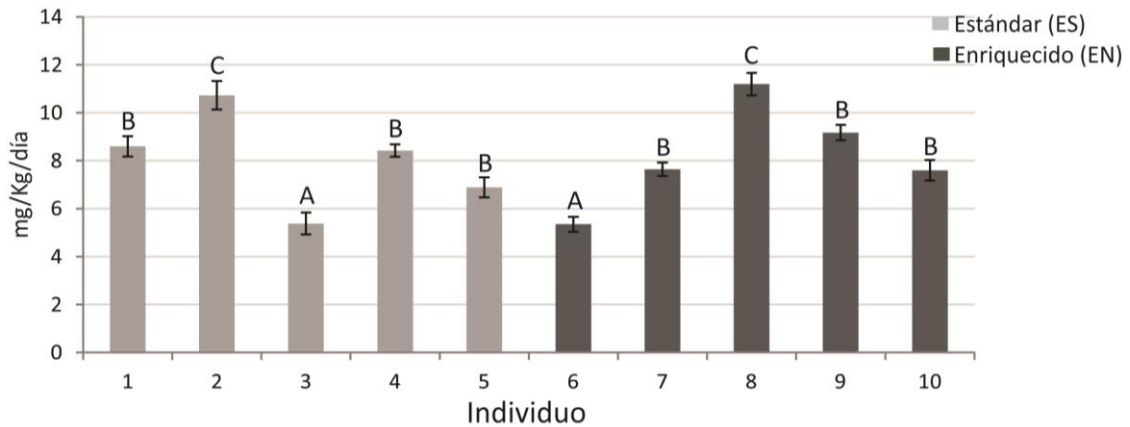


Figura 13. Medias \pm error estándar del consumo de nicotina (mg/Kg/día) por individuo.

Sobre el consumo de nicotina por grupo la prueba de t de student señala que no existen diferencias significativas entre el consumo del grupo enriquecido y del grupo crecido en condiciones estándar de laboratorio ($t_{.05(2)(138)}=23.38$ $p > 0.05$).

Consumo de nicotina por grupo

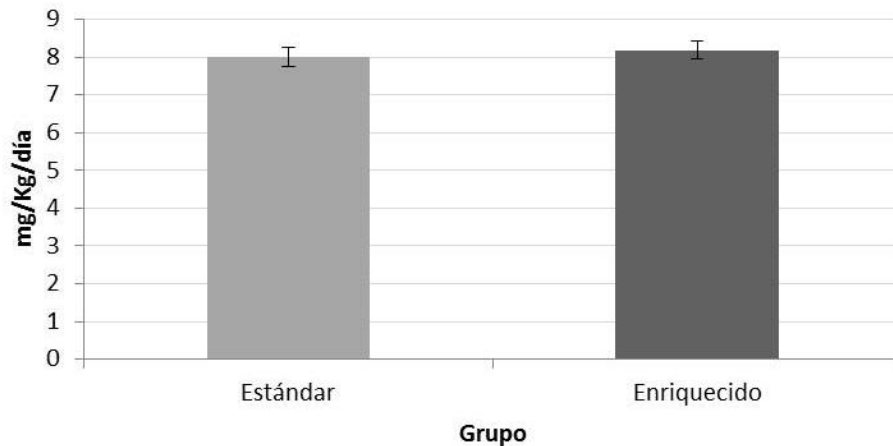


Figura 14. Se muestran las medias \pm error estándar del consumo de nicotina analizado por grupo.

El consumo de nicotina (mg/Kg/día) de cada uno de los individuos fue graficado y se obtuvo el coeficiente de correlación (r), 9 de los organismos muestran una correlación

negativa, siendo la mas evidente en el organismo 8 ($r = -0.816$), mientras que el organismo 9 perteneciente al grupo crecido en enriquecimiento no tiene correlación ($r = -0.084$).

Consumo diario de nicotina

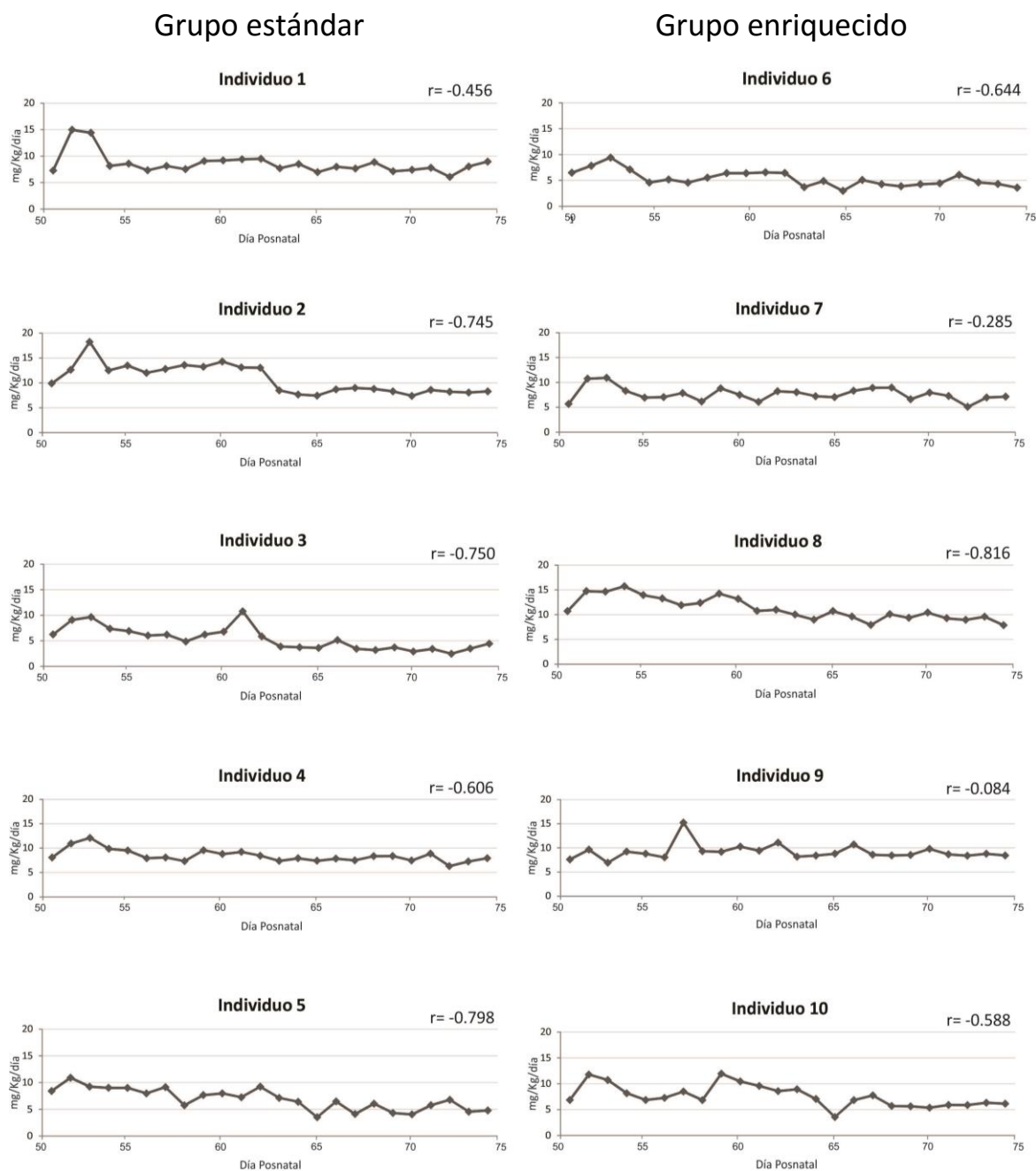


Figura 15. Consumo diario de nicotina de todos los individuos (mg/Kg/día), del día 51 al 74 de vida. Se muestra el coeficiente de correlación (r).

En cuanto a la ingesta de líquidos tanto de nicotina como de agua (ml/gr/día), la ANOVA muestra diferencias significativas entre los organismos, ($F_{.05(1)(15,367)}=32.50$ $p<0.05$)., la prueba post hoc muestra que los individuos 3 (ES) y 6 (EN) presentaron el menor consumo de líquido, en este caso nicotina, mientras que los organismos 2 (ES) y 8 (EN) que consumieron nicotina y los organismos 11 (ES), 12 (ES), 13 (ES) y 15 (EN) que consumieron agua, presentan mayor consumo de líquidos.

Consumo de líquidos por individuo

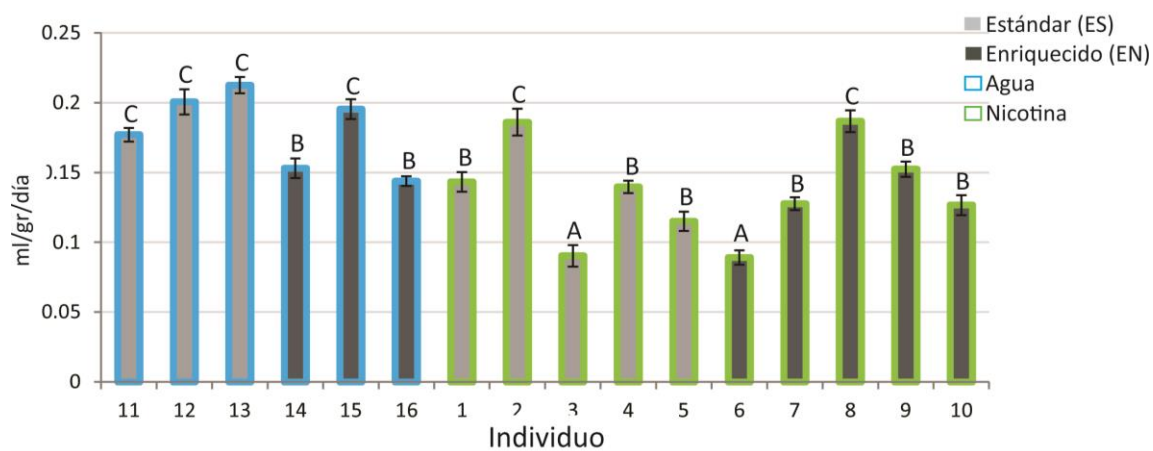


Figura 16. Se muestra las medias \pm el error estándar del consumo de líquidos tanto agua como la solución de nicotina (ml/gr/día) de todos los organismos.

Sobre el consumo de líquidos (ml/gr/día) por grupo, se muestran diferencias significativas ($F_{.05(1)(3,379)}=40.13$ $p<0.05$), la prueba post hoc muestra que los animales expuestos a nicotina tuvieron un menor consumo de líquidos, mientras que el grupo crecido en ambiente estándar y que consumió solo agua tuvieron un mayor consumo.

Consumo de líquidos por grupo

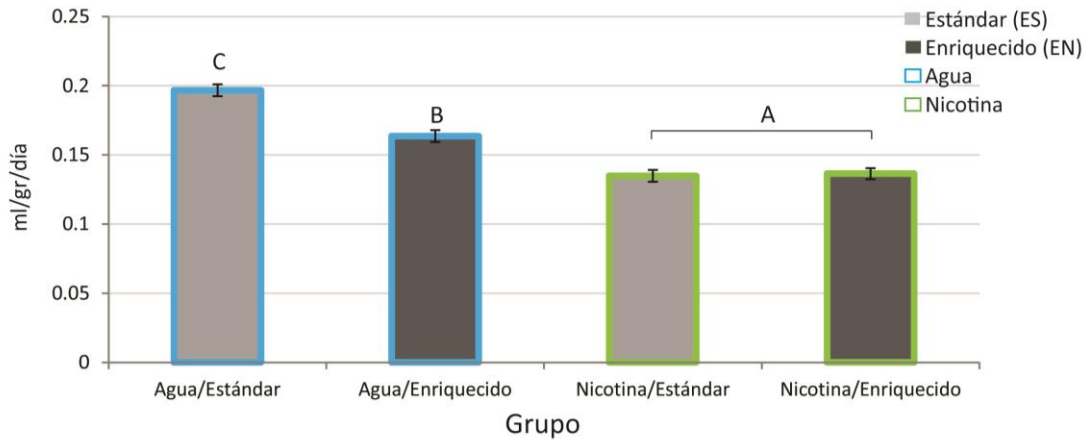


Figura 17. Se muestra las medias \pm el error estándar del consumo de líquidos tanto agua como la solución de nicotina (ml/gr/día) por grupo.

Inmunohistoquímica

Debido al delicado proceso inmunohistoquímico algunos de los tejidos se deterioraron, así que no fue posible su inclusión para los siguientes análisis estadísticos. Sin embargo los tejidos pertenecientes a los animales 13, 14, 16, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 fueron usados para el conteo celular y el posterior análisis estadístico.

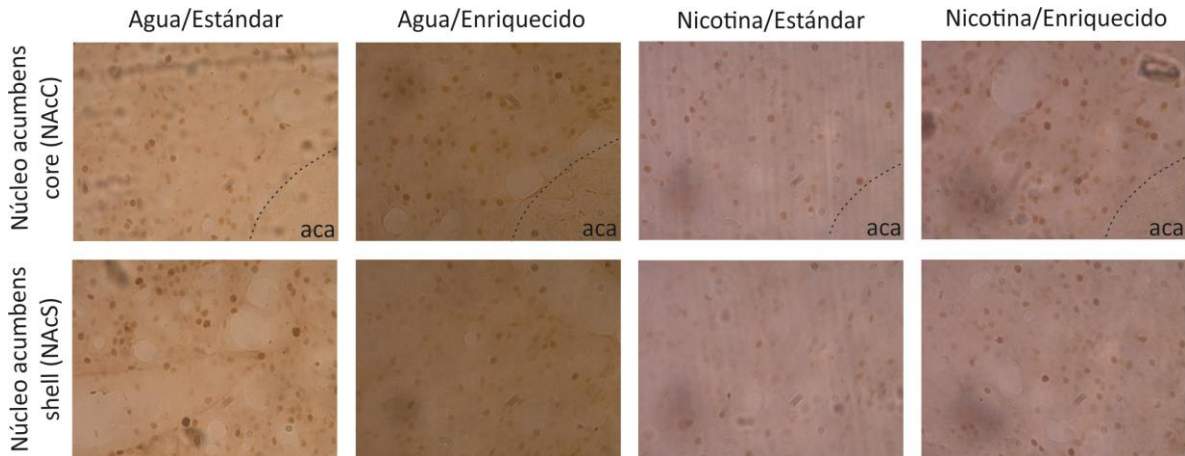


Figura 18. Fotografías analizadas del núcleo acumbens core y de la Shell, de cada uno de los grupos.

La prueba de ANOVA señala que existen diferencias significativas respecto al número de células inmunoreactivas del núcleo acumbens core ($F_{.05(1)(11,102)}=15.04$ $p<0.05$), la prueba post hoc mostro que los organismos 3 (ES), 6 (ES), 9 (EN) del grupo que consumió nicotina y el organismo 14 (EN) del grupo que consumió agua tienen menos células inmunoreactivas de todos los organismos.

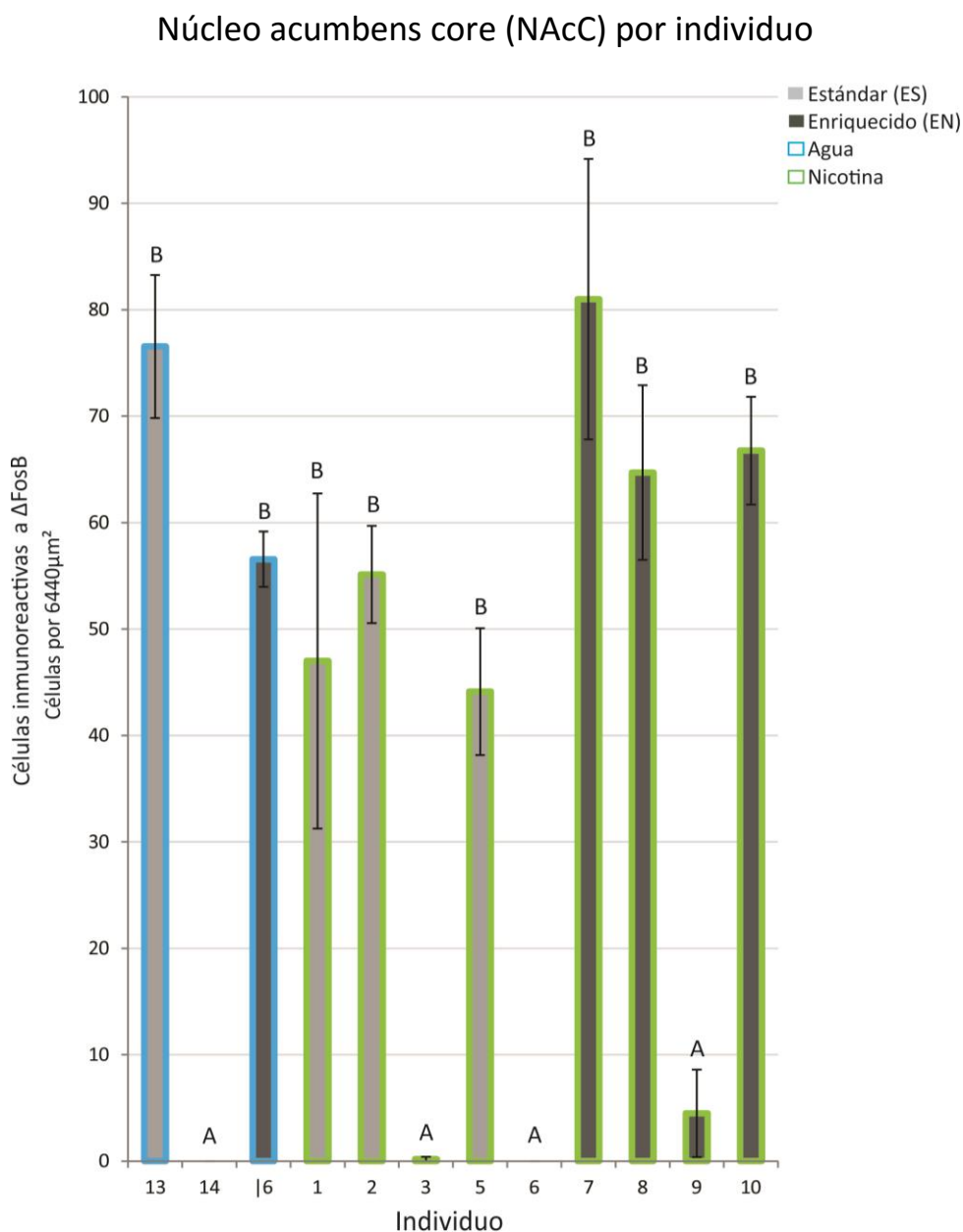


Figura 19. Se muestran las medias ±error estándar del número de células inmunoreactivas a Δ FosB del núcleo acumbens core por individuo.

La prueba de ANOVA señala que hay diferencias significativas en el número de células inmunoreactivas en núcleo acumbens Shell ($F_{.05(1)(11,102)}=15.14$ $p<0.05$), la prueba post hoc señala que los organismos 3 (ES), 6 (ES), 9 (EN) del grupo que consumió nicotina y el organismo 14 (EN) del grupo que consumió agua tienen menos células inmunoreactivas.

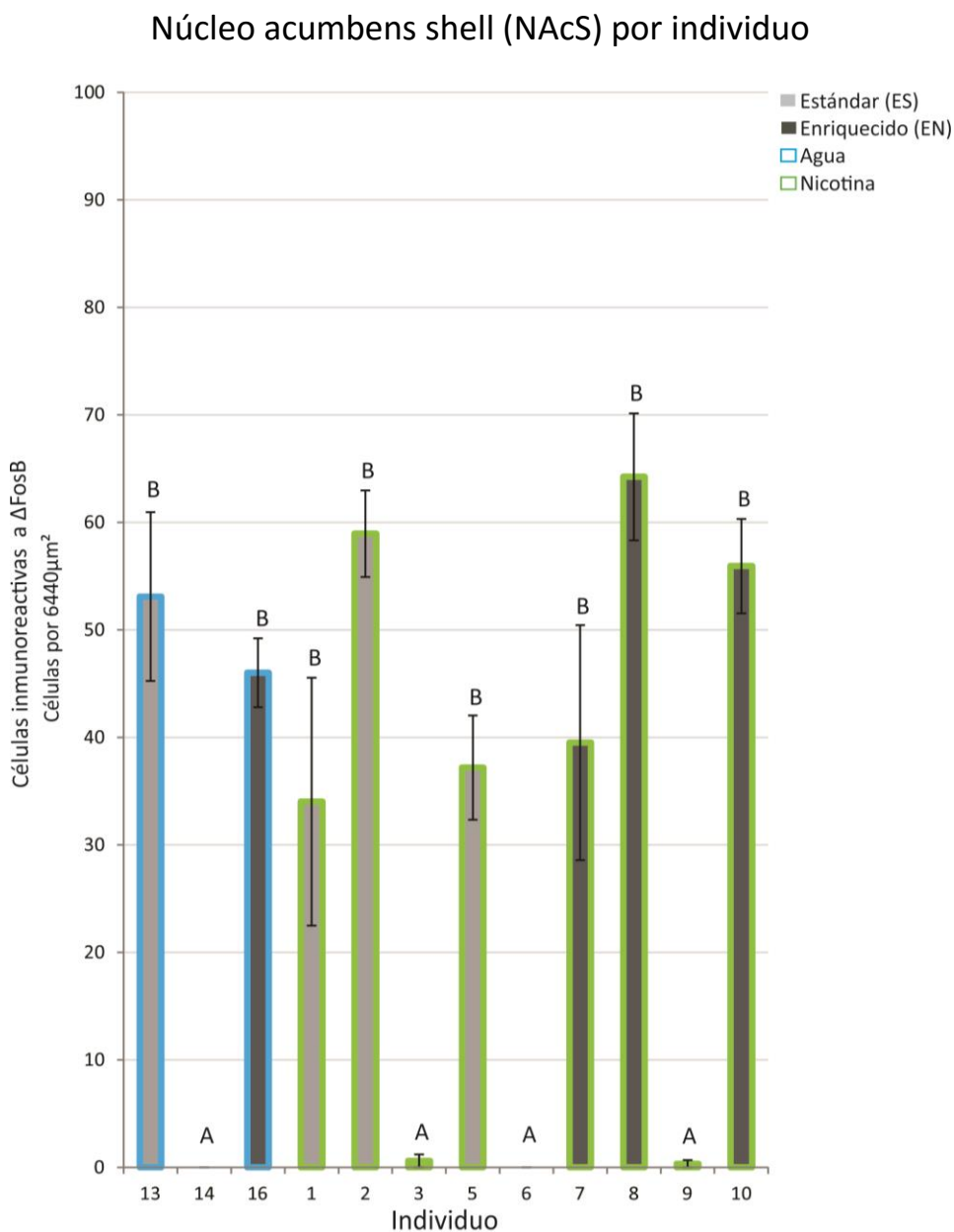


Figura 20. Se muestran las medias \pm error estándar del número de células inmunoreactivas a Δ FosB del núcleo acumbens shell por individuo.

En cuanto al número de células inmunoreactivas del NAcC entre los grupos muestra que existen diferencias significativas y los organismos que consumieron agua y crecieron bajo condiciones estándar, presentaron mas células inmunoreactivas en esta área ($F_{.05(1)(1,82)}=3.60$ $p<0.05$).

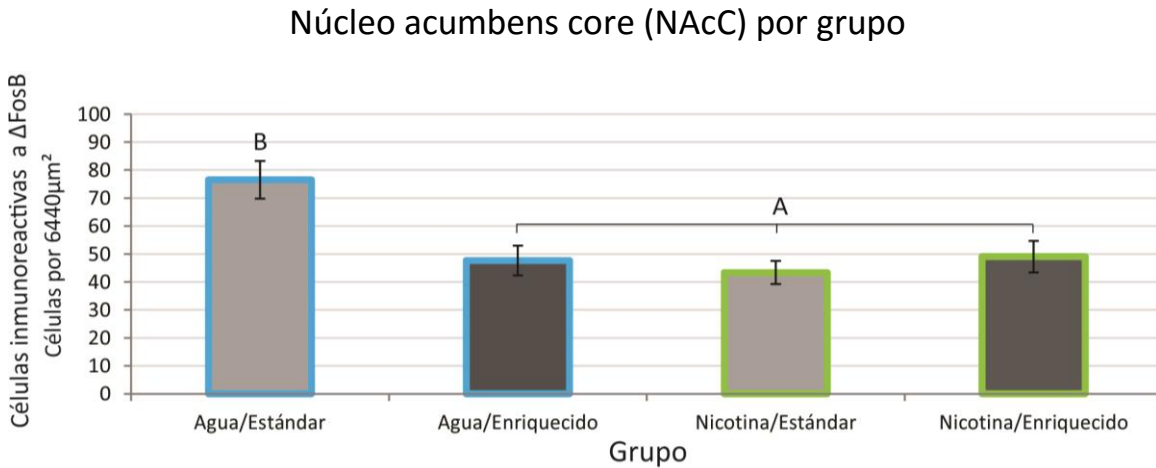


Figura 21. Medias ± error estándar de las células inmunoreactivas del núcleo acumbens core.

Por otra parte, no existen diferencias significativas en el número de células inmunoreactivas del NAcS entre los grupos ($F_{.05(1)(1,82)}=0.75$ $p>0.05$).

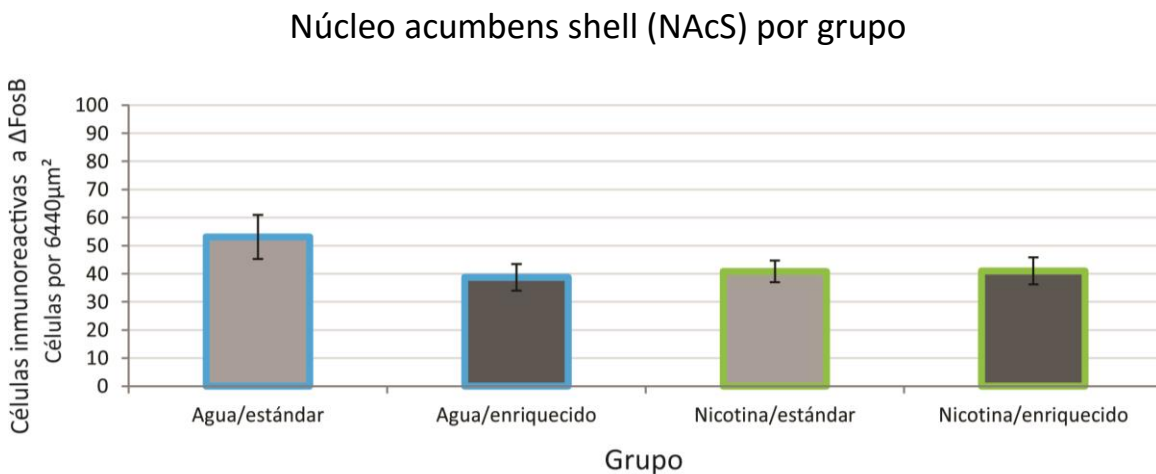


Figura 22. Medias ± error estándar de las células inmunoreactivas del núcleo acumbens shell.

Finalmente se reunió la información sobre el consumo de nicotina diaria (mg/kg/día), junto con el número de células inmunoreactivas a Δ FosB de los animales 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, en las dos gráficas siguientes.

Consumo de nicotina y el núcleo acumbens core (NACc)

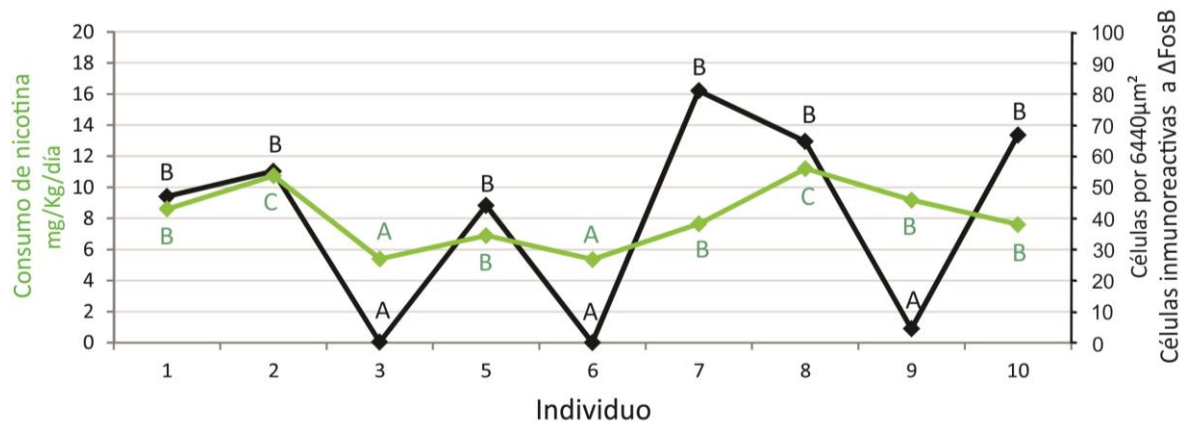


Figura 23. Medias del consumo de nicotina y el conteo celular del núcleo acumbens core.

Consumo de nicotina y el núcleo acumbens shell (NACs)

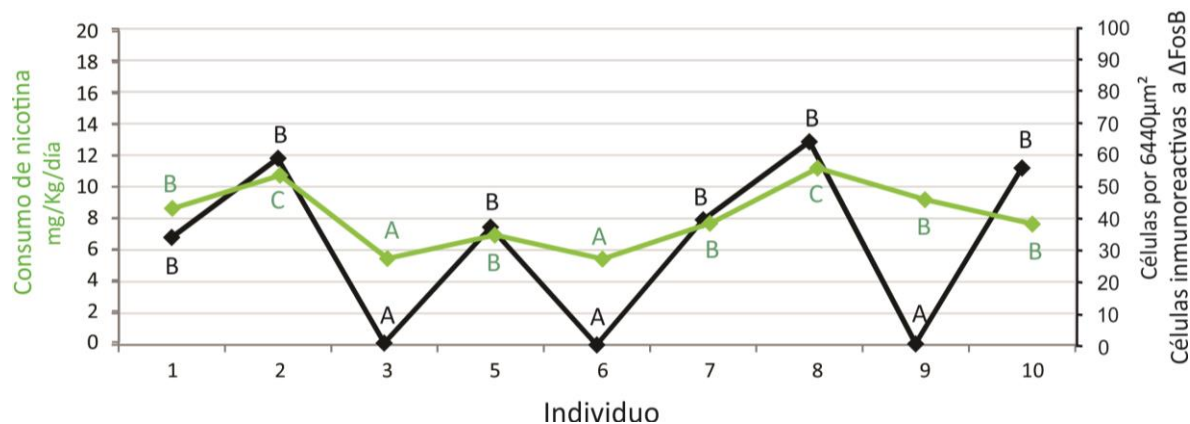


Figura 24. Medias del consumo de nicotina y el conteo celular del núcleo acumbens shell.

DISCUSIONES

El análisis sobre el consumo de nicotina por individuo agrupa a los 10 organismos en 3 grupos, el grupo C con el mayor consumo, rata 2 (10.7283 ± 0.5903 mg/kg/día) y rata 8 (11.1945 ± 0.4663 mg/kg/día), el grupo B con un consumo medio, rata 1 (8.5981 ± 0.4195 mg/kg/día), rata 4 (8.4203 ± 0.2611 mg/kg/día), rata 5 (6.8865 ± 0.4123 mg/kg/día), rata 7 (7.6441 ± 0.2859 mg/kg/día), rata 9 (9.1690 ± 0.3246 mg/kg/día), rata 10 (7.5964 ± 0.4319 mg/kg/día) y el grupo A con el menor consumo de nicotina, rata 3 (5.3787 ± 0.4565 mg/kg/día) y rata 6 (5.3492 ± 0.3080 mg/kg/día), todo los grupos compuestos por organismos crecidos en ambiente enriquecido y ambiente estándar. Si bien la literatura señala que el ambiente enriquecido es un factor protector en contra del consumo desmedido de nicotina como lo señala Venebra-Muñoz y colaboradores (2011), debemos recordar que todos los animales estuvieron aislados durante el consumo de nicotina, lo que indica que los efectos positivos del ambiente enriquecido se pierden cuando hay un aislamiento tanto de objetos como de interacción social, lo cual, en este experimento provocó que no se detectaran diferencias en el consumo de nicotina en ambos grupos ES (8.0026 ± 0.2541 mg/kg/día) y EN (8.1907 ± 0.2407 mg/kg/día).

Dadmarz y Vogel en el 2003 reportaron un autoconsumo de nicotina al 0.006% en machos de 2.67 ± 1.79 mg/kg/día, siendo los datos reportados en esta tesis mayores, ES (8.0026 ± 0.2541 mg/kg/día) y EN (8.1907 ± 0.2407 mg/kg/día), debido a que los animales estuvieron expuestos a la nicotina por 12 hrs continuas al día, sin posibilidad de elegir una u otra sustancia. Ya que se ha reportado que de la dosis consumida vía oral solo el 10% llegó al cerebro de los animales (Collins et al., 2012), podemos inferir que solo un 0.8 mg/kg/día de nicotina llegó al cerebro.

Aunque no existieron diferencias de consumo en ambos grupos, si hubo diferencias entre los periodos de consumo, los periodos 1 y 2, que abarcan el final de la pubertad y el inicio de la adultez, presentaron un mayor consumo de nicotina tanto del grupo crecido en ambiente estándar, 1ES (9.9131 ± 0.5438 mg/kg/día) y 2ES (9.0549 ± 0.4663 mg/kg/día) como del grupo que creció en ambiente enriquecido, 1EN (9.1583 ± 0.5438 mg/kg/día) y

2EN (9.1301 ± 0.4917 mg/kg/día), mientras que el consumo del periodo 3 y 4 presentan un consumo menor en ambos grupos 3ES (6.6825 ± 0.3493 mg/kg/día), 4ES (6.3599 ± 0.3694 mg/kg/día), 3EN (7.4344 ± 0.4054 mg/kg/día) y 4EN (7.0399 ± 0.3482 mg/kg/día). Estos resultados son congruentes con investigaciones ya reportadas como Klein y colaboradores (2004) y Nesil y colaboradores (2011), que demostraron que tanto hembras como machos adolescentes consumen más nicotina que organismos adultos, esto ocasionado porque, las ratas adolescentes son más resistentes a los efectos aversivos de la nicotina que ratas adultas (Shram et al., 2006, Wilmouth y Spear, 2004 en Pastor, 2013), lo cual les permite consumir más nicotina sin los síntomas aversivos que cesarían el consumo.

Se calculó la dosis de líquido diario consumido tanto de agua como de nicotina, para ver si los animales tuvieron una predilección por alguno de los dos líquidos, los análisis estadísticos post-hoc agruparon en tres subgrupos a los organismos, el grupo A con menor consumo, rata 3 (0.0903 ± 0.0077 mg/kg/día) y rata 6 (0.0891 ± 0.0051 mg/kg/día), el grupo B con el consumo medio, rata 14 (0.1529 ± 0.0070 mg/kg/día), rata 16 (0.1438 ± 0.0034 mg/kg/día), rata 1 (0.1432 ± 0.0069 mg/kg/día), rata 4 (0.1396 ± 0.0043 mg/kg/día), rata 5 (0.1149 ± 0.0068 mg/kg/día), rata 7 (0.1276 ± 0.0046 mg/kg/día), rata 9 (0.1523 ± 0.0054 mg/kg/día) y rata 10 (0.1266 ± 0.0072 mg/kg/día) y el grupo C con el mayor consumo, rata 11 (0.1770 ± 0.0048 mg/kg/día), rata 12 (0.2005 ± 0.0090 mg/kg/día), rata 13 (0.2125 ± 0.0057 mg/kg/día), rata 15 (0.1953 ± 0.0069 mg/kg/día), rata 2 (0.1859 ± 0.0095 mg/kg/día) y rata 8 (0.1865 ± 0.0077 mg/kg/día) grupo compuesto mayormente por animales que consumieron agua. Al ser analizado por grupo las pruebas post-hoc muestran que los animales que consumieron nicotina muestran un menor consumo de líquidos, NES (0.1348 ± 0.0043 mg/kg/día) y NEN (0.1364 ± 0.0040 mg/kg/día) que los animales que consumieron agua, AES (0.1966 ± 0.0042 mg/kg/día) y AEN (0.1636 ± 0.0043 mg/kg/día), lo cual indica que las ratas pueden discriminar entre agua y solución de nicotina, tal vez por los efectos aversivos de la nicotina en el organismo lo cual provocaría un cese en el consumo de líquidos.

El análisis post-hoc del conteo de células inmunoreactivas en el núcleo acumbens tanto del área core como de la shell, muestra un grupo B con más células (ratas 13, 16, 1, 2, 5, 7,

8 y 10) y el grupo A con menos células (ratas 14, 3, 6 y 9), recordemos que los animales 3 y 6 tuvieron el menor consumo de nicotina del grupo lo cual es congruente ya que el factor de transcripción Δ FosB es inducido en las regiones de recompensa del cerebro por la exposición crónica a drogas de abuso y permanece por largos periodos de tiempo (Pereira, 2008).

Sin embargo el conteo celular por grupo del núcleo acumbens core muestra que el grupo estándar que consumió agua tiene el mayor número de células inmunoreactivas a Δ FosB (53 ± 8 células) que el resto de los grupos AEN (39 ± 5 células), NES (41 ± 4 células) y NEN (41 ± 5 células), lo cual indica que los grupos con nicotina tuvieron una menor activación de este núcleo por lo tanto una menor mediación motora. Mientras que el núcleo acumbens shell no muestra diferencias significativas entre los grupos, lo cual sugiere que los efectos protectores del ambiente enriquecido sobre la prevención del consumo de nicotina al que estuvieron expuestos durante su crecimiento, desapareció al aislar los animales, por lo tanto es necesaria una estimulación constante del sujeto para mantener los efectos protectores del ambiente.

En las dos últimas gráficas vemos que los animales que consumieron menos nicotina (ratas 3 y 6) tienen el menor número de células marcadas a Δ FosB, pero la rata 9 que tuvo un consumo medio también tiene un menor número de células marcadas. Mientras que los animales que tuvieron el mayor consumo de nicotina (ratas 2 y 8) no tienen un número de células elevado. Es claro que aunque los animales pertenecían a una misma cepa, a un mismo sexo, a una edad y un ambiente controlado, los resultados no parecen ser concluyentes respecto a lo consumido y a la cantidad de células marcadas para Δ FosB, lo cual sugiere que existen otros factores que intervienen en el proceso de consumo de sustancias y que no fueron analizados en esta investigación. Ahora si esto ocurrió en nuestro modelo animal, en el humano se complica el dilucidar cuales son todos los factores que influyen en la adicción, podemos afirmar que la adicción es el resultado del aprendizaje de vida, la edad de contacto con la sustancia, el nivel de recompensa del consumo, la consolidación por medio del aprendizaje, la necesidad de aliviar los síntomas negativos, la genética, entre otros.

Por ultimo sería importante analizar el consumo de nicotina a nivel individual en un ambiente social, en un enriquecimiento ambiental, analizando el consumo de líquidos las 24 hrs del día, y analizar la cantidad de Δ FosB en el núcleo acumbens en la adultez, de ratas expuestas a nicotina durante la pubertad ya que como se sabe el factor de transcripción Δ FosB se acumula en el cerebro naturalmente y por consumo de drogas actuando como un factor epigenético, al interactuar con la cromatina y así remodelando los promotores específicos para la regulación de genes que tienen que ver con plasticidad lo cual lleva a una remodelación neuronal relacionada con conductas adictivas, de búsqueda y saciedad de la necesidad de consumo, que son importantes en el desarrollo y mantenimiento de la adicción, actuando como un factor epigenético. Sería importante saber que ocurre con esta proteína después de un periodo largo sin consumo y su manifestación en la conducta. Al igual que un método de clasificación a nivel conductual del organismo para predecir la probabilidad de un individuo a desarrollar una adicción, y por lo tanto desarrollar terapias preventivas.

CONCLUSIÓN

Los datos reportados demuestran que el consumo de nicotina en ratas es más alto durante la pubertad y desciende hacia la adultez de ratas macho Wistar, lo que indica que es durante la pubertad cuando debe existir una mayor estimulación para disminuir el consumo de nicotina y por lo tanto los efectos negativos en la salud, sin embargo es necesario mantener esa estimulación durante otras etapas de vida, ya que los efectos protectores sobre el consumo de nicotina desaparecieron debido a un aislamiento tanto de objetos como de interacción social, por lo que no se mostraron diferencias significativas entre el grupo expuesto al enriquecimiento ambiental y los animales que se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio, durante su crecimiento.

La relación del consumo de nicotina y su relación con el número de células marcadas a Δ FosB no es concluyente, por lo cual se puede deber a diferencias individuales.

Por lo tanto la vulnerabilidad a la nicotina difiere de organismo a organismo, influyen tanto factores genéticos como ambientales, y su análisis son clave para entender la adicción.

LITERATURA

- Abercrombie, E. D., Keefe, K. A., DiFrischia, D. S., Zigmond, M. J. (1989). Differential effect of stress on in vivo dopamine release in striatum, nucleus accumbens, and medial frontal cortex. *Journal of neurochemistry*, 52(5), 1655-1658. Citado en Fernández-Espejo, E. (2000). ¿Cómo funciona el nucleus accumbens?. *Revista de Neurología*, 30(9), 845-849.
- Adams, J., Bowman, K., Burke, B., Casson, L., Caviness, L., Coffey, L. E., Hinsdale, M. (1999). National household survey on drug abuse data collection. *Final report*. Citado Stairs, D. J. y Bardo, M. T. (2010). Neurobehavioral effects of environmental enrichment and drug abuse vulnerability. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92(3), 377-382.
- Ahmed, S. H. y Koob, G. F. (2005). Transition to drug addiction: a negative reinforcement model based on an allostatic decrease in reward function. *Psychopharmacology*, 180(3), 473-490. Citado en Pereira, T. (2008). Neurobiología de la adicción. *Rev Psiquiatr Urug*, 73(1), 9-24.
- Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (2008). Fundamentos de fisiología vegetal. *Madrid, ES*. Editorial Mc Graw Hill Interamericana.
- Barrett, S. P. (2010). The effects of nicotine, denicotinized tobacco, and nicotine-containing tobacco on cigarette craving, withdrawal, and self-administration in male and female smokers. *Behavioural pharmacology*, 21(2), 144-152. Citado en Collins, A. C., Pogun, S., Nesil, T., Kanit, L. (2012). Oral nicotine self-administration in rodents. *Journal of addiction research & therapy* 2 (4), 1-10
- Bassareo, V. y Di Chiara, G. (1997). Differential influence of associative and nonassociative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum. *The Journal of Neuroscience*, 17(2), 851-861. Citado en Silva, R., Espinosa, P., Riquelme, R., Sanguinetti, N., González, L., Cruz, G., Renard, G. M., Sotomayor-Zárate, R. (2014). Rol de las hormonas sexuales sobre circuitos dopaminérgicos cerebrales. *Rev. Farmacol. Chile*. 7(1):14
- Benowitz, N. L. (2010). Nicotine addiction. *The New England journal of medicine*, 362(24), 2295-2303. Citado en Pastor, V., Vázquez, P., Corapi, E. y Bernabeu, R. O. (2013). La adicción a la nicotina: vulnerabilidad, epigénesis y modelos animales de estudio. *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento*, 5(2), 61-73.
- Benowitz, N. L. y Jacob III P. (1984). Daily intake of nicotine during cigarette smoking. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 35(4), 499-504. Citado en Dadmarz, M. y Vogel, W. H. (2003). Individual self-administration of nicotine by rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 76(3), 425-432.
- Benowitz, N. L., Hukkanen, J. y Jacob III, P. (2009). Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. In *Nicotine psychopharmacology* 192: 29-60. Citado en Pastor, V., Vázquez, P., Corapi, E. y Bernabeu, R. O. (2013). La adicción a la nicotina: vulnerabilidad, epigénesis y modelos animales de estudio. *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento*, 5(2), 61-73.

- Breslau, N. y Peterson, E. L. (1996). Smoking cessation in young adults: age at initiation of cigarette smoking and other suspected influences. *American journal of public health*, 86(2), 214-220. Citado en Pastor, V., Vázquez, P., Corapi, E. y Bernabeu, R. O. (2013). La adicción a la nicotina: vulnerabilidad, epigénesis y modelos animales de estudio. *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento*, 5(2), 61-73.
- Caille, S., Clemens, K., Stinus, L., Cador, M. (2012). Modeling nicotine addiction in rats. *Methods in Molecular Biology*, 829, 243-56. Citado en Pastor, V., Vázquez, P., Corapi, E. y Bernabeu, R. O. (2013). La adicción a la nicotina: vulnerabilidad, epigénesis y modelos animales de estudio. *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento*, 5(2), 61-73.
- Camí, M. J., Swift, R. M., Mcgeary, J. (2005). Drogadicción. *RET: revista de toxicomanías*, (42), 3-14.
- Carr, D. B. y Sesack, S. R. (2000a). GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex. *Synapse*, 38(2), 114-123. Citado en Vázquez, P. E. (2008). Proyecciones de la corteza prefrontal a los núcleos monoaminérgicos del mesencéfalo: vías y receptores implicados. Tesis para obtener el grado de Doctor en Biología por la Universidad de Barcelona.
- Carr, D. B. y Sesack, S. R. (2000b). Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *The Journal of neuroscience*, 20 (10), 3864-3873. Citado en Vázquez, P. E. (2008). Proyecciones de la corteza prefrontal a los núcleos monoaminérgicos del mesencéfalo: vías y receptores implicados. Tesis para obtener el grado de Doctor en Biología por la Universidad de Barcelona.
- Chao, J., y Nestler, E. J. (2004). Molecular neurobiology of drug addiction. *Annu. Rev. Med.*, 55, 113-132.
- Chen, J. y Millar, W. J. (1998). Age of smoking initiation: implications for quitting. *Health reports-statistics Canada*, 9, 39-48. Citado en Pastor, V., Vázquez, P., Corapi, E. y Bernabeu, R. O. (2013). La adicción a la nicotina: vulnerabilidad, epigénesis y modelos animales de estudio. *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento*, 5(2), 61-73.
- Collins, A. C., Pogun, S., Nesil, T., Kanit, L. (2012). Oral nicotine self-administration in rodents. *Journal of addiction research & therapy* 2 (4), 1-10
- Corominas, M., Roncero, C., Casas, M. (2009). El sistema dopaminérgico en las adicciones. *Mente y cerebro*, (35), 78-84.
- Dadmarz, M., y Vogel, W. H. (2003). Individual self-administration of nicotine by rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 76(3), 425-432.
- Damsma, G., Pfaus, J. G., Wenkstern, D., Phillips, A. G., Fibiger, H. C. (1992). Sexual behavior increases dopamine transmission in the nucleus accumbens and striatum of male rats: comparison with novelty and locomotion. *Behavioral neuroscience*, 106(1), 181-191. Citado en Fernández-Espejo, E. (2000). ¿Cómo funciona el nucleus accumbens?. *Revista de Neurología*, 30(9), 845-849.

- Dell, D. y Hopkins, C. (2011). Residential volatile substance misuse treatment for Indigenous youth in Canada. *Substance use & misuse*, 46(sup1), 107-113. Citado en Páez, N. (2012). Enriquecimiento ambiental y drogas de abuso. *Mediagraphics*, (7) 2
- Deutch, A. Y. y Cameron, D. S. (1992). Pharmacological characterization of dopamine systems in the nucleus accumbens core and shell. *Neuroscience*, 46 (1), 49-56. Citado en Fernández-Espejo, E. (2000). ¿Cómo funciona el nucleus accumbens?. *Revista de Neurología*, 30(9), 845-849.
- Di Chiara, G., y Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(14), 5274-5278. Citado en Silva, R., Espinosa, P., Riquelme, R., Sanguinetti, N., González, L., Cruz, G., Renard, G. M., Sotomayor-Zárate, R. (2014). Rol de las hormonas sexuales sobre circuitos dopaminérgicos cerebrales. *Rev. Farmacol. Chile*. 7(1):14
- Diamond, M. C. (2001). Response of the brain to enrichment. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 73(2), 211-220. Citado en Stairs, D. J. y Bardo, M. T. (2010). Neurobehavioral effects of environmental enrichment and drug abuse vulnerability. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92(3), 377-382.
- Diamond, M. C., Krech, D., Rosenzweig, M. R. (1964). The effects of an enriched environment on the histology of the rat cerebral cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 123(1), 111-119. Citado en Stairs, D. J. y Bardo, M. T. (2010). Neurobehavioral effects of environmental enrichment and drug abuse vulnerability. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92(3), 377-382.
- DiFranza, J. R., Rigotti, N. A., McNeill, A. D., Ockene, J. K., Savageau, J. A., St Cyr, D. Coleman, M. (2000). Initial symptoms of nicotine dependence in adolescents. *Tobacco control*, 9(3), 313-319. Citado en Collins, A. C., Pogun, S., Nesil, T., Kanit, L. (2012). Oral nicotine self-administration in rodents. *Journal of addiction research & therapy* 2 (4), 1-10
- Elsworth, J. D. y Roth, R. H. (1997). Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease. *Experimental neurology*, 144(1), 4-9. Citado en Silva, R., Espinosa, P., Riquelme, R., Sanguinetti, N., González, L., Cruz, G., Renard, G. M., Sotomayor-Zárate, R. (2014). Rol de las hormonas sexuales sobre circuitos dopaminérgicos cerebrales. *Rev. Farmacol. Chile*. 7(1):14
- Fernández-Espejo, E. (2000). ¿Cómo funciona el nucleus accumbens?. *Revista de Neurología*, 30(9), 845-849.
- Graybiel, A. M., Moratalla, R., Robertson, H. A. (1990). Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(17), 6912-6916. Citado en Nestler, E. J. (2008). Transcriptional mechanisms of addiction: role of Δ FosB. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 363(1507), 3245-3255.
- Green, T. A., Cain, M. E., Thompson, M., Bardo, M. T. (2003). Environmental enrichment decreases nicotine-induced hyperactivity in rats. *Psychopharmacology*, 170(3), 235-241.

- Citado Stairs, D. J. y Bardo, M. T. (2010). Neurobehavioral effects of environmental enrichment and drug abuse vulnerability. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92(3), 377-382.
- Groenewegen, H. J., Wright, C. I., Beijer, A. V. (1996). The nucleus accumbens: gateway for limbic structures to reach the motor system?. *Progress in brain research*, 107, 485. Citado en Fernández-Espejo, E. (2000). ¿Cómo funciona el nucleus accumbens?. *Revista de Neurología*, 30(9), 845-849.
 - Hebb, D. O. (1947). The effects of early experience on problem solving at maturity. *Am Psychol*, 2, 306-307. Citado en Van Praag, H., Kempermann, G., Gage, F. H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews Neuroscience*, 1(3), 191-198.
 - Heidbreder, C. A., Foxton, R., Cilia, J., Hughes, Z. A., Shah, A. J., Atkins, A., Jones, D. N. (2001). Increased responsiveness of dopamine to atypical, but not typical antipsychotics in the medial prefrontal cortex of rats reared in isolation. *Psychopharmacology*, 156(2-3), 338-351. Citado Stairs, D. J. y Bardo, M. T. (2010). Neurobehavioral effects of environmental enrichment and drug abuse vulnerability. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92 (3), 377-382.
 - Heimer, L., Zahm, D. S., Churchill, L., Kalivas, P. W., & Wohltmann, C. (1991). Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience*, 41(1), 89-125. Citado en Fernández-Espejo, E. (2000). ¿Cómo funciona el nucleus accumbens?. *Revista de Neurología*, 30(9), 845-849.
 - Herkenham, M., Edley, S. M., Stuart, J. (1984). Cell clusters in the nucleus accumbens of the rat, and the mosaic relationship of opiate receptors, acetylcholinesterase and subcortical afferent terminations. *Neuroscience*, 11 (3), 561-593. Citado en Fernández-Espejo, E. (2000). ¿Cómo funciona el nucleus accumbens?. *Revista de Neurología*, 30(9), 845-849.
 - Hope, B. T., Kosofsky, B., Hyman, S. E., Nestler, E. J. (1992). Regulation of IEG expression and AP-1 binding by chronic cocaine in the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 5764-5768. Citado en Nestler, E. J. (2008). Transcriptional mechanisms of addiction: role of Δ FosB. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 363(1507), 3245-3255.
 - Hopfer, C. J., Crowley, T. J., Hewitt, J. K. (2003). Review of twin and adoption studies of adolescent substance use. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 42(6), 710-719. Citado Stairs, D. J. y Bardo, M. T. (2010). Neurobehavioral effects of environmental enrichment and drug abuse vulnerability. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92(3), 377-382.
 - Izenwasser, S. (2005). Differential effects of psychoactive drugs in adolescents and adults. *Critical Reviews™ in Neurobiology*, 17(2). Citado en Nesil, T., Kanit, L., Collins, A. C., Pogun, S. (2011). Individual differences in oral nicotine intake in rats. *Neuropharmacology*, 61(1), 189-201.
 - Johansson, O. y Hökfelt, T. (1981). Nucleus accumbens: transmitter histochemistry with special reference to peptide-containing neurons. In *The Neurobiology of the Nucleus*

Accumbens (pp. 147-172). Citado en Fernández-Espejo, E. (2000). ¿Cómo funciona el nucleus accumbens?. *Revista de Neurología*, 30(9), 845-849.

- Jongen-Rêlo, A. L., Voorn, P., Groenewegen, H. J. (1994). Immunohistochemical characterization of the shell and core territories of the nucleus accumbens in the rat. *European Journal of Neuroscience*, 6(8), 1255-1264. Citado en Fernández-Espejo, E. (2000). ¿Cómo funciona el nucleus accumbens. *Revista de Neurología*, 30(9), 845-849.
- Klein, L. C., Stine, M. M., Vandenberg, D. J., Whetzel, C. A., Kamens, H. M. (2004). Sex differences in voluntary oral nicotine consumption by adolescent mice: a dose-response experiment. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 78(1), 13-25. Citado en Collins, A. C., Pogun, S., Nesil, T., Kanit, L. (2012). Oral nicotine self-administration in rodents. *Journal of addiction research & therapy* 2 (4), 1-10
- Kolb, B. y Whishaw, I. Q. (1998). Brain plasticity and behavior. *Annual review of psychology*, 49(1), 43-64. Citado Stairs, D. J. y Bardo, M. T. (2010). Neurobehavioral effects of environmental enrichment and drug abuse vulnerability. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92(3), 377-382.
- Kolb, B., Gorny, G., Söderpalm, A. H., Robinson, T. E. (2003). Environmental complexity has different effects on the structure of neurons in the prefrontal cortex versus the parietal cortex or nucleus accumbens. *Synapse*, 48(3), 149-153. Citado Stairs, D. J. y Bardo, M. T. (2010). Neurobehavioral effects of environmental enrichment and drug abuse vulnerability. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92(3), 377-382.
- Koob, G. F. y Le Moal, M. (2006). *Neurobiology of addiction*. Elsevier. UK.
- Kota, D., Martin, B. R., Robinson, S. E., Damaj, M. I. (2007). Nicotine dependence and reward differ between adolescent and adult male mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322(1), 399-407. Citado en Collins, A. C., Pogun, S., Nesil, T. y Kanit, L. (2012). Oral nicotine self-administration in rodents. *Journal of addiction research & therapy* 2 (4), 1-10
- Levin, E. D., Rezvani, A. H., Montoya, D., Rose, J. E., Swartzwelder, H. S. (2003). Adolescent-onset nicotine self-administration modeled in female rats. *Psychopharmacology*, 169(2), 141-149.
- Linden, D. (2011). *La brújula del placer*. Paidós. España.
- López, J. A. (2000). *Botánica mágica y misteriosa*. Mundi-Prensa. España.
- Maldonado-Irizarry, C. S., Swanson, C. J., Kelley, A. E. (1995). Glutamate receptors in the nucleus accumbens shell control feeding behavior via the lateral hypothalamus. *The Journal of neuroscience*, 15(10), 6779-6788. Citado en Fernández-Espejo, E. (2000). ¿Cómo funciona el nucleus accumbens?. *Revista de Neurología*, 30(9), 845-849.
- Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-V). 2014. Panamericana, España.
- Markou, A. (2008). Neurobiology of nicotine dependence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1507), 3159-3168. Citado en Pérez-Rubio, G., Herrera, E. U., Camarena, Á., Reséndiz-Hernández, J. M., Méndez, M., Venegas, A. R.,

- Falfán-Valencia, R. (2011). Visión general de la neurobiología y genética en la adicción a la nicotina. *Neurol Cir Torax*,70(3), 179-187.
- Matta, S. G., Balfour, D. J., Benowitz, N. L., Boyd, R. T., Buccafusco, J. J., Caggiula, A. R., Gardiner, P. S. (2007). Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. *Psychopharmacology*, 190(3), 269-319. Citado en Collins, A. C., Pogun, S., Nesil, T., Kanit, L. (2012). Oral nicotine self-administration in rodents. *Journal of addiction research & therapy* 2 (4), 1-10
 - Mogenson, G. J., Jones, D. L., Yim, C. Y. (1980). From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Progress in neurobiology*, 14(2), 69-97. Citado en Fernández-Espejo, E. (2000). ¿Cómo funciona el nucleus acumbens?. *Revista de Neurología*, 30(9), 845-849.
 - Nithianantharajah, J. y Hannan, A. J. (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(9), 697-709. Citado en Blázquez G. (2011). Enriquecimiento ambiental en ratones 3xTgAD (modelo de Alzheimer): perfiles cognitivos y emotivos. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
 - O'Donnell, P. y Grace, A. A. (1998). Phencyclidine interferes with the hippocampal gating of nucleus accumbens neuronal activity in vivo. *Neuroscience*, 87(4), 823-830. Citado en Fernández-Espejo, E. (2000). ¿Cómo funciona el nucleus acumbens?. *Revista de Neurología*, 30(9), 845-849.
 - Organización mundial de la salud (OMS). 2015. Tabaco, nota descriptiva n. 339. Consultado en línea el 14 de enero de 2016 en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/es/>
 - Pascual, P. F. y Vicéns, S. (2004). Aspectos históricos, sociales y económicos del tabaco. Adicciones. 16 (2): 13-24. Citado en Moreno-Coutiño, A. y Coutiño, B. (2012). *Nicotiana tabacum* L., usos y percepciones. *Etnobiología* 10 (2) 29-39
 - Paxinos, G. y Watson, C. (1998). *The Rat Brain*. Academic Press, Inc. USA.
 - Pereira, T. (2008). Neurobiología de la adicción. *Rev Psiquiatr Urug*, 73(1), 9-24.
 - Pérez de los Cobos, J. (2006). *Tratado SET de trastornos adictivos*. Médica Panamericana. España.
 - Pérez-Rubio, G., Herrera, E. U., Camarena, Á., Reséndiz-Hernández, J. M., Méndez, M., Venegas, A. R., Falfán-Valencia, R. (2011). Visión general de la neurobiología y genética en la adicción a la nicotina. *Neurol Cir Torax*,70(3), 179-187.
 - Pfaus, J. G., Damsma, G., Nomikos, G. G., Wenkstern, D. G., Blaha, C. D., Phillips, A. G., Fibiger, H. C. (1990). Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rat. *Brain research*, 530(2), 345-348. Citado en Fernández-Espejo, E. (2000). ¿Cómo funciona el nucleus acumbens?. *Revista de Neurología*, 30(9), 845-849.
 - Picciotto, M. R. (1998). Common aspects of the action of nicotine and other drugs of abuse. *Drug and alcohol dependence*, 51(1), 165-172. Citado en Moreno-Coutiño, A. y Coutiño, B. 2012. *Nicotiana tabacum* L., usos y percepciones. *Etnobiología* 10 (2) 29-39

- Pichón-Riviere, A., Reynales-Shigematsu, L. M., Bardach, A., Caporale, J., Augustovski, F., Alcaraz, A., Caccavo, F., Sáenz de Miera-Juárez, B., Muños-Hernández, J. A., Gallegos-Rivero, V., Hernández-San Román, E. (2013). Carga de Enfermedad Atribuible al Tabaquismo en México. Documento Técnico IECS N° 10. Instituto de Efectividad Clínica y Sanitaria, Buenos Aires, Argentina.
- Plenz, D. y Aertsen, A. (1994). The basal ganglia: "Minimal coherence detection" in cortical activity distributions. In *The Basal Ganglia IV* (pp. 579-588). Springer US. Citado en Fernández-Espejo, E. (2000). ¿Cómo funciona el nucleus acumbens?. *Revista de Neurología*, 30(9), 845-849.
- Redolar, D. (2008). Cerebro y adicción. Editorial UOC. España. consultado en línea el 04 de noviembre de 2014 en <http://books.google.es/books?id=WTzLYyEkVjOC&pg=PA381&dq=sistema+dopaminergico&hl=es&sa=X&ei=xGZSVKbaGJeAygSQvYCICg&ved=0CDEQ6AEwAg#v=onepage&q=sistema%20dopaminergico&f=false>
- Redolat, R., Carrasco, M. C., Simón, V. M. (1994). Efectos cognitivos de la nicotina y el tabaco en sujetos humanos. *Psicothema*, 6(1), 5-20).
- Reynales-Shigematsu, L., Guerrero-López, C., Lazcano-Ponce, E., Villatoro-Velázquez, J., Medina-Mora, M., Fleiz-Bautista, C. (2012). Encuesta Nacional de Adicciones 2011: Reporte de Tabaco. *México, DF: Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz*.
- Robbins, T. W. y Koob, G. F. (1980). Selective disruption of displacement behavior by lesions of the mesolimbic dopamine system. *Nature*, 285: 409-12. Citado en Fernández-Espejo, E. (2000). ¿Cómo funciona el nucleus acumbens?. *Revista de Neurología*, 30(9), 845-849.
- Robinson, M. L., Houtsmuller, E. J., Moolchan, E. T., Pickworth, W. B. (2000). Placebo cigarettes in smoking research. *Experimental and clinical psychopharmacology*, 8(3), 326. Citado en Collins, A. C., Pogun, S., Nesil, T. y Kanit, L. (2012). Oral nicotine self-administration in rodents. *Journal of addiction research & therapy* 2 (4), 1-10
- Rose, J. E. (2006). Nicotine and nonnicotine factors in cigarette addiction. *Psychopharmacology*, 184 (3-4), 274-285. Citado en Collins, A. C., Pogun, S., Nesil, T. y Kanit, L. (2012). Oral nicotine self-administration in rodents. *Journal of addiction research & therapy* 2 (4), 1-10
- Rose, J. E. y Levin, E. D. (1991). Inter-relationships between conditioned and primary reinforcement in the maintenance of cigarette smoking. *British journal of addiction*, 86(5), 605-609. Redolat, R., Carrasco, M. C., Simón, V. M. 1994. Efectos cognitivos de la nicotina y el tabaco en sujetos humanos. *Psicothema*, 6(1), 5-20).
- Rose, J. E., Mukhin, A. G., Lokitz, S. J., Turkington, T. G., Herskovic, J., Behm, F. M., Garg, P. K. (2010). Kinetics of brain nicotine accumulation in dependent and nondependent smokers assessed with PET and cigarettes containing 11C-nicotine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (11), 5190-5195. Citado en Collins, A. C., Pogun, S.,

- Nesil, T. y Kanit, L. (2012). Oral nicotine self-administration in rodents. *Journal of addiction research & therapy* 2 (4), 1-10
- Rosenzweig, M. R. y Bennett, E. L. (1996). Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behavioural brain research*, 78(1), 57-65. Citado Stairs, D. J. y Bardo, M. T. (2010). Neurobehavioral effects of environmental enrichment and drug abuse vulnerability. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92(3), 377-382.
 - Rowell, P. P., Hurst, H. E., Marlowe, C., Bennett, B. D. (1983). Oral administration of nicotine: its uptake and distribution after chronic administration to mice. *Journal of pharmacological methods*, 9(4), 249-261. Citado en Collins, A. C., Pogun, S., Nesil, T. y Kanit, L. (2012). Oral nicotine self-administration in rodents. *Journal of addiction research & therapy* 2 (4), 1-10
 - Saccone, S. F., Hinrichs, A. L., Saccone, N. L., Chase, G. A., Konvicka, K., Madden, P. A., Swan, G. E. (2007). Cholinergic nicotinic receptor genes implicated in a nicotine dependence association study targeting 348 candidate genes with 3713 SNPs. *Human molecular genetics*, 16 (1), 36-49. Citado en Pérez-Rubio, G., Herrera, E. U., Camarena, Á., Reséndiz-Hernández, J. M., Méndez, M., Venegas, A. R., Falfán-Valencia, R. (2011). Visión general de la neurobiología y genética en la adicción a la nicotina. *Neumol Cir Torax*, 70(3), 179-187.
 - Salamone, J. D. (1992). Complex motor and sensorimotor functions of striatal and accumbens dopamine: involvement in instrumental behavior processes. *Psychopharmacology*, 107(2-3), 160-174. Citado en Fernández-Espejo, E. (2000). ¿Cómo funciona el nucleus accumbens?. *Revista de Neurología*, 30(9), 845-849.
 - Samet, J. M. (2002). Los riesgos del tabaquismo activo y pasivo. *salud pública de méxico*, 44, s144-s160.
 - Schultz, W., Apicella, P., Scarnati, E., Ljungberg, T. (1992). Neuronal activity in monkey ventral striatum related to the expectation of reward. *The Journal of Neuroscience*, 12(12), 4595-4610. Citado en Fernández-Espejo, E. (2000). ¿Cómo funciona el nucleus accumbens?. *Revista de Neurología*, 30(9), 845-849.
 - Sharma, G. y Vijayaraghavan, S. (2008). Nicotinic receptors: role in addiction and other disorders of the brain. *Substance abuse: research and treatment*, (1), 81. Pérez-Rubio, G., Herrera, E. U., Camarena, Á., Reséndiz-Hernández, J. M., Méndez, M., Venegas, A. R., Falfán-Valencia, R. (2011). Visión general de la neurobiología y genética en la adicción a la nicotina. *Neumol Cir Torax*, 70 (3), 179-187.
 - Shram, M. J., Funk, D., Li, Z., Lê, A. D. (2006). Periadolescent and adult rats respond differently in tests measuring the rewarding and aversive effects of nicotine. *Psychopharmacology*, 186(2), 201-208. Citado en Pastor, V., Vázquez, P., Corapi, E. y Bernabeu, R. O. (2013). La adicción a la nicotina: vulnerabilidad, epigénesis y modelos animales de estudio. *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento*, 5(2), 61-73.
 - Silva, R., Espinosa, P., Riquelme, R., Sanguinetti, N., González, L., Cruz, G., Renard, G. M., Sotomayor-Zárate, R. (2014). Rol de las hormonas sexuales sobre circuitos dopaminérgicos cerebrales. *Rev. Farmacol. Chile*. 7(1):14

- Solano, S. y Jiménez, C. (2002). Manual de tabaquismo. *Separ, Masson, Barcelona*. Citado en Ruiz, A. M., Gómez, I. R., Rubio, C., Revert, C., Hardisson, A. (2004). Efectos tóxicos del tabaco. *Revista de Toxicología*, 21(2-3), 64-71.
- Soriano, C., Guillazo, G., Redolar, D., Torras, M., Vale, A. (2007). Fundamentos de neurociencia. Editorial UAC. Consultado en línea el 04 de noviembre de 2014 en http://books.google.es/books?id=d8F3gASc8AIC&dq=corteza+prefrontal&hl=es&source=gs_navlinks_s
- Spanagel, R. y Weiss, F. (1999). The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends in neurosciences*, 22(11), 521-527. Citado en Fernández-Espejo, E. (2000). ¿Cómo funciona el nucleus acumbens?. *Revista de Neurología*, 30(9), 845-849.
- Spear, L. P. y Brake, S. C. (1983). Periadolescence: age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. *Developmental psychobiology*, 16(2), 83-109. Citado en Nesil, T., Kanit, L., Collins, A. C., Pogun, S. (2011). Individual differences in oral nicotine intake in rats. *Neuropharmacology*, 61(1), 189-201.
- Stairs, D. J. y Bardo, M. T. (2010). Neurobehavioral effects of environmental enrichment and drug abuse vulnerability. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92(3), 377-382.
- Stratford, T. R. y Kelley, A. E. (1997). GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *The Journal of neuroscience*, 17(11), 4434-4440. Citado en Fernández-Espejo, E. (2000). ¿Cómo funciona el nucleus acumbens?. *Revista de Neurología*, 30(9), 845-849.
- Taioli, E. y Wynder, E. L. (1991). Effect of the age at which smoking begins on frequency of smoking in adulthood. *N Engl J Med*, 325(13), 968-969. Citado en Pastor, V., Vázquez, P., Corapi, E. y Bernabeu, R. O. (2013). La adicción a la nicotina: vulnerabilidad, epigénesis y modelos animales de estudio. *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento*, 5(2), 61-73.
- Thorgeirsson, T. E., Geller, F., Sulem, P., Rafnar, T., Wiste, A., Magnusson, K. P., Stacey, S. N. (2008). A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature*, 452(7187), 638-642. Citado en Pérez-Rubio, G., Herrera, E. U., Camarena, Á., Reséndiz-Hernández, J. M., Méndez, M., Venegas, A. R., Falfán-Valencia, R. (2011). Visión general de la neurobiología y genética en la adicción a la nicotina. *Neumol Cir Torax*, 70(3), 179-187.
- Van Harmelen, A. L., Van Tol, M. J., Van der Wee, N. J., Veltman, D. J., Aleman, A., Spinhoven, P., Elzinga, B. M. (2010). Reduced medial prefrontal cortex volume in adults reporting childhood emotional maltreatment. *Biological psychiatry*, 68(9), 832-838.
- Vázquez, P. E. (2008). Proyecciones de la corteza prefrontal a los núcleos monoaminérgicos del mesencéfalo: vías y receptores implicados. Tesis para obtener el grado de Doctor en Biología por la Universidad de Barcelona. programa de doctorado en neurociencias (Departamento de Biología Celular Patológica, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona).

- Venebra-Muñoz, A. (2010). El enriquecimiento ambiental reduce el consumo de nicotina y la expresión de Δ FosB en ratas Wistar. Tesis para obtener el grado de doctor en neuroetología. Universidad Veracruzana. México.
- Venebra-Muñoz, A., Corona-Morales, A., García-García, F. (2011). Efecto del ambiente enriquecido sobre el consumo de nicotina en la rata wistar. *Universidad y ciencia*, 27(1), 97-102.
- Volkow, N. (2008). Las drogas, el cerebro y el comportamiento. La ciencia de la Adicción. Instituto Nacional sobre el Abuso de Drogas. Citado en Pastor, V., Vázquez, P., Corapi, E. y Bernabeu, R. O. (2013). La adicción a la nicotina: vulnerabilidad, epigénesis y modelos animales de estudio. *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento*, 5(2), 61-73.
- Wilmoth, C. E. y Spear, L. P. (2004). Adolescent and adult rats' aversion to flavors previously paired with nicotine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1021(1), 462-464. Citado en Pastor, V., Vázquez, P., Corapi, E. y Bernabeu, R. O. (2013). La adicción a la nicotina: vulnerabilidad, epigénesis y modelos animales de estudio. *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento*, 5(2), 61-73.
- Young, S. T., Porrino, L. J., Iadarola, M. J. (1991). Cocaine induces striatal c-fos-immunoreactive proteins via dopaminergic D1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(4), 1291-1295. Citado en Nestler, E. J. (2008). Transcriptional mechanisms of addiction: role of Δ FosB. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 363(1507), 3245-3255.
- Zaborszky, L., Alheid, G. F., Beinfeld, M. C., Eiden, L. E., Heimer, L., Palkovits, M. (1985). Cholecystokinin innervation of the ventral striatum: a morphological and radioimmunological study. *Neuroscience*, 14(2), 427-453. Citado en Fernández-Espejo, E. (2000). ¿Cómo funciona el nucleus acumbens?. *Revista de Neurología*, 30(9), 845-849.
- Zaragoza, J. R. y Llanos, M. (1980). Tabaco y salud. Ed. AC. Colección Alfa/Temas. Madrid. PP. 182. Citado en Martín Ruiz, A., Rodríguez Gomez, I., Rubio, C., Revert, C., Hardisson, A. 2004. Efectos toxicos del tabaco. *Revista de toxicología*, 21(2-3), 64-71
- Zhu, J., Apparsundaram, S., Bardo, M. T., Dwoskin, L. P. (2005). Environmental enrichment decreases cell surface expression of the dopamine transporter in rat medial prefrontal cortex. *Journal of neurochemistry*, 93(6), 1434-1443. Citado Stairs, D. J. y Bardo, M. T. (2010). Neurobehavioral effects of environmental enrichment and drug abuse vulnerability. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92(3), 377-382.