



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA

**“INMUNOREACTIVIDAD A Δ FosB EN NAc y CPF EN RATAS
MACHO CRIADAS BAJO ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL Y
AISLAMIENTO CON AUTOCONSUMO Y CONSUMO
INDUCIDO DE NICOTINA”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGA

PRESENTA:

REYNA CASTAÑEDA MARTÍNEZ

DIRECTOR:

DR. ARTURO VENEBRA MUÑOZ



Junio 2016

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

| | |
|--|--|
| 1. INTRODUCCIÓN | |
| 2. ANTECEDENTES | |
| 2.1 NICOTINA..... | |
| 2.2 SISTEMA DE RECOMPENSA..... | |
| 2.2.1 DOPAMINA..... | |
| 2.2.1.1 RECEPTORES DOPAMINERGICOS..... | |
| 2.2.2 SISTEMA DOPAMINÉRGICO..... | |
| 2.3 NÚCLEO ACUMBENS..... | |
| 2.4 ΔFOSB..... | |
| 2.5 CORTEZA PREFRONTAL..... | |
| 2.6 ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL..... | |
| 3. JUSTIFICACIÓN | |
| 4. HIPÓTESIS | |
| 5. OBJETIVOS | |
| 5.1 OBJETIVO GENERAL..... | |
| 5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS..... | |
| 6. MÉTODO | |
| 6.1 EXPERIMENTO 1..... | |
| 6.2 EXPERIMENTO 2..... | |
| 6.3 ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO..... | |
| 6.4 ANÁLISIS ESTADISTICO..... | |
| 7. RESULTADOS | |
| 7.1 AUTOCONSUMO VS CONSUMO INDUCIDO..... | |
| 7.1.1 INMUNOHITOQUÍMICA EN CPF..... | |
| 7.1.2 INMUNOHISTOQUÍMICA EN NAcS..... | |
| 7.1.3 INMUNOHITOQUÍMICA EN NAcC..... | |
| 7.2 COMPARACIÓN ENTRE INDIVIDUOS..... | |
| 8. DISCUSIÓN | |
| 9. CONCLUSIÓN | |
| 10. BIBLIOGRAFÍA | |

“INMUNOREACTIVIDAD A Δ FosB EN NAc y CPF EN RATAS MACHO CRIADAS BAJO ENRIQUECIMIENTO AMBIENTAL Y AISLAMIENTO CON AUTOCONSUMO Y CONSUMO INDUCIDO DE NICOTINA

RESUMEN

Algunos estudios han demostrado que personas con niveles educativos bajos y con factores como la pobreza, el no practicar deporte o el estrés emocional son más vulnerables a desarrollar una adicción por la nicotina, la adicción induce una perturbación crónica en la vía mesolímbica, la cual participa fisiológicamente en la creación de hábitos de conducta tras estímulos reforzadores naturales. Por otra parte se ha observado que la exposición de animales a un Ambiente enriquecido (AE) puede prevenir el consumo de sustancias que producen adicción. El objetivo del presente estudio es evaluar los cambios que se presentan al modificar el ambiente sobre el consumo de nicotina en ratas Wistar mediante la cuantificación de la inmunoreactividad de neuronas en la CPF y NAc. Se utilizaron ratas macho Wistar a los 21 días de edad divididos en 2 grupos; Enriquecido-Aislado (EXP1): mantenidos en AE y posteriormente fueron aislados y grupo Enriquecido (EXP2): las ratas fueron alojadas en AE inyectándoles vía s.c. la misma dosis de nicotina que las del EXP1. Posteriormente se realizó la cuantificación de neuronas positivas a Δ FosB en CPF y NAc. Los resultados de este estudio muestran que el número de neuronas inmunoreactivas a Δ FosB aumentó en CPF, NAcC y NAcS en el EXP 1 con respecto a las ratas del EXP 2. Estos resultados sugieren que el AE tiene un efecto sobre el sistema mesolímbico, ya que los animales tienen una mayor expresión de Δ FosB de manera basal en el sistema, pero ante la exposición de una droga como nicotina esta expresión disminuye, de manera interesante, observamos que al aislar a los animales después de haber crecido bajo un ambiente enriquecido y ante la exposición a la nicotina, al parecer el efecto del AE se pierde.

1. INTRODUCCIÓN

El fumar tabaco es una de las causas más comunes para desarrollar enfermedades como el cáncer de pulmón o los infartos al miocardio. De acuerdo con estadísticas de la Organización Mundial de la Salud, existen alrededor de 650 millones de fumadores en el mundo, lo cual se convierte en un problema grave de salud pública. Tan solo en el 2000, 4.2 millones de personas murieron por causas relacionadas con el tabaco y el número estimado para el 2025 es de 10 millones de muertes, correspondiendo 7 millones a personas que habitan en países en vías de desarrollo (Mackay y Eriksen, 2002). Algunos estudios han demostrado que personas con niveles educativos bajos (menos de 10 años de estudio) son más vulnerables a desarrollar el hábito de fumar y como consecuencia una adicción por la nicotina, sustancia activa del tabaco (Härtel *et al.*, 1993; Setter *et al.*, 1998), que personas con un nivel educativo alto. Se ha sugerido que además del bajo nivel educativo, otros factores como la pobreza, el poco tiempo libre para practicar algún deporte o incluso niveles elevados de estrés emocional pudieran ser factores que favorezcan esta conducta (Härtel *et al.*, 1993).

Se cree que la vía mesolímbica dopaminérgica participa, fisiológicamente, en la creación de hábitos de conducta tras estímulos reforzadores naturales (comida, bebida, sexo). La adicción sería, por tanto, una perturbación crónica de esta vía inducida por la droga, y se crearía un hábito patológico cuyo fin es el consumo de la droga (estímulo reforzador aberrante). La activación de la vía dopaminérgica mesocortical, que también nace en el área tegmental ventral (ATV), ocasiona hiperactividad dopaminérgica en la corteza prefrontal (CPF), cuyo significado no está claro, pero que podría mediar en el proceso de aprendizaje y desarrollo del hábito asociado al consumo (Fernández-Espejo, 2002), es evidente que el ATV desempeña un papel de primer orden en el desarrollo de la adicción y la dependencia.

Por otra parte, se ha comprobado que la actividad física o cognoscitiva dada por un enriquecimiento ambiental (AE) o por el ejercicio producen eventos plásticos en el cerebro, particularmente se aumenta la proliferación y sobrevivencia de nuevas neuronas en regiones como el hipocampo o las regiones sub-ventriculares (Van Praag *et al.*, 2000). El AE es aquel que proporciona a los individuos una mayor estimulación sensorial y se ha observado que facilita un mejor desarrollo del sistema nervioso, ya que se ha documentado que, un AE repercute directamente en parámetros bioquímicos, anatómicos, fisiológicos y moleculares del cerebro y del organismo en general (van Praag *et al.*, 2000, Will *et al.*, 2004), además disminuye las concentraciones de las hormonas de respuesta a estrés como la adrenocorticotropina (ACTH) y corticosterona (CORT), se ha reportado que la exposición de animales a un AE puede prevenir el consumo de sustancias que producen adicción (Bardo *et al.*, 2001). El objetivo del presente estudio es evaluar los cambios que se presentan al modificar dicho ambiente sobre el consumo de nicotina en ratas Wistar mediante la cuantificación de la inmunoreactividad de neuronas en el Núcleo acumbens y la corteza prefrontal.

2. ANTECEDENTES

2.1 Nicotina

La nicotina, es uno de los principales componentes del humo del tabaco y la principal causante de la adicción. La nicotina es constituyente de la planta del tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Fig. 1). (Micó *et al.*, 2000).

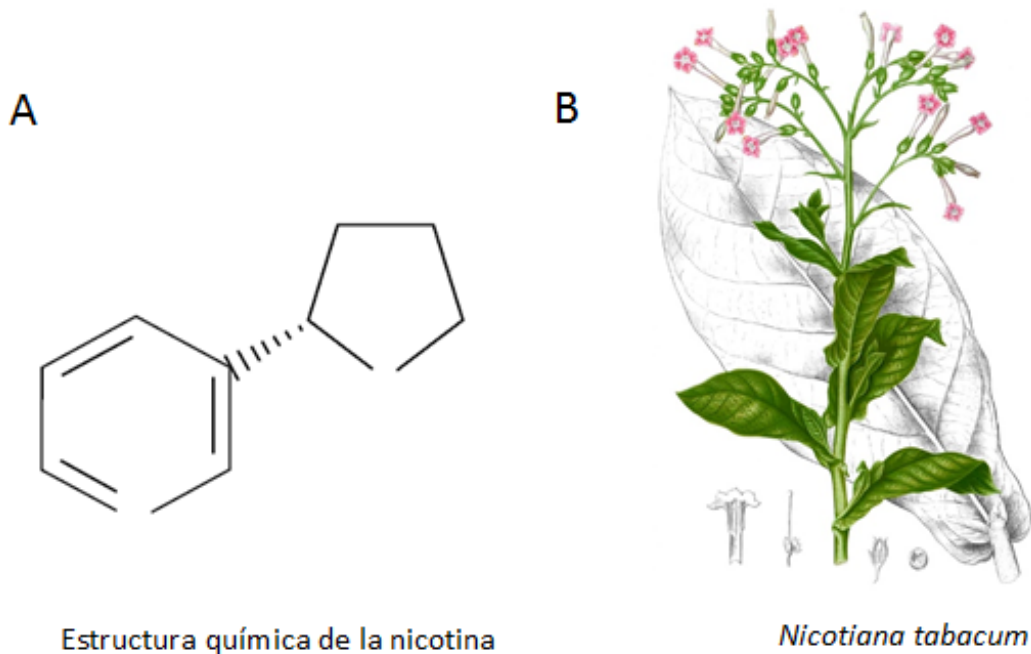


Figura 1. A) Estructura química de la nicotina. B) Ilustración de la planta *Nicotiana tabacum*, el principal componente psicoactivo del tabaco, presente en las hojas de la planta.

La nicotina se une a receptores específicos y produce distintos efectos funcionales, son conocidos como “receptores de tipo muscular” y “receptores de tipo neuronal”, la *acetilcolina* es agonista de los dos tipos de receptores (Micó *et al.*, 2000). Es una de las drogas más consumidas en todo el mundo (World Health Organization, 2010) y se considera que es el principal componente psicoactivo del tabaco, responsable de su poder adictivo y de la alta tasa de recaída que genera (Benowitz, 2010). El síndrome de

abstinencia al consumo de nicotina provoca alteraciones conductuales que pueden ser estudiadas también en los modelos animales, entre las manifestaciones más notorias de la privación de la nicotina se encuentran: la irritabilidad, los problemas de sueño, las náuseas, los estados depresivos y la ansiedad (Bruijnzeel, 2012), hoy en día, se sabe que el efecto adictivo de la nicotina es mediado fundamentalmente por la activación de receptores colinérgicos nicotínicos (nAChRs) en las neuronas dopaminérgicas del ATV y otras estructuras cerebrales (Changeux, 2010). Es un alcaloide altamente tóxico y fumarlo produce en el cerebro que se den altas concentraciones de forma rápida, se absorbe en el pulmón, entre un 79 y un 90 %, entra en la circulación arterial, llega hasta el cerebro en segundos, donde ejerce su acción psicoactiva (Benowitz, 2010), es metabolizada en el hígado, principalmente por las enzimas CYP2A6, CYP2B6 y CYP2E1 presentes en los adipocitos hepatocitos? (Benowitz, *et al.*, 2006), en sangre, la vida media de la nicotina es de 2 a 3 horas a dosis altas genera malestar y náuseas (Benowitz *et al.*, 2008).

Se ha observado 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, al fumar, por ejemplo, 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). Una vez en el cerebro actúa activando a los receptores neuronales nicotínicos. Los nAChRs son canales catiónicos, permeables a Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , en cuanto a su estructura molecular, están compuestos por 5 subunidades, hasta el momento, se conocen diez subunidades α ($\alpha 1$ - $\alpha 10$), tres subunidades β ($\beta 2$ - $\beta 4$), una γ y una δ ., de la combinación de estas subunidades surgen los distintos tipos de receptores, cada uno con características particulares (Changeux, 2010). Los nAChRs se expresan en todo el sistema nervioso, tanto central como periférico, razón por la cual el efecto de esta droga se ejerce no sólo en el cerebro, sino también en las fibras musculares lisas del intestino (sistema nervioso entérico) y en el sistema nervioso autónomo (Barik y Wonnacott, 2009). No existe acuerdo con respecto a la existencia de alguna subunidad

que se encuentre más estrechamente relacionada con el proceso adictivo (Changeux, 2010), sin embargo, los más abundantes en el sistema nervioso son los compuestos por las $\alpha 4$ y $\beta 2$ y los formados solamente por subunidades $\alpha 7$, estos últimos participan en los procesos de aprendizaje y memoria (Huerta y Cruz, 2011).

En el cerebro, la nicotina despolariza las neuronas del área tegmental ventral (ATV) que tienen altas concentraciones de receptores $\alpha 4\beta 2$, por lo cual facilita la liberación de varios neurotransmisores, entre ellos y de manera relevante la dopamina (Benowitz, 2008). Llamativamente, la nicotina no produce ningún gran cambio observable a nivel conductual cuando se la consume, comparándola con otras drogas de abuso, esto también es evidente en los modelos animales, aparentemente, quizá por este motivo el número de laboratorios en el mundo que trabajan a nivel comportamental con nicotina es muy reducido, en comparación con lo que ocurre con otras drogas de abuso como la cocaína y la anfetamina (Pastor *et al.*, 2013).

2.2 Sistema de recompensa

2.2.1 Dopamina

Las catecolaminas; dopamina, adrenalina y noradrenalina actúan como mensajeros químicos en el sistema nervioso de los mamíferos, y la primera (Fig. 2) es el transmisor catecolaminérgico más importante del SNC, donde participa en una gran variedad de funciones que incluyen la actividad locomotora, la afectividad, la regulación neuroendócrina y la ingestión de agua y alimentos (Fibiger, 1993; Jackson, 1994). En el sistema nervioso periférico, la dopamina es un modulador de la función cardíaca y renal, del tono vascular y de la motilidad gastrointestinal (Bahena-Trujillo, 2000). La función de los sistemas dopaminérgicos del SNC se ha convertido en foco de gran interés, debido a que diversas alteraciones en la transmisión dopaminérgica han sido relacionadas directa o indirectamente con trastornos severos del SNC, tales como la enfermedad de Parkinson, trastornos psicóticos que incluyen a la esquizofrenia y la dependencia a drogas como la anfetamina y la cocaína (Feldman *et al.*, 1997; Robbins-Trevor, 1992).

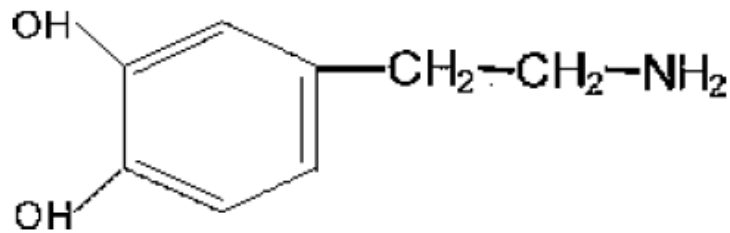


Figura 2. Estructura química de la dopamina (3,4-dihidroxifeniletilamina).

La síntesis del neurotransmisor tiene lugar en las terminales nerviosas dopaminérgicas donde se encuentran en alta concentración las enzimas responsables, la tirosina hidroxilasa (TH) y la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos o L-DOPA descarboxilasa (Cooper *et al.*, 1996; Freund *et al.*, 1984). Los trabajos de Nagatsu y cols., y de Levitt y cols., demostraron que la hidroxilación del aminoácido L-tirosina es el punto de regulación de la síntesis de catecolaminas en el SNC y que en consecuencia la TH es la enzima limitante de la síntesis de la dopamina, la noradrenalina y la adrenalina (Nagatsu *et al.*, 1964; Levitt *et al.*, 1965). La TH es un péptido de 498 aminoácidos (56 KDa) presente de manera predominante en la fracción citosólica de las terminales catecolaminérgicas (Weiner y Molinoff, 1989). La enzima es una oxidasa que utiliza L-tirosina y oxígeno como sustratos y tetrahidrobiopterina (BH4) como cofactor para adicionar un grupo hidroxilo al aminoácido para formar L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina) como se esquematiza en la figura 3 (Nagatsu, 1981). La función de la TH requiere también de la presencia de hierro. El neurotransmisor es sintetizado en las terminales dopaminérgicas de donde puede ser liberado directamente al espacio sináptico (Fig. 4), una vez transportadas a la zona activa las vesículas se fijan a la membrana (anclaje o “docking”), donde experimentan un proceso que las hace competentes para la exocitosis (maduración o “priming”) (Bahena-Trujillo, 2000).

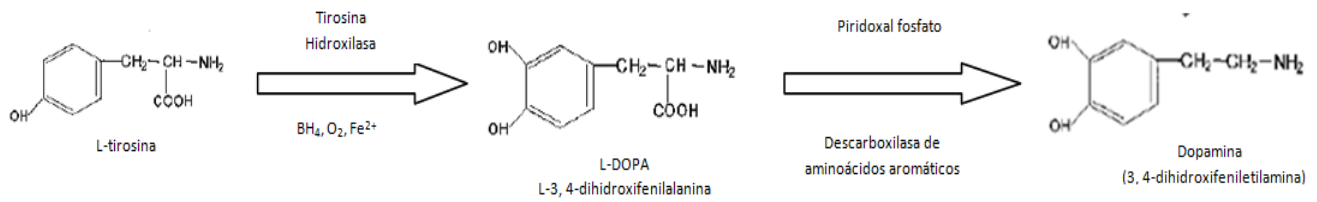


Figura 3. Síntesis de la dopamina. Tomada de Bahena-Trujillo, 2000.

Se ha observado que la dopamina que se libera de manera preferente en respuesta a estimulación sináptica es la recién sintetizada. El neurotransmisor parece así encontrarse en dos pozas metabólicas, ambas vesiculares; una que contiene a la dopamina recién sintetizada y una segunda que correspondería a una poza que funciona como almacén, es probable la existencia de una tercera poza metabólica abastecida por los transportadores y que sería la fuente de la liberación de dopamina por transporte reverso (Feldman *et al.*, 1997; Leviel *et al.*, 1989).

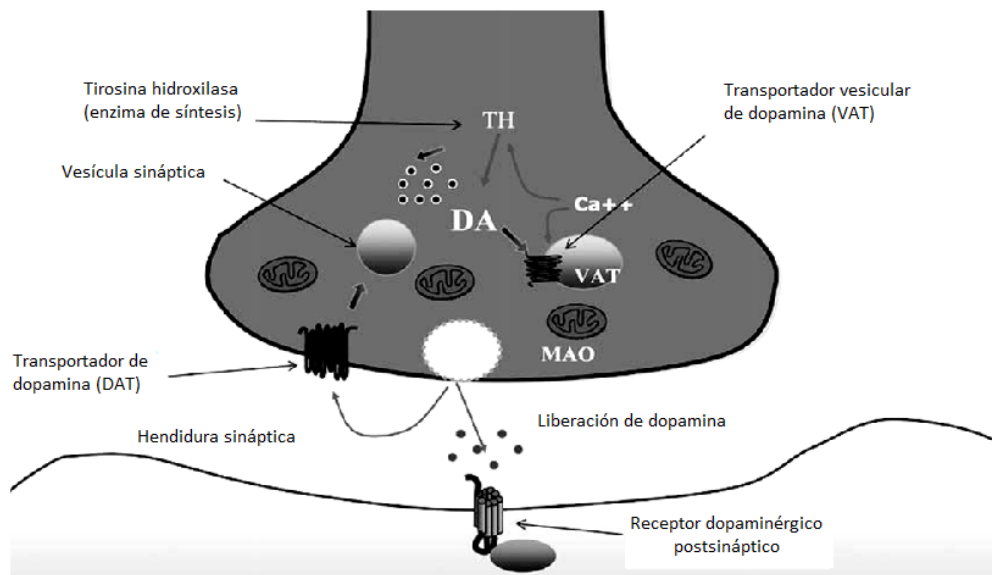


Figura 4. Sinapsis dopaminérgica, en esta figura se puede observar.....describe un poco...Tomada de....

2.2.1.1 Receptores dopaminérgicos

Los receptores se definen como moléculas o arreglos moleculares que pueden reconocer selectivamente a un ligando (agonista o antagonista) y ser activados por el ligando con eficacia intrínseca (agonista) para iniciar un evento celular (Humphrey, 1997). La acción de la dopamina sobre las células blanco depende del tipo de receptor presente en ellas, con base en sus características moleculares se han descrito 5 subtipos de receptores para dopamina, los cuales han sido agrupados en 2 familias farmacológicas denominadas D1 y D2, a partir de los efectos de agonistas y antagonistas selectivos. De manera característica los receptores de la familia D1 estimulan a la enzima adenilil ciclasa conduciendo a la producción de AMPc, en tanto que la activación de los receptores pertenecientes a la familia D2 inhibe su formación (Zhou *et al.*, 1990; Sibley *et al.*, 1982). Los receptores dopaminérgicos D1 desempeñan un papel crucial en el desarrollo de la adicción y se han relacionado con la sensibilización inducida por el consumo crónico de drogas, en especial por los psicoestimulantes. Por otra parte, la sensibilización inducida por el consumo crónico de la droga se ha asociado a un aumento de la respuesta de los receptores D1, que persiste durante un mes después del inicio de la abstinencia (Henry *et al.*, 1998). Tanto la regulación al alza de D1 como el incremento de la respuesta de este receptor desempeñan un papel importante en la sensibilización dopaminérgica inducida por el consumo crónico de drogas de abuso (Corominas *et al.*, 2007).

Uno de los parámetros más estudiados en la adicción a sustancias es la densidad de receptores dopaminérgicos de la familia D2; sin embargo, los datos existentes en la literatura científica son a veces contradictorios. En roedores, se ha descrito un aumento de los receptores D2 que implica tanto al núcleo acumbens (NAc) como al estriado dorsal, el aumento en la densidad de D2 se ha observado tras la interrupción de la administración repetida de cocaína (Wallace *et al.*, 1996), alcohol (Djouma y Lawrance, 2002) y opiáceos (Izenwasser *et al.*, 1998). Sin embargo, otros trabajos aportan datos que no son coincidentes con los anteriores, ya que no han hallado cambios en la densidad de los receptores dopaminérgicos después de la administración repetida de drogas de abuso e

incluso, otros han descrito una disminución de la densidad de estos receptores en la región del estriado (Vasconcelos *et al.*, 2003). Recientemente se ha relacionado un subtipo de receptores de la familia D2, los receptores D3, con la sensibilización dopaminérgica asociada a la administración repetida de estimulantes (Corominas *et al.*, 2007). Los receptores D3 están presentes normalmente en el *shell* del NAc, pero no lo están o se expresan muy poco en el *core* del NAc y en las regiones dorsales del estriado. En roedores a los que se ha lesionado unilateralmente la vía nigroestriada, se ha registrado un aumento de los receptores D3 tras la administración repetida de agonistas dopaminérgicos, que se asocia a un aumento de la actividad motora. El aumento de D3 se produce precisamente en regiones del estriado dorsal y en el *core* del NAc, donde D3 está normalmente ausente (Bordet *et al.*, 1997). Actualmente se conoce que la expresión de los receptores D3 depende del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y se ha sugerido que este receptor podría ser, en parte, responsable de la sensibilización dopaminérgica y de los síntomas de tipo psicótico, inducidos en algunos individuos, por el consumo de psicoestimulantes (Sokoloff *et al.*, 2002).

2.2.2 Sistema dopaminérgico

Se cree que la vía mesolímbica dopaminérgica participa, fisiológicamente, en la creación de hábitos de conducta tras estímulos reforzadores naturales (comida, bebida, sexo), la adicción sería, por tanto, una perturbación crónica de esta vía inducida por la droga, y se crearía un hábito patológico cuyo fin es el consumo de la droga (estímulo reforzador aberrante). La activación de la vía dopaminérgica mesocortical, que también nace en el ATV ocasiona hiperactividad dopaminérgica en la corteza prefrontal, cuyo significado no está claro, pero que podría mediar en el proceso de aprendizaje y desarrollo del hábito asociado al consumo. Es evidente que el ATV desempeña un papel de primer orden en el desarrollo de la adicción y la dependencia (Fernández-Espejo, 2002).

Como una simple aproximación, se puede decir que las drogas producen adicción mediante la estimulación de esta vía de la recompensa (Schutz, 2011), al estimularla

produce placer en un principio, pero también induce un desequilibrio en un sistema que normalmente está equilibrado o en homeostasis. Ciertos cambios generados por las drogas pueden ser reversibles (Chen *et al.*, 2010) aunque, en algunos casos, las drogas de abuso inducen alteraciones persistentes (Goriounova y Mansvelder, 2012).

El componente central de este circuito de recompensa es el sistema mesolímbico dopaminérgico, que consta de una serie de neuronas que se originan en el ATV y que envían proyecciones a otras regiones frontales del cerebro como el NAc y la corteza prefrontal (CPF) (Koob y Volkow, 2010). Estas conexiones son mayoritariamente dopaminérgicas, pero también se hallan neuronas inhibitorias GABAérgicas que participan de esta vía modulando la actividad neuronal (Fig. 5) (Barrot *et al.* 2012), estas neuronas GABAérgicas son moduladas, además, por neuronas opiáceas que expresan el receptor μ -tienen la capacidad de inhibir a las neuronas GABAérgicas (que son inhibitorias) generando una activación del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico cuando son estimuladas-, lo que explica la activación opiáceo-dependiente del sistema (Xiao, *et al.*, 2007). Las proyecciones dopaminérgicas que van desde el ATV al NAc son críticas en la adicción. Se ha observado que animales con lesiones en este circuito presentan desinterés por las drogas de abuso (Arvanitogiannis *et al.*, 1996). El ATV envía información a las otras estructuras acerca del grado de recompensa asociada a un estímulo determinado. Resulta llamativo, sin embargo, que todas las drogas de abuso (activando la misma vía de la recompensa) puedan generar efectos conductuales tan diferentes (el alcohol y la cocaína, por ejemplo). Posiblemente, estas diferencias se deban a que las drogas de abuso no restringen su efecto solamente a la vía de la recompensa, sino que también activan otras estructuras cerebrales. Entre las estructuras modulatorias de la vía de la recompensa más estudiadas se encuentran, la amígdala y el hipocampo (Koob y Volkow, 2010). La amígdala se activa diferencialmente en una situación placentera o en una aversiva, aportando información para determinar si una acción será repetida o evitada (Johansen *et al.*, 2011). El hipocampo es una estructura central en la formación de memorias (Andersen *et al.*, 2007). Las regiones de la corteza cerebral coordinan, integran, y procesan toda la

información sensorial y motora, lo cual determinará el comportamiento general del individuo (Xue *et al.*, 2009).

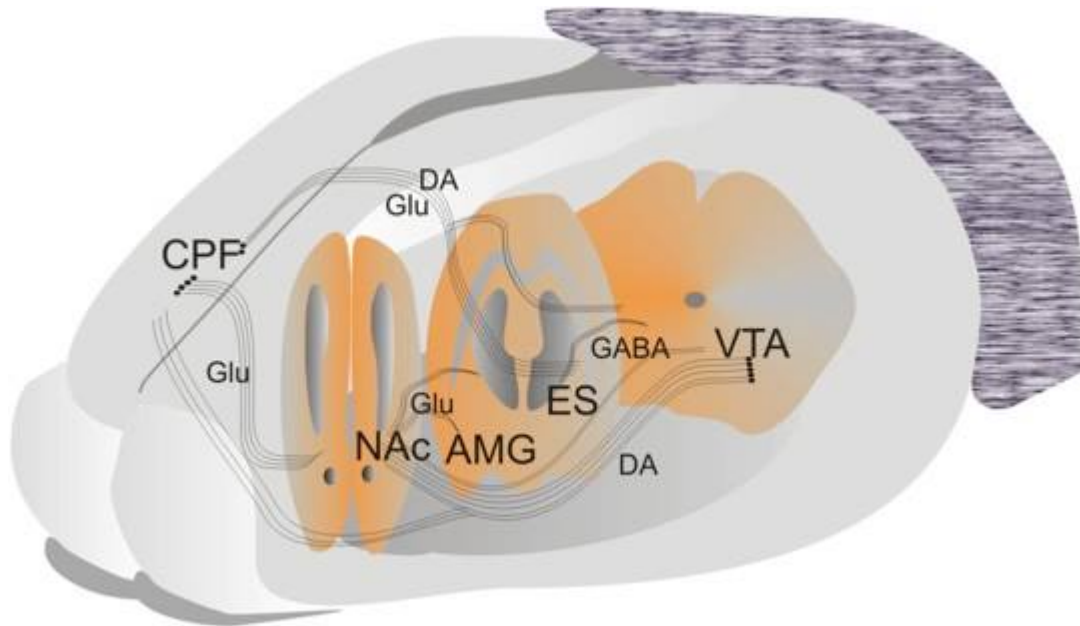


Figura 5. Sistema dopaminérgico de la recompensa. La imagen muestra las proyecciones que existen entre las diferentes regiones cerebrales, esta vía nace en el área tegmental ventral (ATV) y manda fibras tanto al núcleo accumbens (NAC) y la corteza prefrontal (CPF), el NAC tiene conexiones con el estriado (ES) y con la amígdala (AMG). La corteza prefrontal (CPF) envía proyecciones hacia el NAC y el ATV. La dopamina (DA) es el neurotransmisor más importante en esta vía que es crítica en el proceso adictivo a las drogas. Glutamato (Glu), ácido gama-aminobutírico (GABA). Tomada de Venebra-Muñoz, 2010.

El uso continuado de drogas induce cambios adaptativos en el sistema nervioso central, lo que conduce a fenómenos como la tolerancia, la dependencia física, la sensibilización, el craving y la recaída (Robinson y Berridge, 2008).

En animales de experimentación y estudios *post mortem* del cerebro de adictos a opiáceos, se ha detectado que el consumo crónico se suele acompañar de una disminución del número de receptores celulares que responden a la droga (tras su

internalización) en las neuronas de la vía mesolímbica, y no hay aumento del AMPc en centros neurales como el NAc o la amígdala, al contrario de lo que sucede en la fase de consumo agudo. Estos efectos representan fenómenos de neuroadaptación. Sin embargo, los componentes intracelulares de la vía de señalización de la adenilciclasa se regulan al alza: se detecta un aumento en los niveles de proteincinasa A (PKA) y de factores de transcripción CREB (*cAMP response element-binding protein*), Fra1, Fra2 y delta-FosB, tres factores de transcripción de la familia Fos (Shippenberg y Elmer, 1998). Se cree que la mayor concentración de PKA podría deberse a un déficit en su degradación, pues el AMPc no se encuentra regulado al alza. La mayoría de los factores comentados se regulan al alza de modo transitorio, por lo que su papel en los cambios crónicos asociados a la adicción se ha cuestionado, excepto el factor delta-FosB, que se acumula progresivamente en el cerebro con el consumo repetido de la droga (Fernández- Espejo, 2002).

2.3 Núcleo acumbens

Se ha involucrado clásicamente en la integración entre motivación y acción motora (interface límbico-motora) (Mogenson *et al.*, 1980). Numerosos estudios neurobiológicos han resaltado su destacado papel en la emergencia de respuestas motoras tras estímulos tanto apetitivos como aversivos, y se sabe que participa en procesos diversos como la ingesta, la conducta sexual, la recompensa, la autoadministración de drogas, respuesta al estrés, etc. (Groenewegen *et al.*, 1996; Schutz *et al.*, 1992). Además su participación en algunos de estos procesos depende del estado motivacional, pues media de forma decisiva en ciertas conductas apetitivas (ingesta, sexual) solo si es novedosa o si se está privando de ella (hambriento, sediento, en celo) (Wilson *et al.*, 1995; Bassareo y Di, 1997). 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).

Una rápida observación de la estructura anatómica del NAc nos indica que su función más probable es la de integración límbico-motora. Se distinguen dos estructuras diferentes tanto en sus conexiones como neuroquímicamente: el core (centro) y la shell (corteza) (Herkenham *et al.*, 1984; Jongen-Rêlo *et al.*, 1994). La shell presenta conexiones de carácter “límbico”: recibe importantes entradas glutamatérgicas desde el hipocampo y la amígdala centromedial, así como dopaminérgicas desde el ATV. El core?? Es una extensión del estriado dorsal, de carácter motor: recibe aferencias glutamatérgicas de la corteza motora y dopaminérgicas de la sustancia negra, y presenta conexiones GABAérgicas de salida hacia el pálido ventral que forman parte de los bucles motores córtico-estriado-pálido-talámicos de carácter extrapiramidal. La shell recibe aferencias de la corteza prefrontal (infralímbica y prelímbica ventral), la información de salida de la shell se dirige al pálido ventromedial, el cual inerva el núcleo dorsomedial del tálamo. Este núcleo envía de modo casi específico, fibras hacia la corteza prefrontal (prelímbica dorsal), la cual a su vez, proyecta fibras glutamatérgicas al core del núcleo acumbens (Heimer *et al.*, 1991; Meredith *et al.*, 1992; Fig. 6). Asimismo, el NAc recibe una importante entrada moduladora, tanto dopaminérgica como serotoninérgica, que parece desempeñar un papel relevante en el control del flujo de información (Johansson y Hokfelt, 1992). Dicha inervación moduladora se encuentra también segregada. La shell recibe aferencias dopaminérgicas del ATV y serotoninérgicas del rafe dorsal. El core recibe aferencias dopaminérgicas principalmente de la sustancia negra y serotoninérgica del rafe dorsal. Se cree que el proceso de integración límbico-motora tiene lugar principalmente en la shell, el cual modificaría los patrones de actividad motora del core, a través de la corteza prefrontal que actúa como “enlace” entre las dos estructuras. La segregación entre los circuitos que conectan core y shell aun no es tan clara, ya que existen zonas de interacción. Así ocurre dentro de la propia corteza prefrontal y entre las estructuras del núcleo acumbens, donde fibras colaterales y *gap junctions* conectan el core y la shell. Además, tanto el core como la corteza prefrontal reciben aferencias de origen amigdalino y del ATV (O’ Donnell y Grace, 1993).

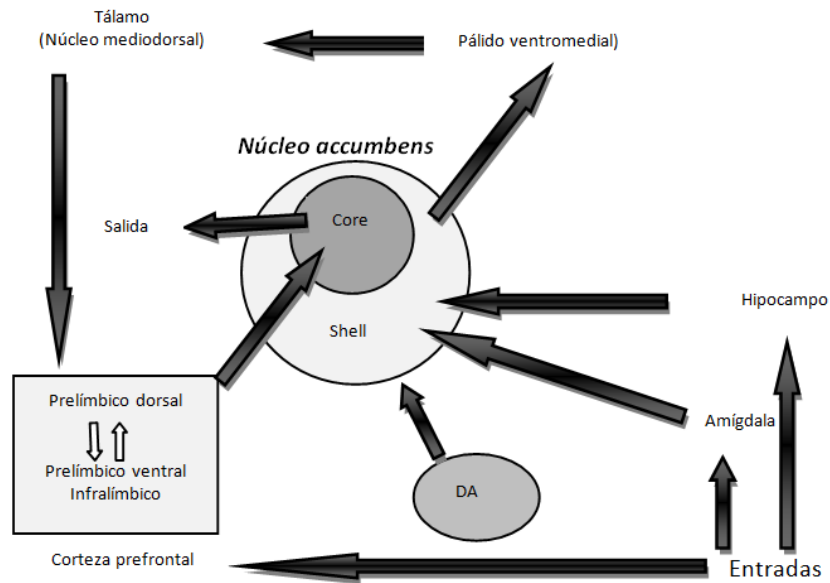


Figura 6. Diagrama esquemático de los circuitos que conectan los territorios core y shell del núcleo accumbens. La aferencia dopaminérgica (DA) procede principalmente del área tegmental ventral, aunque la sustancia negra también proyecta al core. La interacción entre áreas se identifica con doble flecha. Tomada de Fernández-Espejo, 2000.

Las neuronas de la shell del acumbens presentan dos estados electrofisiológicos bajo y alto (O' Donnell y Grace, 1995; 1998). El estado bajo, muy hiperpolarizado (-81 mV), es interrumpido ocasionalmente por mesetas de despolarización de unos -63 mV con 3-4 espigas, o estado alto (Fig. 7) (Fernández-Espejo, 2000). La inervación dopaminérgica procedente del ATV, a través del haz mesolímbico, ejerce efectos moduladores sobre la actividad neuronal en la shell del núcleo accumbens. De acuerdo con el grupo de O' Donnell y Grace, existe una gran cantidad de receptores dopaminérgicos D1 en la shell los cuales actúan como excitadores, en cooperación con los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) del glutamato, pero sólo en condiciones de estado alto (-63mV) (O' Donnell y Grace, 1995). Así, cuando la neurona se encuentra en estado bajo (-81mV), los receptores glutamatérgicos NMDA están bloqueados por Mg^{2+} y no hay interacción D1-NMDA, por lo que predomina la acción dopaminérgica D2 quienes disminuyen la probabilidad de aparición de potenciales de acción tras la estimulación corticofrontal. Cuando la célula se sitúa en estado alto, tras una despolarización mantenida se remueve el bloqueo con Mg^{2+}

y se activan los canales NMDA., de este modo, las respuestas despolarizantes de los canales NMDA se expresan y facilitan el disparo neuronal. En esta situación, la dopamina actúa sobre receptores D1 activando aún más la apertura de canales NMDA y la de canales de Ca^{2+} tipo L, lo que mantiene la excitación de las neuronas de la shell (Hernández-López *et al.*, 1997). En definitiva la dopamina estabiliza la célula en el estado alto y facilita la génesis de potenciales de acción. Puede decirse que la dopamina actúa en la shell como un “neuro-estabilizador”, o se estabiliza la célula en el estado en el que se encuentre, sea bajo o alto (Fernández-Espejo, 2000).

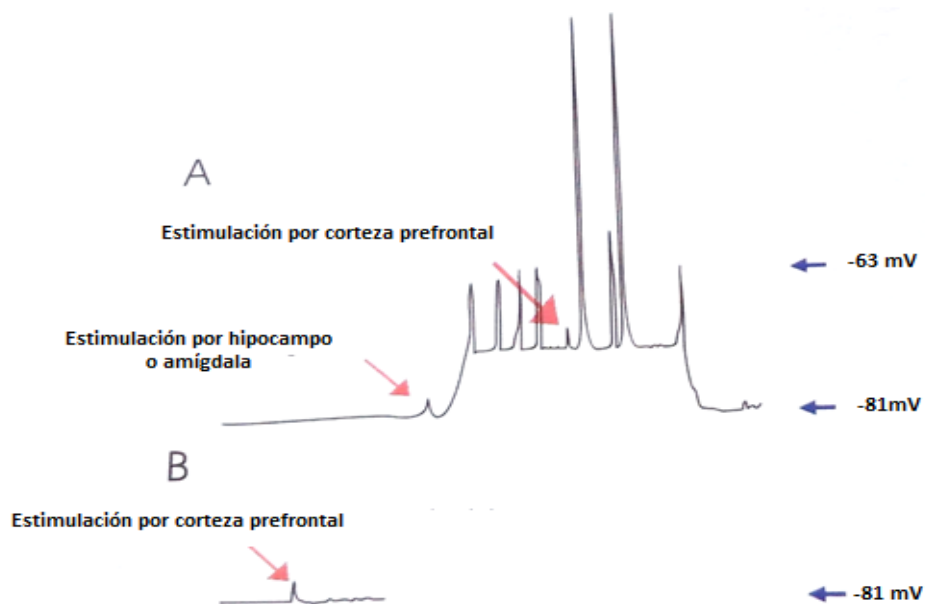


Figura 7. Activación de neuronas en el Núcleo acumbens shell. Esquema del mecanismo de activación de las neuronas en el NAc shell (NAcS), cuando existe estimulación por fibras provenientes del hipocampo o de la amígdala que hacen pasar a las neuronas de la shell de un estado bajo (-81 mV) al alto (-63 mV), si además existe estimulación durante el estado alto por parte de la CPF, entonces se dispara un potencial de acción como se observa en el panel A. Cuando existe estimulación únicamente de la CPF no se genera el paso del estado bajo al alto en las neuronas de la región shell, como se observa en el panel. (Tomada y modificada de Venebra-Muñoz, 2010).

Diversos autores mencionan que la dopamina facilita la programación a nivel del núcleo acumbens de adecuadas relaciones límbico-motoras y “consolida” el conjunto de neuronas que están activadas por las entradas prefrontocorticales, amigdalinas e

hipocámpicas en un determinado momento e “ignora” las no activadas, estabilizando los ensambles neuronales que se encuentran en un estado electrofisiológico alto. De manera parecida también se reforzarían conexiones entre la CPF y la región del core en la programación de conductas motoras asociadas a estímulos como la ingesta de drogas, ya que existe una correlación muy clara entre la actividad neuronal en la región core y las conductas motoras que se realizan para consumir una droga. Los movimientos para el consumo de drogas se programa en la región core y en la CPF, además de existir correlaciones ante fenómenos como la anticipación al consumo de la droga o memoria a largo plazo (Fernández-Espejo, 2000). Concretamente los actos motores que son programados en el core y la CPF son de tipo instrumental, son secuencias de movimientos dirigidos a un fin, en este caso el consumo de drogas (Venebra-Muñoz, 2010).

2.4 ΔFOS B

El estudio de mecanismos de transcripción de la adicción está basado en la hipótesis de que la regulación de la expresión génica es uno de los mecanismos importantes por el cual la exposición crónica a una droga causa a largo plazo cambios en el cerebro, que subyacen a las alteraciones conductuales que definen un estado de adicción (Nestler *et al.* 2001). Una conclusión de esta hipótesis es que los cambios inducidos por las drogas en la transmisión dopaminérgica y glutamatérgica y en la morfología de ciertos tipos de neuronas en el cerebro, lo cuál ha sido correlacionado con un estado de adicción, son mediados en parte, a cambios en la expresión de genes (Nestler, 2008). En los últimos 15 años se han proporcionado más pruebas para explicar el papel de la expresión génica en la adicción a las drogas, ya que varios factores de transcripción -proteínas que se unen a elementos de respuesta específica en las regiones promotoras de genes objetivo y regulan esta expresión de genes- han sido implicados en la adicción de la droga. Un ejemplo incluye a ΔFos (una proteína de la familia Fos) (O'Donovan *et al.*, 1999; Green *et al.*, 2008). Estas proteínas son inducidas rápidamente en regiones específicas del cerebro después de la administración aguda de muchas drogas. ΔFosB es codificado por el gen *FosB*, carece de una porción del dominio carboxilo terminal (C-terminal), presente en otras proteínas de la

familia Fos (Nestler *et al.*, 2001), esta característica hace que persista más tiempo en las neuronas en comparación a los otros factores de transcripción de la familia Fos (Nestler, 2008). Se ha observado que Δ FosB se acumula con la exposición crónica de la droga debido a su extraordinaria larga vida-media (Fig. 8). Como resultado de esta estabilidad, Δ FosB persiste en neuronas por lo menos varias semanas después del cese de la exposición de la droga (Ulery *et al.*, 2006; Carle *et al.*, 2007). Por lo que es un marcador idóneo para los estudios que implican drogas de adicción (Nestler, 2008).

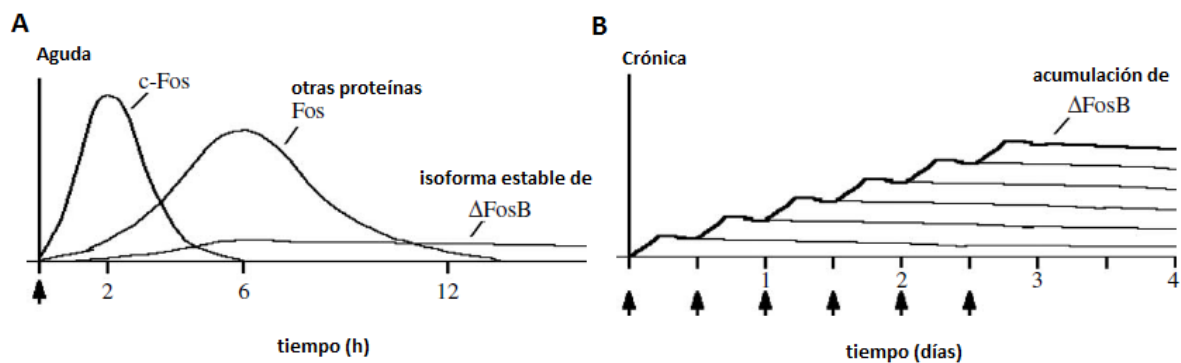


Figura 8. Gráfica de la acumulación gradual de Δ FosB. El Esquema muestra la acumulación gradual de Δ FosB contra la rápida inducción transitoria de otras proteínas de la familia Fos en respuesta a las drogas. (A) varias oleadas de proteínas de la familia Fos (c-Fos, FosB, Δ FosB (33 kD isoforma), Fra1 y Fra2) son inducidas en el núcleo acumbens y en neuronas del estriado dorsal por la administración aguda de una droga. También son inducidas las isoformas bioquímicamente modificadas de Δ FosB (35-37 kD); inducidas a bajos niveles por la administración aguda, pero persisten en el cerebro por largos periodos debido a su estabilidad. (B) Con repetida administración de la droga (ejem., 2 veces al día), cada estímulo agudo induce un nivel bajo de la isoforma estable Δ FosB, que está indicado por el conjunto inferior de líneas sobrepuestas que indican que Δ FosB es inducido por cada estímulo agudo. Este resultado es un incremento gradual en los niveles totales de Δ FosB con estímulos repetidos durante un curso de tratamiento crónico, el cual está indicado por el incremento de la línea escalonada en la gráfica (Nestler, 2008).

La estabilidad de Δ FosB proporciona un mecanismo molecular novedoso por el cual los cambios inducidos por la droga en la expresión génica persisten a pesar de la abstinencia.

Por lo que se ha propuesto que Δ FosB funciona como un “interruptor molecular” que ayuda a iniciar y mantener el estado de adicción (Nestler, 2008).

2.5 Corteza prefrontal

Si bien las funciones ejecutivas (FE) pueden estudiarse desde una aproximación puramente funcional, considerar su sustrato anatómico proporciona valiosa información respecto a su organización y funcionamiento. En términos anatómicos, la corteza prefrontal (CPF) ocupa un lugar privilegiado para orquestar las FE, puesto que es la región cerebral de integración por excelencia, gracias a la información que envía y recibe de todos los sistemas sensoriales y motores (Munakata *et al.*, 2004). La CPF comprende casi 30% del total de la corteza en humanos y es considerada como un área de asociación, es decir, integra la información proveniente de otras regiones. Esta área representa la estructura neocortical más desarrollada en los seres humanos y se localiza en las superficies lateral, medial e inferior del lóbulo frontal. Se divide en tres regiones: corteza prefrontal dorsolateral (CPF_{DL}), corteza prefrontal medial (CPF_M) y corteza orbitofrontal (COF) (Fuster, 2002).

Aparte de los fenómenos de plasticidad sináptica, las drogas producen una señal dopaminérgica excesiva y distorsionada en la corteza prefrontal, concretamente en la región orbito-frontal, zona donde se integra la información emocional y motivacional. Se ha hipotetizado que esta distorsión producida por las drogas modifica el control de los comportamientos produciendo adaptaciones patológicas como la sobrevaloración del valor de las drogas frente a otros estímulos. Se ha observado en animales de experimentación que la destrucción de la corteza prefrontal facilita la búsqueda compulsiva de la droga (Weissenborn *et al.*, 1997). Además, en adictos a la cocaína y anfetaminas existe una hipoactividad prefrontocortical (Volkow y Fowler, 2000). Por lo tanto, la corteza prefrontal juega un papel decisivo tanto en la formación de hábitos patológicos en el adicto, debido a una interacción con el estriado dorsal que generaría

hábitos de consumo anómalos, como en el mantenimiento de los mismos (Hyman *et al.*, 2001).

2.6 Enriquecimiento ambiental

Por otra parte se ha reportado que el enriquecimiento sensorio-motor del lugar donde los animales crecen (ambiente enriquecido) produce efectos sobre la citoarquitectura y neuroquímica del sistema nervioso (Venebra-Muñoz *et al.*, 2011).

Al final de los años 40s, Donald Hebb fue el primero en proponer al enriquecimiento ambiental como un concepto experimental. Él reportó anecdóticamente que las ratas que se llevó a su casa como mascotas mostraron mejor comportamiento con relación a sus congéneres que fueron mantenidos en el laboratorio (van Praag *et al.*, 2000). Hebb, colocó un grupo de ratas en cajas estándar de laboratorio y otro grupos de animales en cajas para mascotas, el grupo de ratas que crecieron en las cajas para mascotas ejecutaron una tarea de aprendizaje en menor tiempo que las ratas que crecieron en cajas estándar de laboratorio (Hebb, 1947). Las primeras evidencias de que la estimulación ambiental pudiera tener efectos benéficos en trastornos del sistema nervioso central se obtuvieron en modelos de la enfermedad de Huntington en ratones transgénicos. En este estudio inicial se encontró que el enriquecimiento ambiental retrasaba el inicio de la enfermedad de Huntington. Posterior a éste, se desarrollaron una amplia gama de estudios donde se evaluó el efecto del enriquecimiento en otros modelos animales de trastornos cerebrales (Renoir *et al.*, 2012). Estudios subsecuentes indicaron que los tamaños de las cajas donde los animales crecieron y la presencia de objetos tales como túneles, corredores y planos inclinados facilitando su movilidad, está relacionado al comportamiento de la rata en la edad adulta (Bingham y Griffiths, 1952). Rosenzweig *et al.*, 1962, indicaron que el enriquecimiento en el que los animales crecen y se desarrollan produce cambios bioquímicos y morfológicos en el cerebro, lo que ayudo a crear el concepto de

“enriquecimiento ambiental” (AE) como un método para inducir cambios mensurables en el cerebro expuesto de la rata (Rosenzweig *et al.*, 1962).

Estudios en su mayoría de laboratorio usan roedores como modelo animal ideal, criados y distribuidos bajo condiciones de laboratorio de acuerdo a su espacio vital y peso, también se ha observado que el asilamiento reduce recaptación de dopamina y serotonina en CPF y NAc e induce incremento en la actividad locomotora y sobresaltos (Konkle *et al.*, 2010). El aumento en la estimulación sensorial mediante el incremento en la interacción social y ambiental (sensorial-motor) es un AE que se logra mediante la colocación de 6-8 animales en cajas con dimensiones más grandes que las cajas estándar y colocando juegos, túneles, materiales para la construcción de madrigueras, colocar comida en diferentes lugares así como ruedas para ejercitarse voluntariamente (Nithianantharajah y Hanna, 2006; Patel, 2012. Fig. 9).

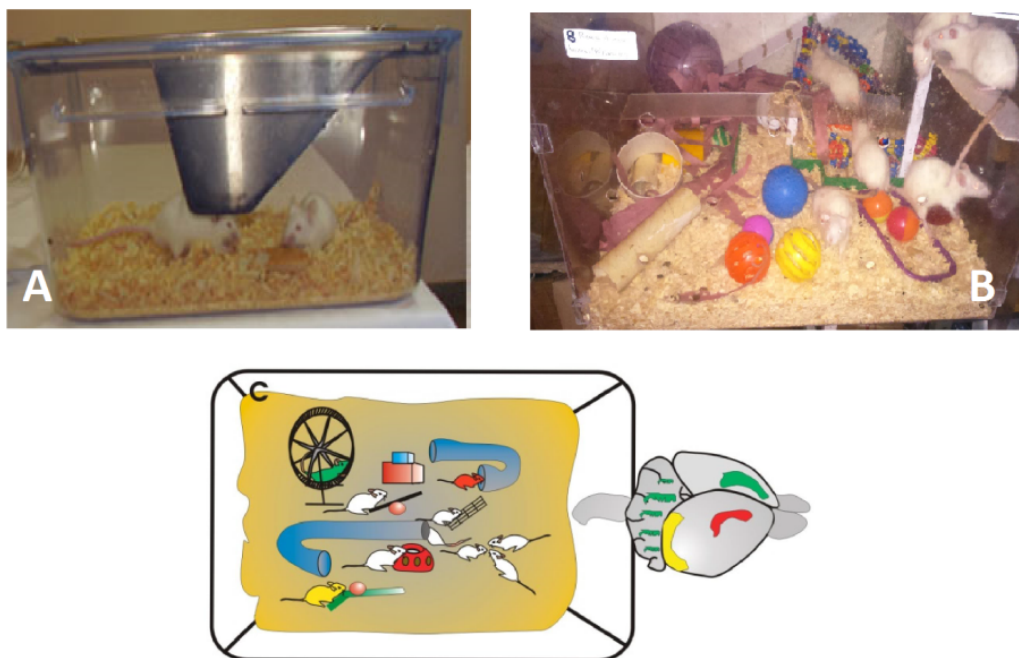


Figura 9. Condiciones de enriquecimiento ambiental. La figura ilustra las diferentes condiciones ambientales donde un animal (ratas) puede crecer en un laboratorio. El panel A muestra las condiciones estándar. El panel B y C ilustran las condiciones de un ambiente enriquecido. Las dimensiones de la jaula en el panel A son de 47X33X19 cm y en el panel B son de 75X60X60 cm. Observe que las jaulas en un ambiente

enriquecido tienen varios niveles y objetos que los animales pueden manipular libremente. El número de animales que viven en cada una de ellas es mayor ($n=8$) con respecto a las jaulas de condición estándar ($n=4$). Además el panel C ilustra que la configuración del ambiente es muy importante, ya que los distintos objetos tienen un impacto diferencial en el cerebro del animal. Por ejemplo, las ratas en color que se representan en cada objeto del esquema ilustra la estimulación en diferentes regiones cerebrales, región visual (rata amarilla). (Tomado y modificado de Venebra-Muñoz, 2010).

Animales que crecen influenciados por un AE mejoran la ejecución de las tareas aprendidas en la edad adulta (Kobayashi *et al.*, 2002), por ejemplo, cuando los animales son mantenidos desde el destete (día 21 después del nacimiento) en AE por 8 semanas y al evaluarlas a los 2.5 meses de edad usando el laberinto de Hebb-William, ejecutaron en menor tiempo la prueba de aprendizaje con respecto a los animales criados en condiciones estándar (Hymovitch, 1952), este resultado no es observado en animales expuestos a AE a la edad de 15 o 25 meses, sugiriendo que el AE no tiene el mismo efecto en el envejecimiento del cerebro (Segovia *et al.*, 2006). Sin embargo, puede atenuar los efectos relacionados con la edad, por ejemplo, la densidad sináptica en el hipocampo de las ratas disminuye con la edad y es mantenido cuando los animales viejos son alojados en condiciones enriquecidas (Saito *et al.*, 1994). A nivel morfológico ha sido reportado que los animales que crecen bajo condiciones de AE muestran un incremento significativo en la arborización dendrítica y la densidad de espinas dendríticas en regiones cerebrales directamente relacionadas con la consolidación del aprendizaje y la memoria, tales regiones incluyen neuronas piramidales de la capa III de la corteza occipital, así como también neuronas de la región CA1 hipocámpal (Leggio *et al.*, 2005). Los animales expuestos a un AE incrementan la tasa de neurogénesis en el giro dentado del hipocampo y proliferación en la ruta migratoria rostral en ratas expuesta a un AE de 1 a 3 semanas (Martonciková *et al.*, 2011), el aumento de neurogénesis en esta región del cerebro puede estar asociado con una mejor ejecución en las pruebas de aprendizaje (Lledo *et al.*, 2006).

Después de la exposición de los animales con una lesión en el sistema nervioso a un AE, su recuperación parcial incluye funciones cognitivas y movimiento en miembros afectados

(Johnson *et al.*, 2013; Galeano *et al.*, 2015). Ratas con lesión en la corteza parietal o lesión bilateral del hipocampo, recuperan su déficit espacial, motora y de memoria cuando son expuestas por 14 días en AE comparados con animales que se encuentran bajo condiciones estándar de laboratorio, sugiriendo que el AE puede funcionar como alternativa terapéutica (Sozda *et al.*, 2010). Ha sido demostrado que un AE incrementa significativamente en el cerebro niveles de factor de crecimiento neural (NGF), en el hipocampo y la corteza entorrinal (Dahlqvist *et al.*, 2003) del factor neuronal derivado del cerebro (BDNF), receptor subunidad 1 de NMDA (Sun *et al.*, 2010) y neurotrofina-3 (NT3), todos estos factores están involucrados en el proceso de plasticidad neuronal, supervivencia neuronal y diferenciación (Torasdotter *et al.*, 1998). Por lo tanto se ha sugerido que el AE ayuda a la recuperación de la región dañada debido a que facilita la expresión y la síntesis de estos factores de crecimiento (Dahlqvist *et al.*, 2003). Por otra parte, condiciones de enriquecimiento ambiental impactan en la conducta emocional tales como estrés, miedo, ansiedad y depresión (Porsolt *et al.*, 1978; Zubedat *et al.*, 2015). Animales expuestos a condiciones de enriquecimiento son menos “emocionales” que los animales que crecieron bajo condiciones estándar de laboratorio en condiciones de empobrecimiento o aislados (1 animal por caja) (Brenes *et al.*, 2006). Una serie de estudios fueron diseñados para evaluar los niveles de ansiedad en ratas y ratones en diferentes etapas de vida a través de la implementación de un laberinto en cruz demostrando los efectos de AE. Por ejemplo el AE reduce los niveles basales de plasma de la hormona adrenocorticotropica (ACTH) y corticosterona (CORT) en ratas macho y hembra (Belz *et al.*, 2003). Estos resultados sugieren que la exposición a un AE induce cambios significativos en los niveles hormonales de CORT y ACTH, los cuales pueden estar afectando el comportamiento de los animales. La exposición del animal al olor de un depredador (heces de gato) incrementan los niveles plasmáticos de CORT en animales en condiciones estándar, pero no en animales en condiciones enriquecidas. Bajo condiciones de estrés, la liberación de dopamina y la acetilcolina en la corteza prefrontal es reducida en animales colocados en AE (Segovia *et al.*, 2008).

De manera interesante, un ambiente enriquecido puede funcionar como un protector en contra del desarrollo de ciertas conductas adictivas. Se ha reportado que ratas expuestas por 60 días a un ambiente enriquecido disminuyen significativamente la auto-administración de anfetaminas (Bardo *et al.*, 2001). La ingesta de morfina también disminuye en ratas que se mantienen en un ambiente social, es decir, con más compañeros, que ratas que son criadas de manera aislada (Hadaway *et al.*, 1979). De igual manera, el ambiente enriquecido reduce el efecto estimulante locomotor que produce la nicotina en las ratas (Green *et al.*, 2003), sugiriendo que quizás también el consumo de esta sustancia se vea disminuida en animales mantenidos bajo condiciones de enriquecimiento (Venebra-Muñoz *et al.*, 2011). Además se ha observado que las ratas expuestas a un enriquecimiento ambiental disminuyen el déficit cognoscitivo y motor generado por la ingesta prenatal de alcohol por parte de sus madres. Además, el AE incrementa la densidad de espinas dendríticas en el área CA1 del hipocampo de estos animales (Hannigan y Berman, 2000).

3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años nuestro equipo de investigación se ha centrado en los ambientes enriquecidos y el efecto que ejerce en los individuos con consumo de nicotina, trabajos recientes han demostrado que los animales que crecieron bajo condiciones de AE consumen menos nicotina que los animales que crecieron en condiciones estándar de laboratorio, lo que sugiere un papel protector del ambiente enriquecido en el desarrollo de la adicción a la nicotina (Venebra, 2011).

Uno de los trabajos realizados recientemente por nuestro grupo de investigación fue el de Morales-Morales en el que midió el consumo de nicotina en ratas mantenidas bajo enriquecimiento ambiental por treinta días aproximadamente y posteriormente las aisló individualmente y les colocó un bebedero de nicotina durante 12 hr y así medir la dosis de nicotina que consumían, por lo que nos preguntamos ¿Qué pasaría si modificamos el ambiente? Colocándolas en un ambiente enriquecido mientras se les inyectaba la misma dosis de nicotina consumida por las ratas del experimento de Morales-Morales, para

poder observar el efecto que el ambiente tiene sobre el consumo de la nicotina.

4. HIPÓTESIS

De acuerdo a lo anterior:

- Si el ambiente enriquecido tiene un papel protector en el desarrollo de la adicción a la nicotina, al retirar el AE entonces habrá diferencias en la inmunoreactividad a Δ FosB.
- Si el enriquecimiento modifica la expresión de Δ FosB entonces la inmunoreactividad en ratas que crecen bajo un ambiente enriquecido será diferente comparadas con las mantenidas en AE

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar cambios en la expresión del factor de transcripción Δ FosB en el núcleo acumbens y corteza prefrontal de la rata Wistar expuesta a un AE seguido de un aislamiento y un autoconsumo de nicotina y ratas en AE con consumo inducido de nicotina.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar cambios en la expresión del factor de transcripción Δ FosB en el núcleo acumbens y corteza prefrontal de la rata wistar expuesta a condiciones de enriquecimiento ambiental seguido de aislamiento y autoconsumo

Determinar cambios en la expresión del factor de transcripción Δ FosB en el núcleo acumbens y corteza prefrontal de la rata wistar expuesta a condiciones de enriquecimiento ambiental seguido del consumo inducido.

6. MÉTODO

Animales. Se utilizaron ratas Wistar macho de 21 días de edad al inicio de los experimentos, mantenidos en condiciones estándar de laboratorio, con un ciclo luz-oscuridad 12:12 (luz en 9:00) con comida y agua *ad libitum*. Sus cajas fueron cambiadas periódicamente. Se tomaron todas las precauciones para minimizar el dolor y malestar de

6.1 Experimento 1. Enriquecimiento ambiental, aislamiento y autoconsumo de nicotina.

Se colocó a las ratas en AE del día 21 (día uno del experimento) posnatal al 50, a partir del 51 al día 75 posnatal del experimento los animales fueron retirados de la caja de AE y se colocaron en cajas individualmente. A 5 de estos animales (ratas 6-10) se les colocó un bebedero con nicotina disuelta en agua (0.006%, sigma N5260) (Dadmarz y Vogel, 2003) por 12 horas durante 24 días (Fig. 11). Diariamente se midió el volumen de agua y de solución de nicotina ingerido por lo animales. Tanto el agua como la solución de nicotina se prepararon diariamente, los bebederos además se cambiaron de posición diariamente en las dos condiciones ya descritas, con la finalidad de descartar una preferencia por el lugar. Los animales se pesaron cada tercer día hasta el día 30 y a partir del día 31 del experimento diariamente con el fin de descartar efectos del peso sobre el consumo de nicotina y para calcular la dosis de nicotina consumida (Venebra-Muñoz *et al.* 2010). Al finalizar el periodo del experimento los animales se anestesiaron, se perfundieron y sus cerebros fueron procesados inmunohistoquímicamente para la detección de Δ FosB.

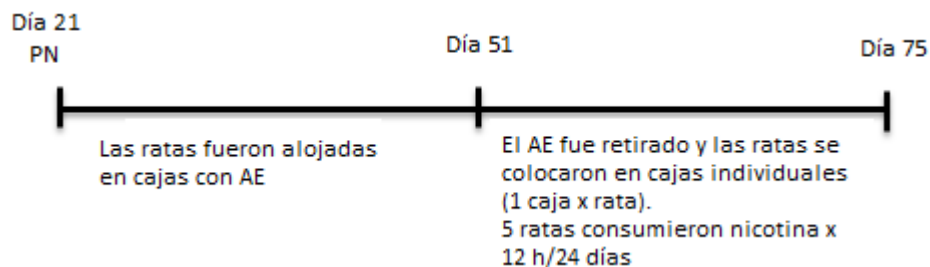


Figura 11. Esquema del experimento. Las ratas se colocaron en AE a partir del día 21 posnatal (PN). Del día 51 al día 75 posnatal, las ratas fueron retiradas del AE y alojadas en cajas individuales (1 rata por caja), colocándoles un bebedero de nicotina por 12 horas durante 24 días.

6.2 Experimento 2. Enriquecimiento ambiental y consumo inducido de nicotina.

Se colocaron a las ratas en AE del día 21 (día 1 del experimento) al 75 posnatal. A partir del día 51 posnatal (día 30 del experimento) a 5 de estos animales se les colocó una inyección de nicotina durante 24 días (ratas 1-5) y 2 animales se les inyectó solución salina, para descartar el efecto de la inyección (y tener un control de la administración de nicotina por inyección) para la administración de nicotina en la detección de Δ FosB (Fig. 12). La cantidad de nicotina inyectada fue proporcional a la consumida *ad libitum* (es decir, la dosis consumida de la rata 1 del experimento 1 es la misma que se administrará en la rata 1 del experimento 2). La solución de nicotina se preparó diariamente. Los animales se pesaron cada tercer día hasta el día 30 y a partir del día 31 diariamente con el fin de descartar efectos del peso sobre el consumo inducido de nicotina y para calcular la dosis de nicotina administrada.

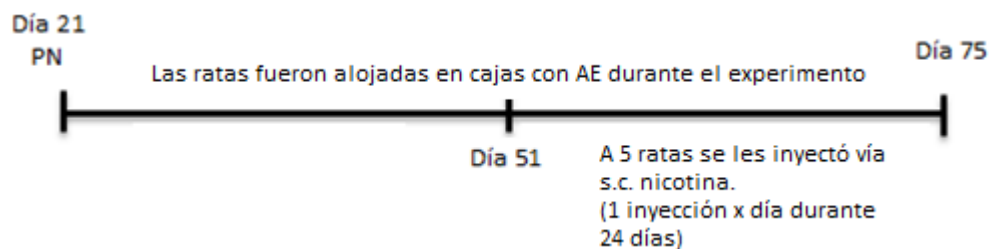


Figura 12. Esquema del desarrollo del experimento. Las ratas se colocaron en AE del día 21 posnatal, a partir del día 51 se les inyectó la misma dosis de nicotina que se auto-consumieron las ratas del experimento 1 (Exp 1).

Al finalizar el autoconsumo de nicotina y la administración sub-cutánea de nicotina los animales se anestesiaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (60 mg/kg) e inmediatamente se perfundieron transcárdialmente con una solución salina (0.9%) y después con solución fijadora de paraformaldehído (4%). Posteriormente, los cerebros fueron removidos y colocados en una solución crio-protectora de sacarosa (10%, 20% y 30%) por 12 h respectivamente.

Los cerebros crio-protegidos se congelaron y se cortaron en el plano coronal (40 μ m de grosor) con ayuda de un criostato. Se obtuvieron cortes del núcleo acumbens de 0.7 hasta 2.7 mm de Bregma y corteza prefrontal de 3.2 hasta 2.70 mm de Bregma. La localización se realizó de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson, 1998. Con ayuda de un microscopio estereoscópico se escogió un nivel para cada región (CPF y NAc) de cada uno de los animales (Fig. 13) (Harris *et al.*, 2007).

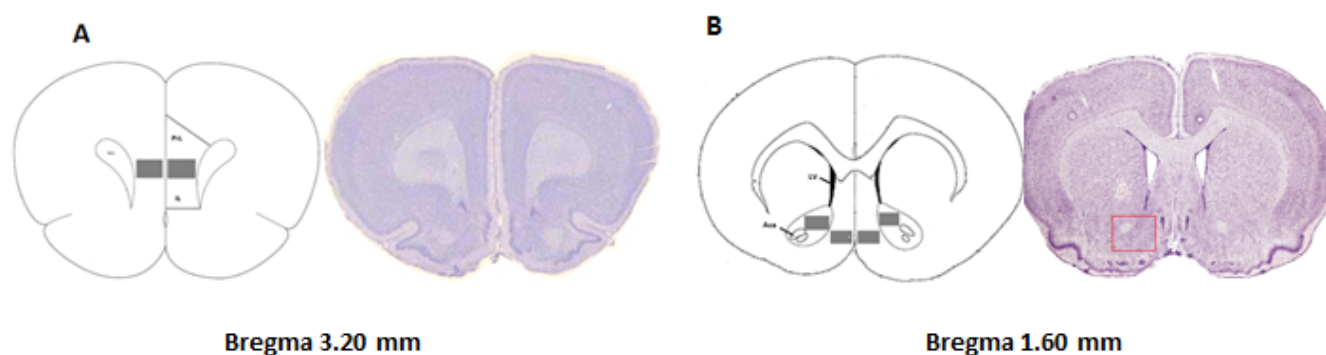


Figura 13. Esquema de los diferentes niveles utilizados para realizar la inmunohistoquímica para la detección de Δ FOSB. Panel A, CPF bregma 3.20. Panel B, NAc Bregma 1.60. PrL, corteza prelímbica. IL, corteza infralímbica. Aca, comisura anterior. LV, ventrículo lateral. Los cuadros color gris representan la región donde se realizó la cuantificación de células reactivas.

6.3 Análisis inmunohistoquímicos para detección de Δ FosB

Los cortes se lavaron 4 veces en PB al 0.1 M 5 minutos por cada lavado en agitación moderada, después se colocaron por 10 minutos 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%, Tritón X100 al 0.03% por 1 hora. Posteriormente, los cortes se incubaron con el anticuerpo primario anti-FosB/ Δ FosB 1:500 (sc-48 *Santacruz Laboratories*) en una solución de suero de cabra al 3% y Triton X100 0.03% en PB 0.1 M (PBT) por 2 días (Harris *et al.* 2007). 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 anti-conejo (Anti rabbit goat 81-6140 *Invitrogen Immunodetections*) diluido 1:250 en PBT por 1 hora en agitación moderada. Después de la incubación del anticuerpo secundario se realizaron 4 lavados con PB 0.1 M en agitación constante e inmediatamente se realizaron las reacciones de biotina-avidina siguiendo las instrucciones del fabricante del Kit ABC (Vectastain Elite PK-6100, *Vector Laboratories, CA, USA*) por 1 hora. Posteriormente, los cortes se lavaron 4 veces en PB 0.1 M por 5 minutos cada lavado, la inmunoreactividad se reveló con 3,3-diaminobenzidina (Sigma D-5637) al 0.06% y 0.1 ml de H₂O₃ diluidos en PB. Se resaltó la inmunoreactividad con una solución de Ni y Co al 1%. Después los cortes se lavaron 4 veces con PB 0.1 M por 5 minutos cada lavado y finalmente se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados, se deshidrataron y aclararon en un tren gradual de alcohol y Xilol. Posteriormente de que se colocó el medio de montaje (Clarion medium) y se colocaron cubreobjetos, se procedió a tomar fotografías con un microscopio (*Nikon Eclipse E 2000*), equipado con una cámara digital (*Nikon Dxm 1200 C*). En cada fotografía se realizó la cuantificación de los núcleos positivos al marcaje con la ayuda del programa Image J. Se determinó un área de conteo de 6440 μm^2 en todas las regiones analizadas.

6.4 Análisis estadísticos

Para determinar las diferencias significativas en el número de células de inmunoreactivas a ΔFosB entre el grupo aislado y los animales con enriquecimiento ambiental se utilizó un ANOVA. Para analizar si existen diferencias significativas entre los grupos se utilizaron pruebas de ANOVA, así como LSD para ver cuáles son los grupos diferentes.

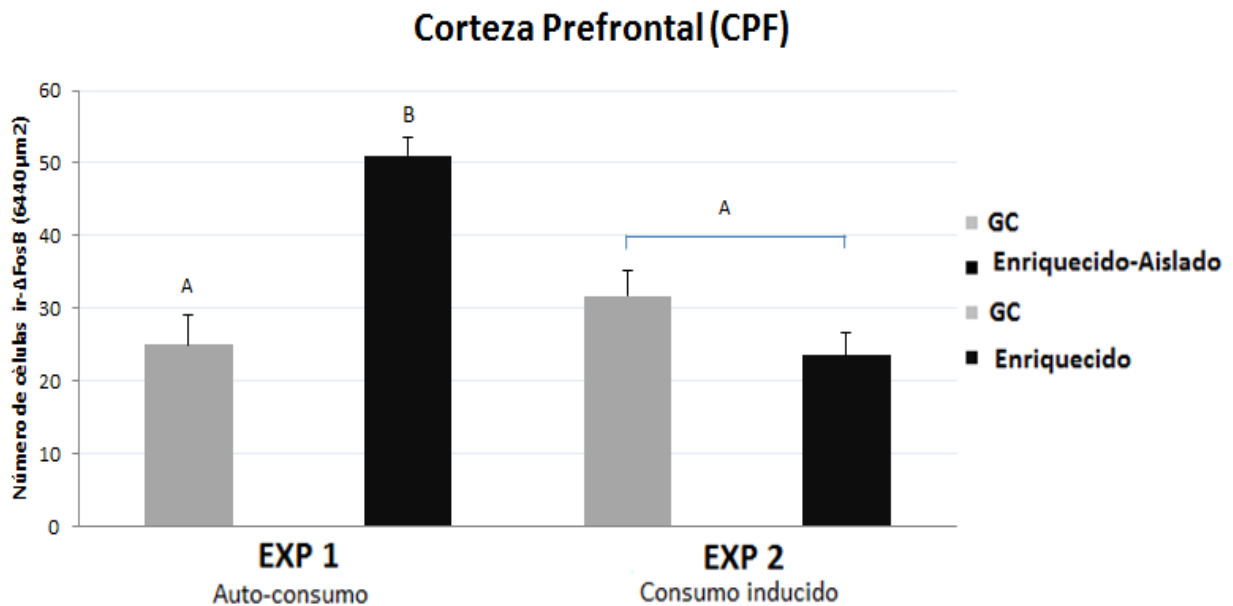
1. RESULTADOS

1.1 Autoconsumo vs Consumo inducido

1.1.1 Inmunohistoquímica en Corteza Prefrontal (CPF)

Los resultados muestran que el número de neuronas inmunoreactivas a Δ FosB en CPF aumentó en ratas que fueron aisladas con autoconsumo de nicotina después de permanecer durante 30 días en AE (EXP 1) respecto a las ratas con consumo inducido de nicotina y que permanecieron en un AE durante el experimento (EXP2), Figura 14.

A)



B)

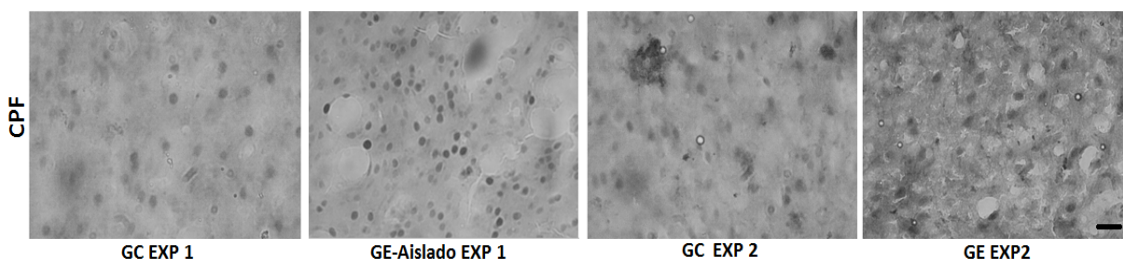


Figura 14. Inmunoreactividad de Δ FosB en NAc después de un ambiente enriquecido y un aislamiento con consumo y auto-consumo de nicotina. A) Existe un aumento en el número de neuronas inmunoreactivas en

las ratas que fueron aisladas con auto-consumo de nicotina después de haber permanecido en AE por 30 días (EXP1) respecto a las ratas mantenidas en AE con consumo inducido de nicotina (EXP2) ($F_{(3,111)} = 20.15, p < 0.05$). En el panel 2) se observan imágenes de las neuronas inmunoreactivas en el NAc core en los diferentes grupos. GC, grupo control. GE-Aislado, grupo Enriquecido y posteriormente aislado. GE, grupo enriquecido. Exp 1, experimento 1. Exp 2, experimento 2. Las barras en la gráfica indican la media \pm error estándar, la barra de escala en las imágenes representa 30 μm .

1.1.2 Inmunohistoquímica en Núcleo Acumbens Core (NAcC)

Los resultados muestran que el número de neuronas inmunoreactivas a ΔFosB en NAc core aumentó en ratas que fueron aisladas con autoconsumo de nicotina después de permanecer durante 30 días en AE (EXP 1) respecto a las ratas con consumo inducido de nicotina y que permanecieron en un AE durante el experimento (EXP2).

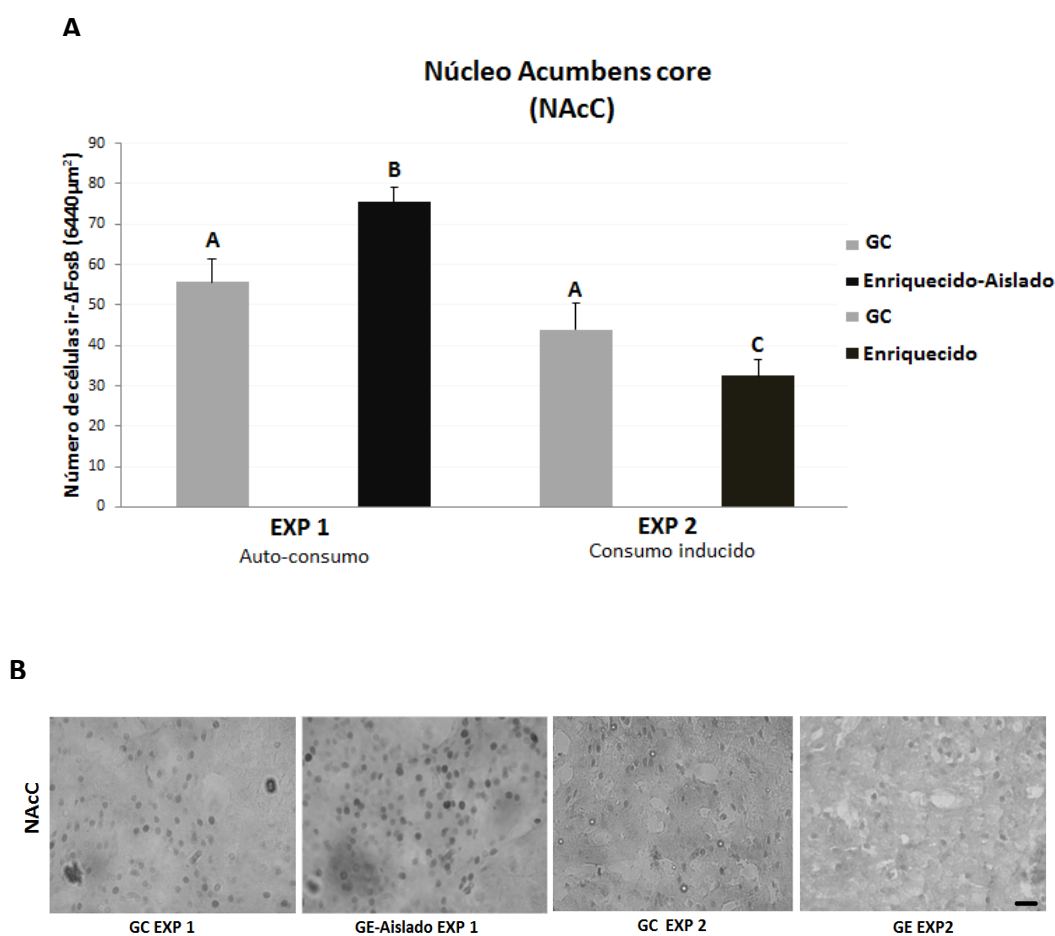
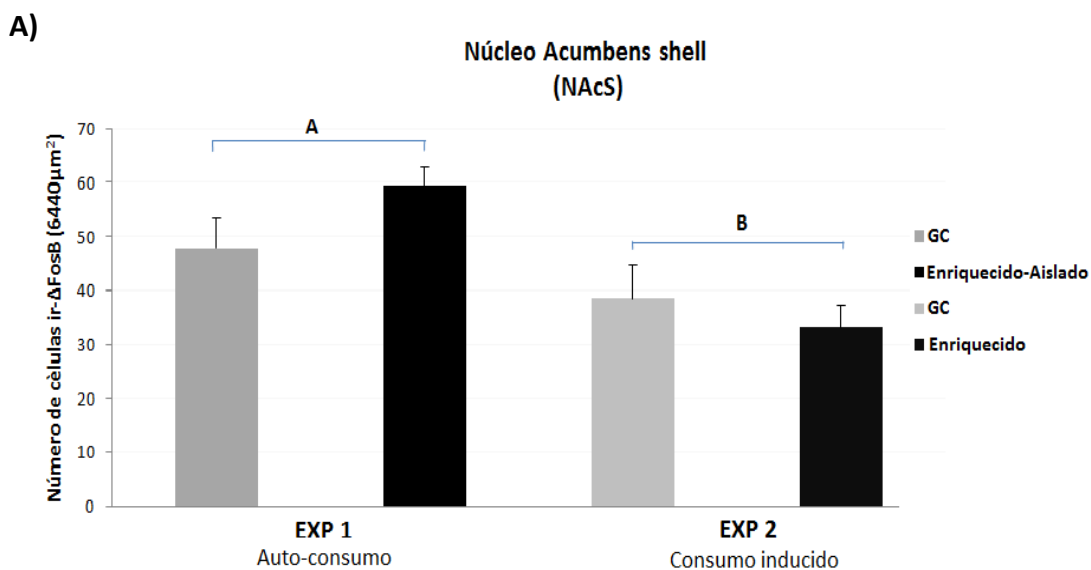


Figura 15. Inmunoreactividad de Δ FosB en NAc después de un ambiente enriquecido y un aislamiento con consumo y auto-consumo de nicotina. A) Existe un aumento en el número de neuronas inmunoreactivas en las ratas que fueron aisladas con auto-consumo de nicotina después de haber permanecido en AE por 30 días (EXP1) respecto a las ratas mantenidas en AE con consumo inducido de nicotina (EXP2) ($F_{(3, 119)} = 21.6$, $p < 0.05$). En el panel B) se observan imágenes de las neuronas inmunoreactivas en el NAc core en los diferentes grupos. GC, grupo control. GE-Aislado, grupo Enriquecido y posteriormente aislado. GE, grupo enriquecido. Exp 1, experimento 1. Exp 2, experimento 2. Las barras en la gráfica indican la media \pm error estándar, la barra de escala en las imágenes representa 30 μ m.

1.1.3 Inmunohistoquímica en Núcleo Acumbens Shell (NAcS)

Los resultados muestran que el número de neuronas inmunoreactivas a Δ FosB en NAc shell aumentó en ratas que fueron aisladas con autoconsumo de nicotina después de permanecer durante 30 días en AE (EXP 1) respecto a las ratas con consumo inducido de nicotina y que permanecieron en un AE durante el experimento (EXP2).



B)

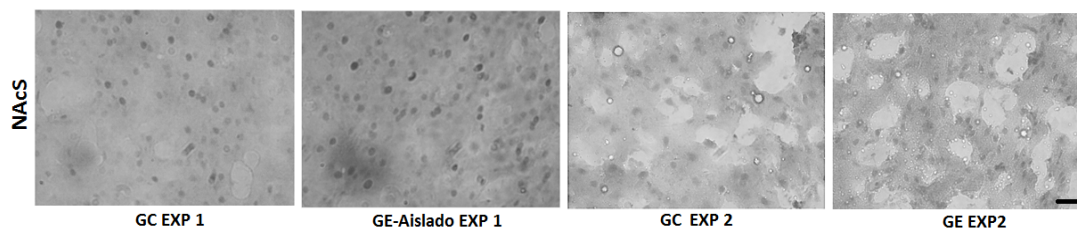


Figura 16. Inmunoreactividad de Δ FosB en NAcC después de un ambiente enriquecido y un aislamiento con consumo y auto-consumo de nicotina. A) Existe un aumento en el número de neuronas inmunoreactivas en las ratas que fueron aisladas con auto-consumo de nicotina después de haber permanecido en AE por 30 días (EXP1) respecto a las ratas mantenidas en AE con consumo inducido de nicotina (EXP2) ($F_{(3,120)} = 9.14$, $p < 0.05$). En el panel B) se observan imágenes de las neuronas inmunoreactivas en el NAc core en los diferentes grupos. GC, grupo control. GE-Aislado, grupo Enriquecido y posteriormente aislado. GE, grupo enriquecido. EXP1, experimento 1. EXP2, experimento 2. Las barras en la gráfica indican la media \pm error estándar, la barra de escala en las imágenes representa 30 μ m.

6.2 Comparación entre individuos

Ya que la dosis que se auto-administraron las ratas del experimento 1 fue la misma dosis que se inyectó a las ratas del experimento 2, es decir la dosis que se auto-administró vía oral la rata 6 del experimento 1 se le inyectó vía s.c. a la rata 1 del experimento 2, la rata 2 del experimento 2 se le inyectó la dosis auto-administrada de la rata 7 del experimento 1 y así sucesivamente, se llevó a cabo una comparación individual.

Por lo que las siguientes gráficas nos muestran la comparación individual de las ratas que fueron aisladas (1 rata x caja) con autoconsumo de nicotina, después de haber permanecido en AE por 30 días (EXP 1), respecto a las ratas que permanecieron AE durante el experimento y con consumo inducido de nicotina de nicotina (EXP2).

Individuo 6 vs Individuo

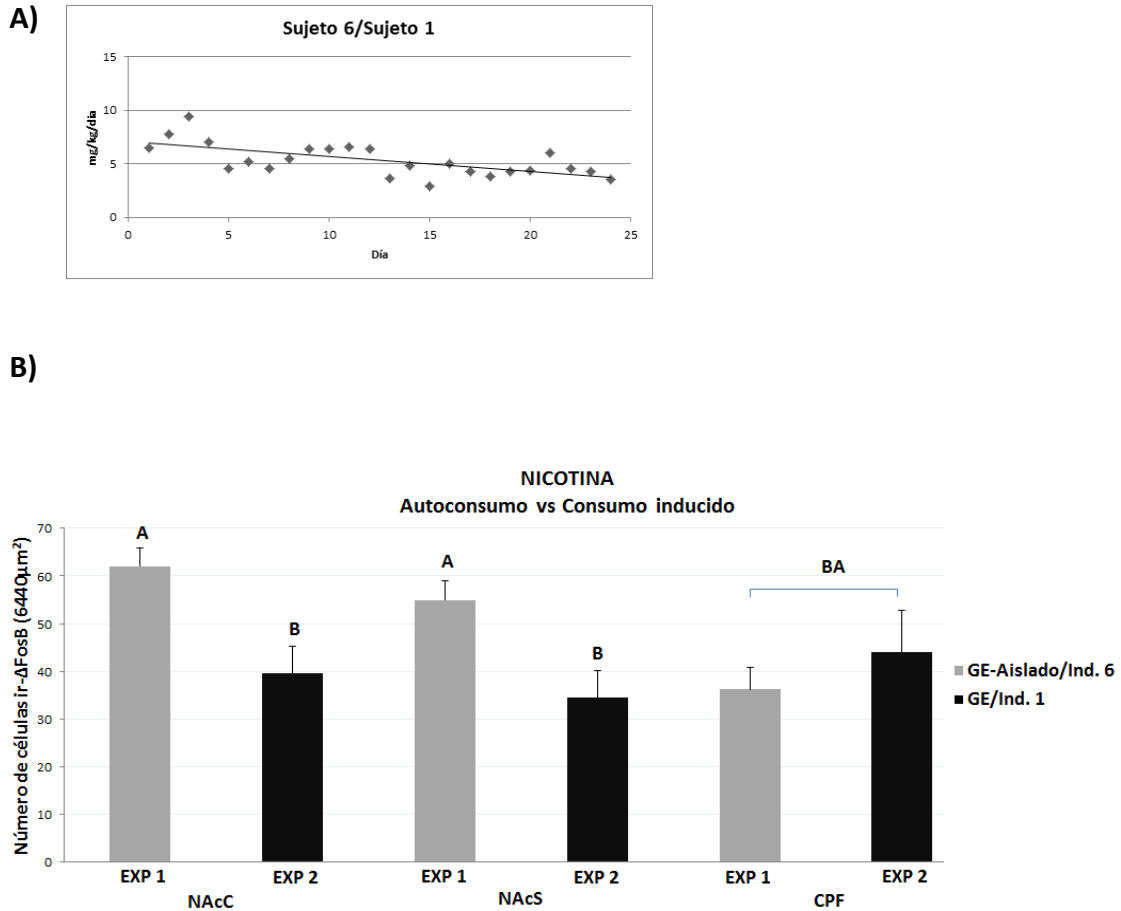
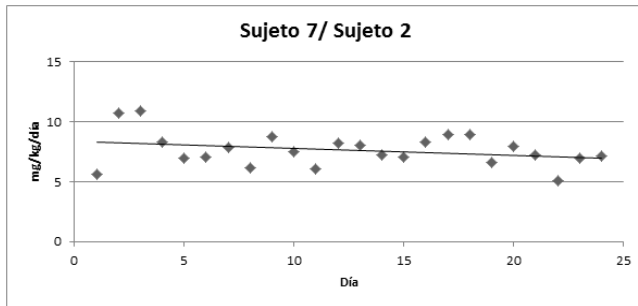


Figura 17. Comparación de la Inmunoreactividad de Δ FosB en NAcC, NAcS y CPF del individuo 6 del EXP 1 vs el individuo 1 del EXP 2. A) Dosis de nicotina que se auto-administró a la rata 6 del EXP 1 y se le inyectó a la rata 1 del EXP 2, durante 24 días. B) En la gráfica se puede observar que tanto en NAcC como en NAcS existe una disminución en la ir- Δ FosB del Exp2 respecto al EXP 1. Sin embargo no existe una diferencia significativa en CPF entre el EXP 1 y el EXP 2. ($F_{(5, 52)} = 6.21, p < 0.05$). GE-Aislado, grupo enriquecido y posteriormente aislado. GE, grupo Enriquecido. Ind 6, individuo 6. Ind 1, individuo 1. EXP1, experimento 1. EXP2, experimento 2. NAcC, Núcleo Acumbens Core. NAcS, Núcleo Acumbens Shell, CPF, corteza prefrontal.

Individuo 7 vs Individuo 2

A)



B)

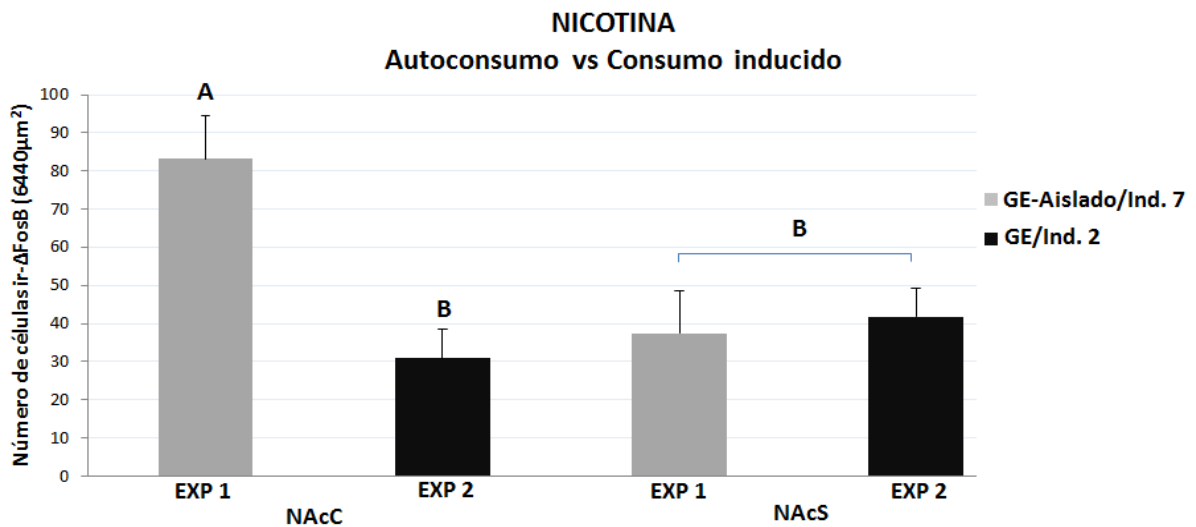
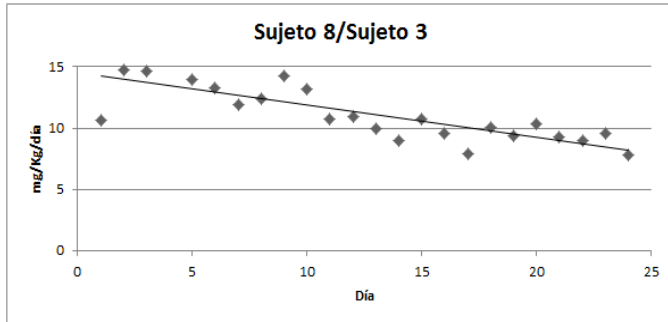


Figura 18. Comparación de la Inmunoreactividad de Δ FosB en NAcC y NAcS del individuo 7 del EXP 1 vs el individuo 2 del EXP 2. A) Dosis de nicotina que se auto-administró a la rata 7 del EXP 1 y se le inyectó a la rata 2 del EXP 2, durante 24 días. B) En la gráfica se puede observar que en el NAcC del EXP 2 se observa una disminución de la ir- Δ FosB respecto al NAcC del EXP 1. Sin embargo no existe una diferencia significativa en NAcS entre el EXP 1 y el EXP 2. ($F_{(3, 22)} = 5.23, p < 0.05$). GE-Aislado, grupo enriquecido y posteriormente aislado. GE, grupo enriquecido. Ind 6, individuo 6. Ind 1, individuo 1. Exp 1, experimento 1. Exp 2, experimento 2. NAcC, Núcleo Acumbens Core. NAcS, Núcleo Acumbens Shell.

Individuo 8 vs Individuo 3

A)



B)

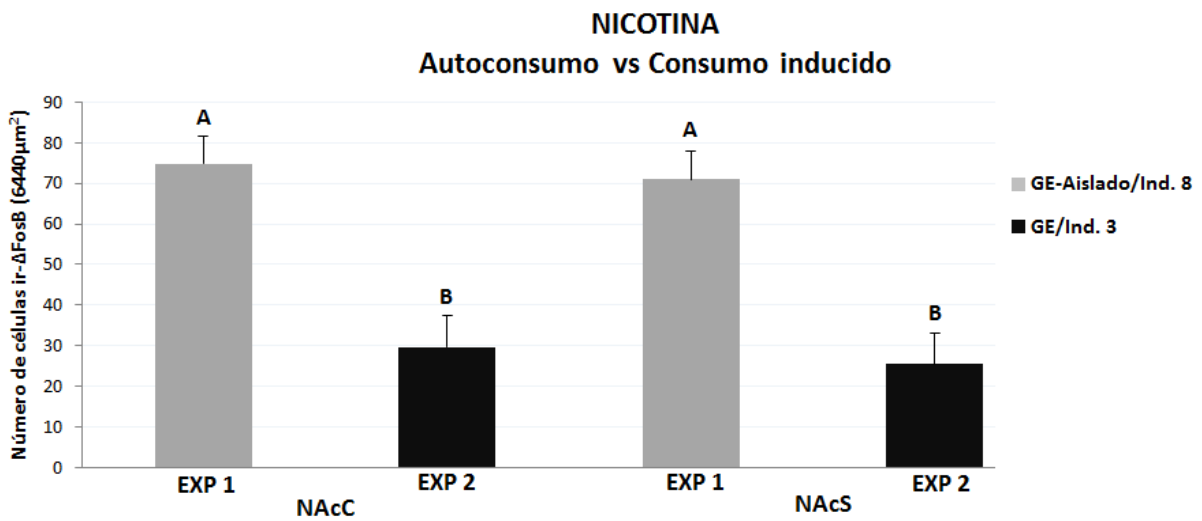
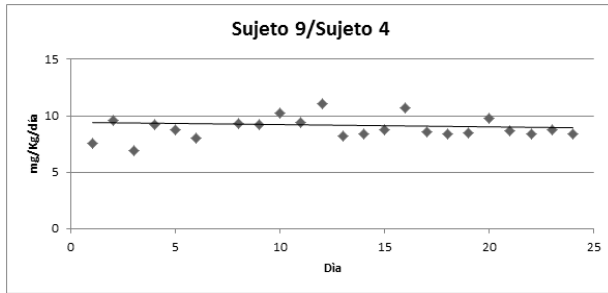


Figura 19. Comparación de la Inmunoreactividad de Δ FosB en NAcC y NAcS del individuo 8 del EXP 1 vs el individuo 3 del EXP 2. A Dosis de nicotina que se auto-administró a la rata 8 del EXP 1 y se le inyectó a la rata 3 del EXP 2, durante 24 días. B) La gráfica muestra que tanto en el NAcC como en el NAcS del EXP 2 se observa una disminución de la ir- Δ FosB al EXP. 1 ($F_{(3, 41)} = 12.84, p < 0.05$). GE-Aislado, grupo enriquecido y posteriormente aislado. GE, grupo enriquecido. Ind 6, individuo 6. Ind 1, individuo 1. Exp 1, experimento 1. Exp 2, experimento 2. NAcC, Núcleo Acumbens Core. NAcS, Núcleo Acumbens Shell.

Individuo 9 vs Individuo 3

A)



B)

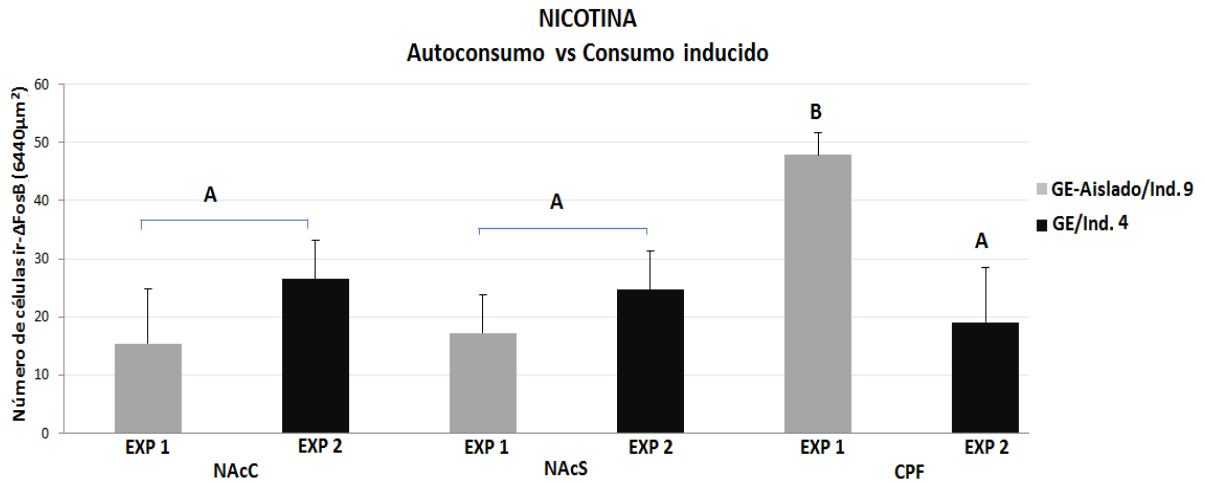
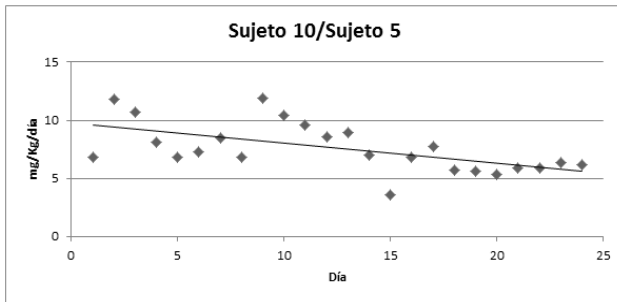


Figura 20. Comparación de la Inmunoreactividad de Δ FosB en NAcC, NAcS y CPF del individuo 9 del EXP 1 vs el individuo 4 del EXP 2. A Dosis de nicotina que se auto-administró a la rata 9 del EXP 1 y se le inyectó a la rata 4 del EXP 2, durante 24 días. B) En la gráfica podemos observar que tanto en NAcC como en NAcS no existe diferencia en la ir- Δ FosB del Exp1 respecto al EXP 2. Sin embargo existe una disminución significativa en la ir- Δ FosB en la CPF del Exp2 respecto al EXP 2. ($F_{(5, 36)} = 5.79, p < 0.05$). GE-Aislado, grupo enriquecido y posteriormente aislado. GE, grupo Enriquecido. Ind 6, individuo 6. Ind 1, individuo 1. Exp 1, experimento 1. Exp 2, experimento 2. NAcC, Núcleo Acumbens Core. NAcS, Núcleo Acumbens Shell, CPF, corteza prefrontal.

Individuo 10 vs Individuo 5

A)



B)

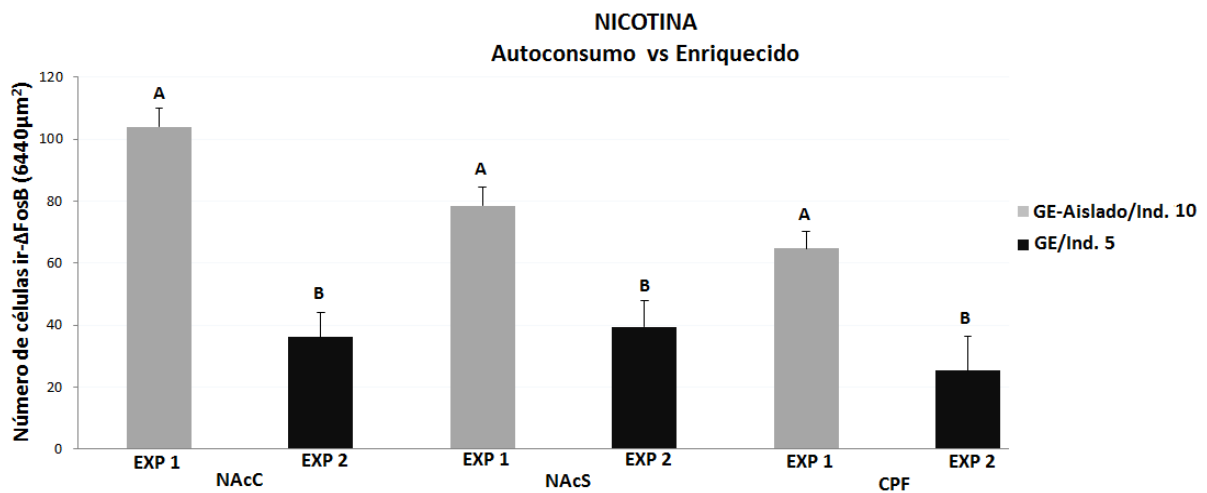


Figura 21. Comparación de la Inmunoreactividad de Δ FosB en NAcC, NAcS y CPF del individuo 9 del EXP 1 vs el individuo 4 del EXP 2. A) Dosis de nicotina que se auto-administró a la rata 10 del EXP 1 y se le inyectó a la rata 5 del EXP 2, durante 24 días. B) En la gráfica podemos observar una disminución tanto en NAcC, NAcS y CPF existe una disminución en la ir- Δ FosB del Exp. 2 respecto al EXP. 1. ($F_{(5,56)} = 16.2, p < 0.05$). GE-Aislado, grupo enriquecido y posteriormente aislado. GE, grupo Enriquecido. Ind 6, individuo 6. Ind 1, individuo 1. Exp 1, experimento 1. Exp 2, experimento 2. NAcC, Núcleo Acumbens Core. NAcS, Núcleo Acumbens Shell, CPF, corteza prefrontal.

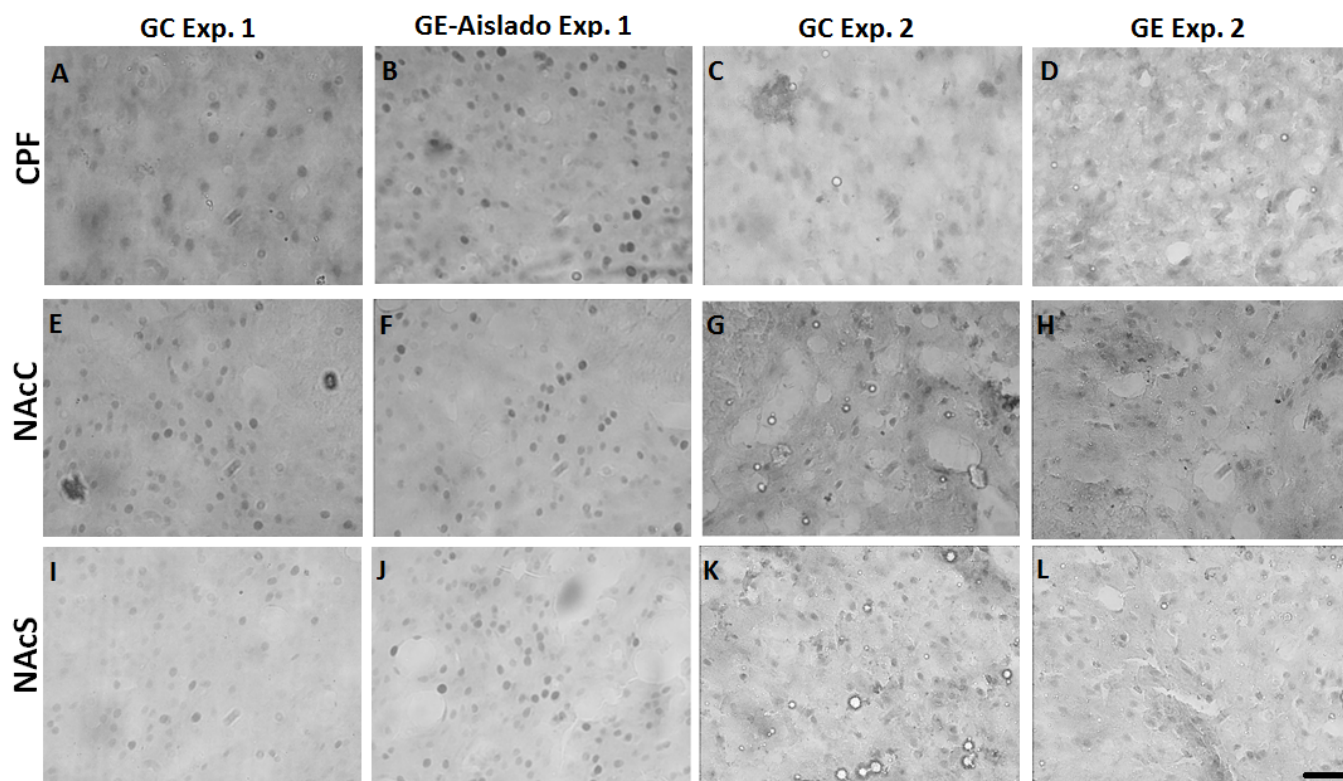


Figura 22. Inmunoreactividad a FosB/ Δ FosB en neuronas de: corteza prefrontal (CPF), núcleo acumbens core (NAc core), núcleo acumbens shell (NAc shell). El aumento de neuronas inmunoreactivas se puede observar en CPF, NAc core y shell después de retirarles el enriquecimiento y aislar a los individuos (GE-Aislado). La barra representa 30 μ m para todas las imágenes.

2. DISCUSIÓN

Autoconsumo vs Consumo inducido en CPF, NAc core y NAc shell

Los resultados de este estudio muestran que el número de neuronas inmunoreactivas a Δ FosB aumentó en CPF, NAc core y NAc shell en el grupo Enriquecido—Aislado (EXP 1) con respecto a las ratas del grupo Enriquecido (EXP 2) (figuras; 14, 15 y 16), se ha demostrado que los niveles basales de Δ FosB se incrementan significativamente en regiones del sistema de recompensa por la administración de drogas (Ehrlich *et al.*, 2002), estudios anteriores de nuestro equipo de investigación han demostrado que la expresión de Δ FosB está elevada en animales expuestos a AE en comparación con animales que crecieron en condiciones estándar (Venebra-Muñoz, 2014), sin embargo, en este estudio, esta expresión se reduce en los animales que permanecieron en AE después de que se les inyectara vía s.c. nicotina (EXP 2; figura 14, 15 y 16), resultados similares han observado que la expresión de Δ FosB está elevada en el estriado, en animales expuestos a AE en comparación con animales que crecieron en condiciones estándar, sin embargo, esta expresión se reduce en los animales de AE después de que se les administrara cocaína, lo cual no ocurre en los animales de las condiciones estándar (Solinas *et al.*, 2009). Estos resultados sugieren que el AE tiene un efecto sobre el sistema mesolímbico, ya que los animales tienen una mayor expresión de Δ FosB de manera basal en el sistema dopaminérgico (indicativo de mayor actividad neuronal) (Venebra, 2011) pero ante la exposición de una droga como nicotina esta expresión disminuye, por esta razón sería un protector ante los efectos producidos por el abuso de una droga.

El aumento en el número de neuronas inmunoreactivas en CPF del grupo Enriquecido-Aislado (EXP1; figura 14) puede deberse a las siguientes razones. La CPF juega un papel decisivo tanto en la formación de hábitos patológicos en el adicto, como en el mantenimiento de los mismos (Fernández-Espejo, 2000), es la región que participa en funciones cognitivas como la toma de decisiones, mantiene e integra información para

guiar efectos conductuales (Schoenbaum *et al.*, 2006), por ejemplo, se ha observado en animales de experimentación que la destrucción de la corteza prefrontal facilita la búsqueda compulsiva de la droga (Weissenborn *et al.*, 1997), además de ser un área muy susceptible al desarrollo de eventos de plasticidad neuronal por el AE (Kolb *et al.*, 2003), produciendo un aumento en la arborización dendrítica así como en la densidad de espinas dendríticas (Leggio *et al.*, 2005), aumento de factores de transcripción que provocan plasticidad (Venebra-Muñoz *et al.*, 2014), por lo cual el aumento en la inmunoreactividad se puede deber únicamente al efecto del enriquecimiento. Por otra parte se ha reportado que la nicotina tiene efecto sobre el sistema de la recompensa, el cual involucra a la CPF, en trabajos anteriores nuestro grupo ha podido observar que la inmunoreactividad en esta región baja después de administrar nicotina (Venebra-Muñoz, 2010), en este trabajo no observamos una decaída de la inmunoreactividad después de que los animales consumieron nicotina, pero debemos tomar en cuenta el hecho de que este grupo fue aislado después de haberlo mantenido en AE e inmediatamente se les auto-administró la nicotina (EXP1) lo que tal vez podría sugerir que el enriquecimiento perdió dicho efecto una vez que los animales fueron aislados, sin embargo se necesitaría correr otro grupo de animales para ver el efecto basal (sin nicotina). Interesantemente la inmunoreactividad a Δ FosB en CPF si se reduce cuando la nicotina es inyectada s.c., es decir, al parecer la vía de administración es importante en la actividad de esta región cerebral, esto tiene sentido ya que esta región como mencionamos anteriormente es la encargada de la toma de decisiones.

En el NAc core las células inmunoreactivas a Δ FosB también aumentó en el grupo Enriquecido-Aislado (EXP 1) respecto a las ratas del grupo Enriquecido (EXP 2; Figura 15), La región del core tiene un papel motor importante, al recibir aferencias de la corteza motora y la corteza prefrontal (Fernández-Espejo 2000), El NAc core juega un papel clave en la conjunción con la CPF en la programación de conductas motoras asociadas a estímulos apetitivos como la toma de drogas (Fernández-Espejo, 2000), por lo que esto pudiera explicar el aumento en la expresión de Δ FosB en los animales del grupo

Enriquecido aislado. Por otra parte, estudios reportan que las condiciones de AE reducen el aumento en la actividad locomotora que produce la administración de nicotina subcutánea en ratas (Green et al., 2003), lo que sugiere una menor actividad neuronal en esta región (EXP 2).

El número de células positivas a Δ FosB en el NAc shell fue mayor en animales del grupo Enriquecido-Aislado (EXP 1) respecto a los animales del grupo Enriquecido (EXP 2; Figura 16). El núcleo acumbens shell es la región del acumbens que tiene un carácter puramente límbico, relacionado con la amígdala y el hipocampo, con una función en el procesamiento de información de estímulos asociados con el efecto reforzante de la toma de las drogas. Varios trabajos muestran que la nicotina aumenta la liberación de dopamina en el NAc shell por parte de fibras provenientes del ATV (Fernández-Espejo, 2000), además el NAc es la región más susceptible a los mecanismos motivacionales en la toma de drogas, lo que podría explicar el aumento en esta región debido a la auto administración de nicotina (EXP 1). Venebra y colaboradores en el 2014, observo que los animales crecidos bajo AE tienen un incremento de esta proteína (Δ FosB) debido al AE sugiriendo que el ambiente tiene un efecto en la actividad neuronal en esta región del cerebro. Nuestro equipo de investigación ha observado que los animales que crecen bajo condiciones estándar expuestos a nicotina tienen mayores niveles de ir- Δ FosB que los que no están expuestos, pero este efecto no se observó en los animales que estuvieron bajo condiciones de enriquecimiento, en donde la exposición de nicotina no tuvo efecto en la ir- Δ FosB en el NAc shell, el mismo fenómeno fue observado en el NAc core (Venebra *et al.*, 2014). Sin embargo, en este estudio nosotros encontramos que los animales que crecen bajo enriquecimiento al administrarles nicotina la expresión de Δ FosB disminuye y cuando los animales son aislados después de haber crecido bajo un ambiente enriquecido la ir- Δ FosB se incrementa por el consumo de la nicotina, sugiriendo de nuevo que el AE pierde efecto una vez que es retirado.

- **Comparación entre individuos**

Los resultados fueron obtenidos de la comparación entre los individuos de ambos experimentos con la misma dosis auto-administrada e inyectada, es decir, la dosis de nicotina que se auto-administró en la rata 6 del EXP 1 se le inyectó vía s. c., a la rata 1 del EXP 2 y así sucesivamente.

En este estudio se observó que el individuo 1 del EXP 2 hubo una disminución en la ir- Δ FosB tanto en el NAc core como en el NAc shell respecto al individuo 6 del EXP2, sin embargo no hubo diferencias significativas en la ir- en CPF. En el caso del individuo 2 (EXP2) también se observó una disminución en la ir- Δ FosB en el NAc core pero no hubo diferencias significativas en el NAc shell respecto al individuo 7 (EXP 1). Para el individuo 3 (EXP1) se observó una disminución tanto en el NAc core como en el NAc shell respecto al individuo 8 del EXP 1. El individuo 4 (EXP2) no se observaron diferencias significativas en la ir- Δ FosB tanto en el NAc core y el NAc shell, sin embargo si hubo diferencias en la ir- Δ FosB en la CPF. Para el caso del individuo 5 podemos observar una disminución en la ir- Δ FosB tanto en la CPF como en el NAc core y el NAc shell. De manera interesante los individuos 6-1 fueron los animales que obtuvieron una dosis de nicotina menor (figura 17), mientras que los individuos 8-3 son los que obtuvieron una dosis de nicotina mayor (figura 19), en la comparación de ambas graficas podemos observar que la ir- a Δ Fosb es diferente, en la gráfica 17 el individuo 1 a pesar de que el número de células positivas a Δ FosB es menor que el individuo 6, la diferencia entre el marcaje de las células es cercano entre sí, mientras que para el individuo la diferencia entre el marcaje de ambos grupos es mucho mayor, sugiriendo que la dosis de nicotina influye en el marcaje de células positivas a Δ FosB, de hecho estudios reportan que la nicotina tiene efectos ansiolíticos, ansiogénicos, anti-inmovilidades, efectos en la locomoción y efectos sobre el peso de los animales. De manera interesante los efectos ansiolíticos o ansiogénicos de nicotina en las ratas dependen de la edad de los animales, el sexo y la dosis de nicotina empleada. Por ejemplo

la nicotina s.c. tiene un efecto ansiolítico en machos adolescentes en una dosis de 0.25 mg/kg. (Cheeta *et al.*, 2001). En machos adultos, bajas dosis (0.01 y 0.1 mg/Kg/i.p) tienen efectos ansiolíticos y altas dosis (0.5 y 1.0 mg/kg/i.p.) tienen efecto ansiogénico (File *et al.*, 1998). Además en ratas, la nicotina produce un efecto estimulante que puede mostrar tolerancia o sensibilización dependiendo de la naturaleza de la exposición a la droga. En ratas sin tratamiento previo a nicotina, la administración aguda de nicotina disminuye la actividad locomotora exploratoria, mientras que la administración repetida de nicotina produce una rápida tolerancia a los efectos locomotores depresivos, seguido por un incremento en la actividad locomotora (Stolerman *et al.*, 1973), la tolerancia puede ser definida como una droga dada que produce una disminución del efecto debido a la dosis repetida, por lo que dosis más grandes deben ser administrados para producir el mismo efecto (Jaffe, 1990), sugiriendo que las diferencias en las dosis administradas a los animales, afecta en la inmunoreactividad de Δ FosB, lo que podría explicar en parte, las diferencias en la inmunoreactividad de Δ FosB.

3. CONCLUSIÓN

En conclusión los experimentos de este estudio nos muestran que la modificación del enriquecimiento ambiental altera o modifica la inmunoreactividad de Δ FosB, a pesar de que los animales crezcan bajo un ambiente enriquecido, si este enriquecimiento es retirado y son alojados en condiciones de empobrecimiento (1 animal por caja) al administrarles nicotina al parecer el efecto del enriquecimiento se pierde, lo que sugiere que para que el enriquecimiento tenga un efecto positivo en el consumo de las drogas, este se tiene que mantener.

Resultados en investigaciones anteriores de nuestro equipo de investigación han demostrado que una estimulación constante del enriquecimiento ambiental previene el consumo de nicotina, disminuyendo así el riesgo de desencadenar una conducta adictiva, en este estudio se observó que al retirar el enriquecimiento seguida de la exposición de nicotina, la expresión de células inmunoreactivas a Δ FosB se ve modificada, apoyando así

la hipótesis planteada en este trabajo.

4. BIBLIOGRAFÍA

Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J. (2007). *The Hippocampus Book*. Oxford: Oxford University Press. En Pastor *et al.*, 2013. La adicción a la nicotina: vulnerabilidad, epigénesis y modelos animales de estudio.

Arvanitogiannis A, Waraczynski M, Shizgal P. (1996). Effects of excitotoxic lesions of the basal forebrain on MFB self-stimulation. *Physiology Behavior*. 59: 795-806. En Pastor *et al.*, 2013. La adicción a la nicotina: vulnerabilidad, epigénesis y modelos animales de estudio. En Pastor *et al.*, 2013. La adicción a la nicotina: vulnerabilidad, epigénesis y modelos animales de estudio.

Bahena-Trujillo, Flores G, José A, Arias-Montaña. (2000). Dopamina: Síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Revista Biomédica*. 11:1

Bardo MT, Klebaur J, Valone J, Deaton C. (2001). Environmental enrichment decreases intravenous selfadministration of amphetamine in female and male rats. *Psychopharmacology*. 155: 278-284.

Barik J, Wonnacott S. (2009). Molecular and cellular mechanisms of action of nicotine in the CNS. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 192: 173-207. En Pastor *et al.*, 2013. La adicción a la nicotina: vulnerabilidad, epigénesis y modelos animales de estudio.

Barrot M, Sesack SR, Georges F, Pistis M, Hong S, Jhou TC. (2012). Braking dopamine systems: a new GABA master structure for mesolimbic and nigrostriatal functions. En Corominas *et al.*, 2007. Sistema dopaminérgico y adicciones.

Bassareo V, Di Chiara G. (1997). Differential influence of associative and non-associative learning mechanisms on the responsiveness of prefrontal and accumbal dopamine transmission to food stimuli in rats fed ad libitum. *J Neurosci*. 17: 8851-61. En Hernández-Espejo, 2000. ¿Cómo funciona el nucleus accumbens?

Belz E, Kennell J, Czambel K, Rubin R, Rhodes M. (2003). Environmental enrichment lowers stressresponsive hormones in singly housed male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 76:

481-486. En Venebra-Muñoz *et al.*, 2011. Efecto del ambiente enriquecido sobre el consumo de nicotina en rata Wistar.

Benowitz NL. (2008). Clinical pharmacology of nicotine: implications for understanding, preventing, and treating tobacco addiction. *Clin Pharmacol Ther*; 83: 531-541. En Corominas *et al.* 2007. Sistema dopaminérgico y adicciones.

Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P. (2009). Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handbook of Experimental Pharmacology*. 192: 29-60. En Corominas *et al.* 2007. Sistema dopaminérgico y adicciones.

Benowitz NL, Lessov-Schlaggar CN, Swan GE. (2008). Genetic influences in the variation in renal clearance of nicotine and cotinine. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 84: 243-7. En Corominas *et al.* 2007. Sistema dopaminérgico y adicciones.

Benowitz NL, Swan GE, Jacob P 3rd, Lessov-Schlaggar CN, Tyndale RF. (2006). CYP2A6 genotype and the metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Clinical. Pharmacology and Therapeutics*. 80,457-67. En Corominas *et al.* 2007. Sistema dopaminérgico y adicciones.

Benowitz NL. 2010. Nicotine addiction. *The New England Journal of Medicine*, 362, 2295-303. En Pastor *et al.*, 2013. La adicción a la nicotina: vulnerabilidad, epigénesis y modelos animales de estudio.

Bingham WE, Griffiths WJ. (1952). The effect of different environments during infancy on adult behavior in the rat. *J Comp Physiol Psychol*; 45: 307-412

Bordet R, Ridray S, Carboni S, Díaz J, Sokoloff P, Schwartz JC. (1997). Induction of dopamine D3 receptor expression as a mechanism of behavioral sensitization to levodopa. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94: 3363-7. En Corominas *et al.*, 2007. Sistema dopaminérgico y adicciones.

Brenes JC, Rodriguez O, Fornaguera J. (2006). Factor analysis of forced swimming test, sucrose preference test and open field test on enriched, social and isolated reared rats. *Behav Brain Res*. 169: 57-65. En Venebra-Muñoz *et al.*, 2011. Efecto del ambiente enriquecido sobre el consumo de nicotina en rata wistar.

Bruijnzeel W. (2012). Tobacco Addiction and the Dysregulation of Brain Stress Systems. *Neurosci Biobehav Rev.* 36(5): 1418–1441.

Carle TL, Ohnishi YN, Ohnishi YH, Alibhai IN, Wilkinson MB, Kumar A, Nestler EJ. (2007). Absence of conserved C-terminal degron domain contributes to Δ FosB's unique stability. En Nestler Eric J. (2008). Transcriptional mechanisms of addiction: role of Δ FosB. *Philosophical transaction of the royal society.* 363: 3245-3255

Changeux JP. (2010). Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nature Reviews. Neuroscience.* 11:389-401. En Pastor *et al.*, 2013. La adicción a la nicotina: vulnerabilidad, epigénesis y modelos animales de estudio.

Chen BT, Hopf FW, Bonci A. (2010). Synaptic plasticity in the mesolimbic system: therapeutic implications for substance abuse. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 118: 129-39. En Pastor *et al.*, 2013. La adicción a la nicotina: vulnerabilidad, epigénesis y modelos animales de estudio.

Cheeta S, Irvine E, Kenny P, File S. (2001a). In adolescent female rats are more sensitive to the anxiolytic effect of nicotine than are male rats. *Neuropsychopharmacology.* 25 (4): 601-607

Cooper JR, Bloom FE, Roth RH. (1996). The biochemical basis of neuropharmacology. 7th. Ed. New York/Oxford, Oxford University Press, 293-351. En Bahena-Trujillo *et al.*, 2000. Dopamina: Síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central.

Corominas M., Roncero C., Bruguera E., Casas M. (2007). Sistema dopaminérgico y adicciones. REVISIÓN EN NEUROCIENCIA. *REV NEUROL.* 44 (1): 23-31

Dahlqvist P, Rönnbäck A, Risedal A, Nergårdh R, Johansson I, Seckl J. 2003. Effects of postischemic environment on transcription factor and serotonin receptor expression after permanent focal cortical ischemia in rats. *Neuroscience;* 119: 643-652. En Venebra-Muñoz *et al.*, 2011. Efecto del ambiente enriquecido sobre el consumo de nicotina en rata wistar.

Djouma E, Lawrence AJ. (2002). The effect of chronic ethanol consumption and withdrawal on mu-opioid and dopamine D(1) and D(2) receptor density in Fawn-Hooded rat brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 302: 551-9. En Corominas *et al.*, 2007. Sistema dopaminérgico y adicciones.

- Dadmarz M, Vogel WH. (2003). Individual self-administration of nicotine by rats. *Pharmacol Biochem Behav*; 76:425–432.
- Ehrlich M, Sommer J, Canas E, Unterwald E. (2002). Periadolescent mice show enhanced Δ FosB up regulation in response to cocaine and amphetamine. *J. Neurosci.* 22 (21); 9155-9159.
- Feldman RS, Meyer JS, Quenzer LF. (1997). Principles of neuropsychopharmacology. Sunderland, Sinauer. 277-344. En Bahena-Trujillo *et al.*, 2000. Dopamina: Síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central.
- Fernández-Espejo E. (2002). Bases neurobiológicas de la drogadicción. *REV NEUROL.* 34 (7): 659-664.
- Fibiger HC. (1993). Mesolimbic dopamine: an analysis of its role in motivated behavior. *Semin Neurosci*: 321- 27. En Bahena-Trujillo *et al.*, 2000. Dopamina: Síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central.
- File SE, Kenny PJ, Ouagazzal AM. (1998). Bimodal modulation by nicotine of anxiety in the social interaction test: role of the dorsal hippocampus. *Behavioral Neuroscience.* 112, 1423-1429
- Freund TF, Powell JF, Smith AD. (1984). Tyrosine hydroxylase immunoreactive boutons in synaptic contact with identified striatonigral neurons, with particular reference to dendritic spines. *Neurosci.* 13: 1189-215. En Bahena-Trujillo *et al.*, 2000. Dopamina: Síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central.
- Fuster JM. (2002). Frontal lobe and cognitive development. *Journal of Neurocytology.* 31, 373-385.
- Jaffe JH. (1990). Drug addiction and drug use. In Goodman and Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th edition, (A. G. Goodman, T. W. Rall, A. S. Nies, and P. Taylor, Eds.), pp. 522-673. Pergamon Press, New York.
- Galeano P, Blanco E, Logica Tornatore T, Romero J, Holubiec M, Rodríguez de Fonseca F, Capani F. (2015). Life long environmental enrichment counteracts spatial learning, reference and working memory deficits in middle-aged rats subjected to perinatal asphyxia. *Front Behav Neurosci*; 5(406): 1-12. En Venebra-Muñoz *et al.*, 2011. Efecto del ambiente enriquecido sobre el consumo de nicotina en rata wistar.

Goriounova NA, Mansvelder HD. (2012). Nicotine exposure during adolescence leads to short- and long-term changes in spike timing-dependent plasticity in rat prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience*. 32(31):10484-93. En Pastor *et al.*, 2013 La adicción a la nicotina: vulnerabilidad, epigénesis y modelos animales de estudio.

Groenewegen HJ, Wright CI, Beuer AVJ. (1996). The nucleus accumbens: gateway for limbic structures to reach to reachh the motor system?

Green TA., Alibhai IN, Hommel JD, Di Leone R J, Kumar A, Theobald DE, Neve RL, Nestler EJ. (2008). Induction of ICER expression in nucleus accumbens by stress or amphetamine increases behavioral responses to emotional stimuli. En Nestler Eric J. Transcriptional mechanisms of addiction: role of Δ FosB. *Ohilosophical transaction of the royal society*. 2008; 363: 3245-3255

Hadaway P, Alexander B, Coombs R, Beyertein B. (1979). The effect of housing ang gender on preference for morphine-sucrose solutions in rats. *Psycopharmacology*. 66:87-91

Hannigan J, Berman R. (2000). Amelioration of fetal alcohol-related neurodevelopmental disorders in rats: exploring pharmacological and enviromental treatments. *Neurotox Teratol*. 22:103-111

Harris GC. Hummel M, Wimmer M, Mague SD, Aston-Jones G. (2007). Elevations of FosB in the nucleus accumbens during forced cocaine abstinence correlate with divergent changes in reward function. *Neuroscience*. 147: 583-591

Härtel U, Stieber J, Keil U. (1993). The effect of education and professional position on changes in cigarette smoking and alcohol consumption: results of the MONIKA Augsburg cohort study. *Sozial- und Präventivmedizin*. 38: 133-141. En Venebra-Muñoz *et al.* 2011. Efecto del ambiente enriquecido sobre el consumo de nicotina en rata wistar.

Hebb D. (1947). The effects of early experience on problem solving ar maturity. *Am Psychool*. 2: 306-307. En Venebra-Muñoz *et al.*, 2011. Efecto del ambiente enriquecido sobre el consumo de nicotina en rata Wistar.

Herkenham M, Moon-Edley S, Stuart J. (1984). Cell clusters in the nucleus accumbens of the rat and the mosaic relationship of opiate receptors, acetylcholinesterase and subcortical afferent termination. *Neuroscience*; 11:561-93

Heimer L, Zham DS, Churchill L, Kalivas PW, Wohtmann C. (1991). Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience*. 41: 89-125.

Henry DJ, Hu XT, White FJ. (1998). Adaptations in the mesoaccumbens dopamine system resulting from repeated administration of dopamine D1 and D2 receptor-selective agonists: relevance to cocaine sensitization. *Psychopharmacology*; 140: 233-42. En Corominas et al., 2007. Sistema dopaminérgico y adicciones.

Hernández-Espejo E. (2000). ¿Cómo funciona el nucleus accumbens? *REV NEUROL*. 30 (9): 845-849.

Hernández-López S, Bargas J, Surmeier D, Reyes A, Galarraga E. (1997). D1 receptor activation enhances evoked discharge in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type C^{2+} conductance. *J Neurosci*. 17: 3334-42. En Venebra-Muñoz et al., 2011. Efecto del ambiente enriquecido sobre el consumo de nicotina en rata wistar

Huerta-Rivas A.G., Cruz-Martín S. L. (2011). Adicciones y memoria. Vol. VI Número: 69-77. En Pastor V., et al., 2013. La adicción a la nicotina: vulnerabilidad, epigénesis y modelos animales de estudio.

Humphrey PPA. (1997). The characterization and classification of neurotransmitter receptors. *Ann New York Acad Sci*. 182:1-13. Tomado de Bahena-Trujillo et al., 2000. Dopamina: Síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central.

Hyman SE, Malenka RC. (2001). Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat. Rev. Neurosci*. 2: 695-703. En Galeote-González L. 2008. Tesis Doctoral; Participación del sistema opioide endógeno en la adicción a la nicotina.

Hymovitch B. (1952). The effects of experimental variations on problem solving in the rat. *J Comp Physiol Psychol*. 45: 313-321. En Venebra-Muñoz et al., 2011. Efecto del ambiente enriquecido sobre el consumo de nicotina en rata Wistar.

Izenwasser S, Thompson-Montgomery D, Deben SE, Chowdhury IN, Werling LL. (1998). Modulation of amphetamine-stimulated (transporter mediated) dopamine release in vitro by sigma2 receptor

agonists and antagonists. *Eur J Pharmacol.* 346: 189-96. En Corominas *et al.*, 2007. Sistema dopaminérgico y adicciones.

Jackson DM, Westlind-Danielsson A. (1994). Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioral aspects. *Pharmacol Ther.* 64: 291-369. En Bahena-Trujillo *et al.*, 2000. Dopamina: Síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central.

Jongen-Rêlo AL, Voorn P, Groemewegen HJ. (1994). Immunohistochemical characterization of the shell and core territories of nucleus accumbens in the rat. *Eur J Neurosci.* 6: 1255-64. En Hernández-Espejo E. 2000. ¿Cómo funciona el nucleus accumbens?

Johansen JP, Cain CK, Ostroff LE, LeDoux JE. (2011). Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell*, 147,509-24. En Pastor *et al.* 2013. La adicción a la nicotina: vulnerabilidad, epigénesis y modelos animales de estudio.

Johansson O, Hokfelt T. (1992). Nucleus accumbens: transmitter histochemistry with special reference to peptide-containing neurons. En Deutch AY, Cameron DS. Pharmacological characterization of dopamine system in the nucleus accumbens core and shell. *Neuroscience.* 46-56.

Johnson EM, Traver KL, Hoffman SW, Harrison CR, Herman JP. (2013). Environmental enrichment protects against functional deficits caused by traumatic brain injury. *Front Behav Neurosci.* 7(44):1-7. En Venebra-Muñoz *et al.*, 2011. Efecto del ambiente enriquecido sobre el consumo de nicotina en rata wistar.

Kobayashi S, Ohashi Y, Ando S. 2002. Effects of enriched environments with different durations and starting times on learning capacity during aging in rats assessed by a refined procedure of the Hebb-Williams maze task. *J Neurosci Res*; 70: 340-346. En Venebra-Muñoz *et al.*, 2011. Efecto del ambiente enriquecido sobre el consumo de nicotina en rata wistar.

Kolb B, Gorny G, Söderpalm AHV, Robinson TE. (2003). Environmental complexity has different effects on the structure of neurons in the prefrontal cortex versus the parietal cortex or nucleus accumbens. *Synapse.* 48: 149–153. En Venebra-Muñoz *et al.*, 2014 Enriched environment attenuates nicotine self-administration and induces changes in DFosB expression in the rat prefrontal cortex and nucleus accumbens.

Koob GF and Volkow ND. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*. 35; 217-38.

Konkle AT, Kentner AC, Baker SL, Stewart A, Bielajew C. (2010). Environmental-enrichment-related variations in behavioral, biochemical and physiologic responses of sprague-dawley and long Evans rats. *J Am Assc Lab Anim Sci*. 49: 427-436. En Venebra-Muñoz *et al.*, 2011. Efecto del ambiente enriquecido sobre el consumo de nicotina en rata wistar.

Ledley FD, Grenett HE, Woo SLC. Structure of aromatic amino acid hydrolases. En Bahena-Trujillo *et al.*, 2000. Dopamina: Síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central.

Leggio MG, Mandolesi L, Federico F, Spirito F, Ricci B, Gelfo F. 2005. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav Brain Res*; 163: 78-90.

Leviel V, Gobert A, Guibert B. (1989). Direct observation of dopamine compartmentation in striatal nerve terminals by 'in vivo' measurement of the specific activity of released dopamine. *Brain Res*; 499:205-13. En Bahena-Trujillo *et al.*, 2000. Dopamina: Síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central.

Levitt M, Spector S, Sjoerdsma A, Udenfriend S. 1965. Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart. *J Pharmacol Exp Ther*; 23:1493-501. En Bahena-Trujillo *et al.*, Dopamina: Síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central.

Lledo PM, Alonso M., Grubb M. (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature Rev*. 7:179-193.

Mackay J, Eriksen M. (2002). The tobacco atlas. UK: World health organization.

Martonciková M, Lievajová K, Orendáková J, Blasko J, Raceková E. Odor 2011. Enrichment influences neurogenesis in the rostral migratory. 113(3):326-332.

Meredith GE, Agolia R, Arts M, Groenewegen HJ, Zham DS. (1992). Morphological differences between projection neurons of the core and shell in the nucleus accumbens of the rat. *Neuroscience*. 50: 149-62.

Micó JA, Moreno Brea MR, Roca Vinardell A, Rojas Corrales MO, Ortega Alvaro A. (2000). Neurobiología de la Adicción a nicotina. *Prevención del tabaquismo* 2 (2).

Mogenson GJ, Jones, Yim CY. (1980). From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Psychobiol.* 14, 607-97. En Hernández-Espejo E. 2000. ¿Cómo funciona el nucleus accumbens?

Munakata Y, Casey BJ, Diamond A. (2004). Developmental cognitive neuroscience: Progress and potential, *Trends in Cognitive Sciences.* 8; 122-128.

Nagatsu T. (1981). Biopterin cofactor and regulation of monoamine-synthesizing mono-oxygenase. *Trends Pharmacol Sci.* 2: 276-9. En Bahena-Trujillo *et al.*, 2000. Dopamina: Síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central.

Nagatsu T, Levitt M, Uderfriend S. (1964). Tyrosine hydroxylase: the initial step in norepinephrine biosynthesis. *J Biol Chem;* 239:2910-7. En Bahena-Trujillo *et al.*, 2000. Dopamina: Síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central.

Nestler E. (2008). Transcriptional mechanisms of addiction: role of Δ FosB. *Philosophical transaction of the royal society.* 363: 3245-3255

Nestler E, Barrot M, Self D. (2001). Δ FosB: A sustained molecular switch for addiction. *Proc Natl Acad Sci.* 98 (20): 11042-11046

Nithianantharajah J, Hannan A. (2006). Enriched environments experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Rev. Neurosci.* 7:697-709.

Patel TR. 2012. Environmental enrichment: aging and memory. *Yale J Biol Med.* 85(4): 491-500. En Venebra-Muñoz *et al.*, 2011. Efecto del ambiente enriquecido sobre el consumo de nicotina en rata wistar.

Paxinos G, Watson C. (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press.* USA

O' Donnell P, Grace AA. (1993). Dopaminergic modulation of dye coupling between neurons in the core and shell regions of the nucleus accumbens. *J Neurosci;* 13: 3456-71. En Hernández-Espejo E. 2000. ¿Cómo funciona el nucleus accumbens?

O' Donnell P, Grace AA. (1998). Phencyclidine interferes with the hippocampal gating of nucleus accumbens neuronal activity in vivo. *Neuroscience*. 87: 823-30. En Hernández-Espejo E. 2000. ¿Cómo funciona el nucleus accumbens?

O' Donnell P, Grace AA. (1995). Synaptic interactions among excitatory afferents to nucleus accumbens neurons: hippocampal gating of prefrontal cortical input. *J Neurosci*; 15: 3622-39. En Hernández-Espejo E. 2000. ¿Cómo funciona el nucleus accumbens?

O'Donovan KJ, Tourtellotte WG, Millbrandt J, Baraban JM. (1999). The EGR family of transcription regulatory factors: progress at the interface of molecular and systems neuroscience. En Nestler, 2008. Transcriptional mechanisms of addiction: role of Δ FosB.

Pastor V, Vázquez P, Corapi E, Bernabeu R. (2013). La adicción a la nicotina: vulnerabilidad, epigénesis y modelos animales de estudio. *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento*. 5 (2) 61-73.

Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. (1978). Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol*. 47: 379-391.

Renoir T, Pang TY, Hannan AJ. (2012). Effects of environmental manipulations in genetically targeted animal models of affective disorders. *Neurobiol Dis*; doi: 10.1016/j.nbd.2012.04.003

Robbins-Trevor W. (1992). Milestones in dopamine research. *Semin. Neurosci*. 4:93-7. En Bahena-Trujillo et al., Dopamina: Síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central.

Robinson TE, Berridge KC. (2008). The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philos Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 363, 3137-46. En Pastor et al., 2013. La adicción a la nicotina: vulnerabilidad, epigénesis y modelos animales de estudio.

Rosenzweig MR, Krech D, Bennett E, Diamond, M. (1962). Effects of environmental complexity and training on brain chemistry and anatomy: a replication and extension. *J Comp Physiol*. 55: 429-437. En Venebra-Muñoz et al., 2011. Efecto del ambiente enriquecido sobre el consumo de nicotina en rata wistar.

Saito S, Kobayashi S, Ohashi Y, Igarashi M, Komiya Y, Ando S. (1994). Decreased synaptic density in aged brains and its prevention by rearing under enriched environments as revealed by synaptophysin, contents. *J Neurosci Res*; 39: 57-62.

Schoenbaum G, Roesch M., Stalnaker T. (2006). Orbitofrontal cortex, decision-making and drug addiction. *Trends neurosci.* 29 (2): 116-124.

Schutz W. (2011). Potential vulnerabilities of neuronal reward, risk, and decision mechanisms to addictive drugs. *Neuron*, 69,603-17. En Pastor *et al.*, 2013. La adicción a la nicotina: vulnerabilidad, epigenesis y modelos animales de estudio.

Schutz W, *et al.* (1992). Neuronal activity in monkey ventral striatum related to the expectation of reward. *J. Neurosci*; 12: 4595-610. En Hernández-Espejo, 2000. ¿Cómo funciona el nucleus accumbens?

Segovia G, Del Arco A, Garrido P, De Blas M, Mora F. (2008). Environmental enrichment reduces the response to stress of the cholinergic system in the prefrontal cortex during aging. *Neurochem int.* 52 (6): 1198-1203.

Segovia G, Yagüe AG, García-Verdugo JM, Mora F. (2006). Environmental enrichment promotes neurogenesis and changes the extracellular concentrations of glutamate and GABA in the hippocampus of aged rats. *Brain Res Bull.* 70:8-14. En Venebra-Muñoz *et al.*, 2011. Efecto del ambiente enriquecido sobre el consumo de nicotina en rata wistar.

Setter C, Peter R, Siegrist J, Hort W. (1998). Impact of school and vocational education on smoking behaviour: results from a large-scale study on adolescents and young adults in Germany. *Sozial- und Präventivmedizin* 43: 133-40.

Shippenberg TS, Elmer GI. (1998). The Neurobiology of opiate reinforcement. *Critical Reviews in Neurobiology*; 12: 267-303. En Fernández-Espejo, 2002. Bases neurobiológicas de la drogadicción.

Sibley DR, Leff SE, Creese I. (1982). Interactions of novel dopaminergic ligands with D-1 and D-2 dopamine receptors. *Life Sci.* 31:637-45. En Bahena-Trujillo *et al.*, Dopamina: Síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central.

Sokoloff P, Guillin O, Díaz J, Carroll P, Griffon N. (2002). Brain-derived neurotrophic factor controls dopamine D3 receptor expression: implications for neurodevelopmental psychiatric disorders. *Neurotox Res.* 4: 671-8. En Corominas *et al.*, 2007. Sistema dopaminérgico y adicciones.

Solinas M, Thiriet N, El Rawas R, Lardeux V, Jaber M. (2009). Environmental enrichment during early stages of life reduces the behavioral, neurochemical, and molecular effects of cocaine. *Neuropsychopharmacology.* 34:1102–1111.

Sozda CN, Hoffman AN, Olsen AS, Cheng JP, Zafonte RD, Kline AE. (2010). Empirical comparison of typical and atypical environmental enrichment paradigms on functional and histological outcome after experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 27: 1047-1057. En Venebra-Muñoz *et al.*, 2011. Efecto del ambiente enriquecido sobre el consumo de nicotina en rata wistar.

Sun H, Zhang J, Zhang L, Liu H, Zhu H, Yang Y. (2010). Environmental enrichment influences BDNF and NR1 levels in the hippocampus and restores cognitive impairment in chronic cerebral hypoperfused rats. *Curr Neurovasc Res;* 7: 268-280.

Spanagel R, Weiss F. (1999). The dopamine hypothesis of reward: past and present status. *Trend Neurosci.* 22: 521-7 En Fernández-Espejo, 2002. Bases neurobiológicas de la drogadicción.

Stolerman JF, Fink R, Jarvik ME. (1973). Acute and chronic tolerance to nicotine measured by activity in rats. *Psychopharmacologia.* 30; 329-342.

Torasdotter M, Metsis M, Henriksson BG, Winblad B, Mohammed A. (1998). Environmental enrichment results in higher levels of nerve growth factor mRNA in the rat visual cortex and hippocampus. *Behav Brain Res.* 93:83-90.

Ulery PG, Rudenko, G, Nestler, E. J. (2006). Regulation of Δ FosB stability by phosphorylation. *J. Neurosci.* 26, 5131–5142. (doi:10.1523/JNEUROSCI.4970-05.2006)

Van PraagBH, Kempermann G, Gage H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nat Rev Neurosci.* 1. En De Blas, 2011. Glucocorticoides e interacción de neurotransmisores en el núcleo accumbens: efecto del enriquecimiento ambiental y del envejecimiento.

Vasconcelos SM, Macedo DS, Lima LO, Sousa FC, Fonteles MM, Viana GS. (2003). Effect of one-week ethanol treatment on monoamine levels and dopaminergic receptors in rat striatum. *Braz J Med Biol Res.* 36: 503-9. En Corominas *et al.*, 2007. Sistema dopaminérgico y adicciones.

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 rata wistar. *Universidad y ciencia.* 27 (1).

Venebra-Muñoz A, Corona-Morales A, Santiago-García J, Melgarejo-Gutiérrez M, Caba M, García-García F. (2014). Enriched environment attenuate nicotine self-administration and induce changes in Δ FosB expression in the rat prefrontal and nucleus accumbens. *Neuroreport.* 00: 000–000

Volkow ND, Fowler JS. (2000). Addiction, a disease of compulsion and drive: involvement of the orbitofrontal cortex. *Cereb. Cortex.* 10: 318-325. En Galeote, 2008. Tesis Doctoral; Participación del sistema opioide endógeno en la adicción a la nicotina.

Wallace DR, Mactutus CF, Booze RM. (1996). Repeated intravenous cocaine administration: locomotor activity and dopamine D2/D3 receptors. *Synapse.* 23: 152-63. En Corominas *et al.*, 2007. Sistema dopaminérgico y adicciones.

Weissenborn R, Robbins TW, Everitt BJ. (1997). Effects of medial prefrontal or anterior cingulate cortex lesions on responding for cocaine under fixed-ratio and second-order schedules of reinforcement in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 134: 242-257. En Galeote, 2008. Tesis Doctoral; Participación del sistema opioide endógeno en la adicción a la nicotina.

Weiner N, Molinoff PB. (1989). PB eds. Basic Neurochemistry. 4th Ed. New York: *Raven Press.* 233-51. En Bahena-Trujillo *et al.*, 2000. Dopamina: Síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central.

Wilson C, Nomikos GG, Maria Co, Hans C, Fibiger. (1995). Dopaminergic correlates of motivated behavior: importance of drive. *J Neurosci;* 15: 5169-78. En Hernández-Espejo E. 2000. ¿Cómo funciona el nucleus accumbens?

Will B, Galani R, Kelche Ch, Rosenzweig M. 2004. Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002). *Progress in Neurobiology* 72: 167-82. En Venebra-Muñoz *et al.* (2011). Efecto del ambiente enriquecido sobre el consumo de nicotina en rata wistar.

World Health Organization. (2010). Atlas 2010 of drug of abuse around the world. En Pastor V., Vázquez P., Corapi E. y Bernabeu R. La adicción a la nicotina: vulnerabilidad, epigénesis y modelos animales de estudio.

Xue G, Lu Z, Levin IP, Weller JA, Li X, Bechara A. (2009). Functional dissociations of risk and reward processing in the medial prefrontal cortex. *Cerebral Cortex*. 19, 1019-27. En Pastor *et al.*, 2013. La adicción a la nicotina: vulnerabilidad, epigénesis y modelos animales de estudio.

Xiao C, Zhang J, Krnjević K, Ye JH. (2007). Effects of ethanol on midbrain neurons: role of opioid receptors. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. 31(7):1106-13.

Zhou Q-Z, Grandy DK, Thambi L, Kushner JA, Van Tol HHM, Cone R. (1990). Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors. *Nature*. 347: 76-80. En Bahena-Trujillo *et al.*, 2000 Dopamina: Síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central.

Zubedat S, Aga-Mizrachi S, Simerblit-Sabba A, Ritter A, Nachmani M, Avital A. (2015). Methylphenidate and environmental enrichment ameliorate the deleterious effects of prenatal stress on attention functioning. *Stress*. 18: 1-9. En Venebra-Muñoz *et al.*, 2011. Efecto del ambiente enriquecido sobre el consumo de nicotina en rata Wistar.