



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“Diferencias cerebrales en el autoconsumo  
y consumo inducido de nicotina en ratas  
Wistar”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**

**B I Ó L O G A**

**P R E S E N T A:**

**Perla Lizbeth Huitrón Garay**

**DIRECTOR**

**Dr. Arturo Venebra Muñoz**



**Toluca, Estado de México, 2015**

## INDICE

RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
ANTECEDENTES .....	10
SISTEMA DOPAMINÉRGICO DE LA RECOMPENSA.....	10
Dopamina.....	10
Sistema mesocorticolímbico .....	12
NÚCLEO ACUMBENS .....	12
CORTEZA PREFRONTAL.....	14
Nicotina en el sistema nervioso.....	16
Efecto de la nicotina en ratas .....	17
$\Delta$ FosB.....	19
AMBIENTE ENRIQUECIDO .....	21
OBJETIVOS .....	26
OBJETIVOS ESPECIFICOS .....	26
MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
ANIMALES.....	27
CONFIGURACIÓN DE AMBIENTES.....	27
DOSIS .....	28
GRUPOS EXPERIMENTALES .....	28
Experimento 1. Efectos del autoconsumo de nicotina en la expresión de $\Delta$ FosB en CPFy NAc en ratas macho.....	28
Experimento 2. Efectos del consumo inducido de nicotina en la expresión de $\Delta$ FosB en CPF y NAc en ratas hembras en SE y AE .....	29
INMUNOHISTOQUÍMICA .....	30
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	32
RESULTADOS.....	33

Comparación de la inmunoreactividad entre los grupos de auto-consumo machos (experimento 1) y consumo inducido hembras (experimento 2).....	33
Comparación de la Inmunohistoquímica entre los grupos de Consumo inducido por ambiente (experimento 2). .....	35
DISCUSIÓN.....	43
Comparación de la inmunoreactividad entre los grupos de auto-consumo machos (experimento 1) y consumo inducido hembras (experimento 2).....	43
Comparación de la Inmunohistoquímica entre los grupos de consumo inducido por ambiente (experimento 2). .....	44
CONCLUSIÓN .....	47
LITERATURA CITADA .....	48

#### INDICE DE GRAFICAS Y TABLAS

Figura 1. A, síntesis de dopamina .....	11
Figura 2. Conexiones del Núcleo Acumbens Core y Shell con las regiones del sistema mesocorticolímbico. ....	14
Figura 3. miembro de la familia de los factores de transcripción Fos en el que se muestra el comportamiento de la isoforma $\Delta$ FosB. ....	20
Figura 4. Ambientes de alojamiento.....	23
Figura 5. Esquema de los niveles utilizados para realizar la inmunohistoquímica para la detección de $\Delta$ fosB. ....	32
Figura 6. Comparación entre el experimento 1 y 2 para inmunoreactividad $\Delta$ FosB en la corteza prefrontal.....	34
Figura 7. Comparación del experimento 2 para inmunoreactividad $\Delta$ FosB en corteza .....	36
Figura 8. Comparación del experimento 2 para inmunoreactividad $\Delta$ FosB en núcleo acumbens core .....	37
Figura 9. Comparación del experimento 2 para inmunoreactividad $\Delta$ FosB en núcleo acumbens shell.....	39
Figura 10. Inmunoreactividad a $\Delta$ FosB individual por ambiente en la corteza prefrontal..	40
Figura 11. Inmunoreactividad $\Delta$ FosB individual por ambiente en núcleo acumbens Core	41
Figura 12. Inmunoreactividad $\Delta$ FosB individual por ambiente en núcleo acumbens shell .....	41
Figura 13. Células positivas a $\Delta$ FosB en distintas áreas cerebrales. ....	42

## RESUMEN

En México, el consumo de tabaco ocasiona más de 60 000 muertes al año según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2012). Las principales tendencias del tabaquismo en México son: el inicio del consumo del tabaco a una menor edad, mayor número de menores de edad que fuman, y un incremento en la prevalencia del consumo del tabaco en mujeres (Kuri-Morales et al., 2006).

El deterioro de la toma de decisiones es una de las características claves de la adicción, ya que la corteza prefrontal desempeña un papel importante en las funciones cognitivas implicadas en la toma de decisiones. La experiencia de vida y el ambiente influyen en el desarrollo de adicciones a las drogas principalmente en edades tempranas. La exposición a un ambiente enriquecido (AE) durante las primeras etapas de la vida reduce los efectos de las drogas de abuso y disminuye la vulnerabilidad a desarrollar adicción. En este trabajo se planteó conocer la respuesta de la corteza prefrontal ante la misma dosis de nicotina administrada de dos formas distintas: autoconsumo y consumo inducido en un ambiente estándar. Así como la respuesta de la corteza prefrontal y el núcleo acumbens ante el consumo inducido en un ambiente estándar y un ambiente enriquecido. Esto mediante la comparación del número de neuronas inmunoreactivas  $\Delta$ FosB presentes en cortes realizados en la corteza prefrontal y núcleo acumbens, de animales criados y mantenidos en ambientes estándar y ambiente enriquecido a los cuales se les dio a beber o se les inyectó la misma dosis de nicotina durante 20 días.

En los resultados se encontró un número mayor de neuronas inmunoreactivas  $\Delta$ FosB en la corteza prefrontal en los cortes de ratas que consumieron nicotina bebida en comparación con los que se les inyectó la nicotina. Por otra parte, también se encontró un número mayor de neuronas inmunoreactivas  $\Delta$ FosB en corteza prefrontal y núcleo acumbens en los cortes de organismos criados en ambiente enriquecido con inyección de nicotina en comparación con los criados en ambiente estándar con inyección de nicotina. Estos resultados se inclinan a favor de que la corteza prefrontal es la responsable de la toma de decisiones implicadas en el abuso de drogas, pero estos resultados no son del todo concluyentes ya que en este trabajo se encontraron distintas variables que abren un nuevo panorama sobre el papel de la corteza prefrontal en las adicciones.

## INTRODUCCIÓN

El consumo de tabaco sigue siendo la principal causa de muerte evitable, matando a casi 6 millones de personas cada año incluyendo 600 000 no fumadores que mueren a causa de la exposición del humo del tabaco según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2013. Si la tendencia actual continúa, para el año 2030 el tabaco mataría a más de 8 millones de personas en el mundo, el 80% de estas muertes ocurrirá en personas que viven en países de medianos o bajos ingresos (OMS, 2011). En México existen 17.3 millones de fumadores de los cuales 1.7 millones son adolescentes de entre 12 a 17 años, el resto 15.6 millones son adultos de 18 a 65 años según la Encuesta Nacional de Adicciones (ENA) en el 2011. Las principales afecciones por el consumo del tabaco son: cáncer de pulmón, laringe, riñón, vejiga, estómago, colon y cavidad oral; así como la leucemia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, cardiopatía isquémica, aborto y parto prematuro, defectos de nacimiento e infertilidad, además de la adicción a la sustancia activa del tabaco, “la nicotina” (Centers for Disease Control And Prevention, 2010). En México el infarto agudo del miocardio, las enfermedades cerebro vasculares, las respiratorias crónicas y el cáncer de pulmón causadas por la exposición al tabaco se encuentran dentro de las diez primeras causas de mortalidad (ENA, 2011).

La experiencia de vida y el ambiente influyen en el desarrollo de adicciones a las drogas principalmente en edades tempranas (Gómez *et al.*, 2012; Nader *et al.*, 2012). De manera interesante la exposición a un ambiente enriquecido (AE) durante las primeras etapas de la vida, reduce los efectos de las drogas de abuso y disminuye la vulnerabilidad a desarrollar adicción (Nader *et al.*, 2012; Solinas *et al.*, 2010), AE es un modelo de vivienda que ofrece una mayor estimulación física, cognitiva, sensorial (Mesa-Gresa y Pérez-Martínez, 2012; Toht *et al.*, 2011) y de integración social, que inducen a cambios morfológicos y fisiológicos en el cerebro

(Cao *et al.*, 2010b), dando una respuesta benéfica sobre el comportamiento (Reichmann *et al.*, 2013) y la plasticidad cerebral (Leger *et al.*, 2012; Reichmann *et al.*, 2013, Leger *et al.*, 2012; Valero *et al.*, 2011; Schloesser *et al.*, 2010). Como resultado se muestra una mejora en la memoria (Leger *et al.*, 2012), y la reducción de los efectos del estrés (Reichmann *et al.*, 2013; Schloesser *et al.*, 2010).

Nuestro grupo se ha enfocado en analizar el efecto que tiene la nicotina sobre el cerebro ante distintas variables ambientales (Venebra-Muñoz *et al.*, 2011). Pero aún quedan muchas variables sin analizar. Particularmente nos interesa conocer la respuesta de la corteza prefrontal y el núcleo acumbens ante el auto-consumo y el consumo inducido de nicotina en un ambiente enriquecido, ya que como se sabe la corteza prefrontal está implicada en el procesamiento de la toma de decisiones por lo cual pensamos que debe de activarse de forma diferencial si el individuo consume la droga o en su defecto se le obliga a consumirla.

## ANTECEDENTES

### SISTEMA DOPAMINÉRGICO DE LA RECOMPENSA

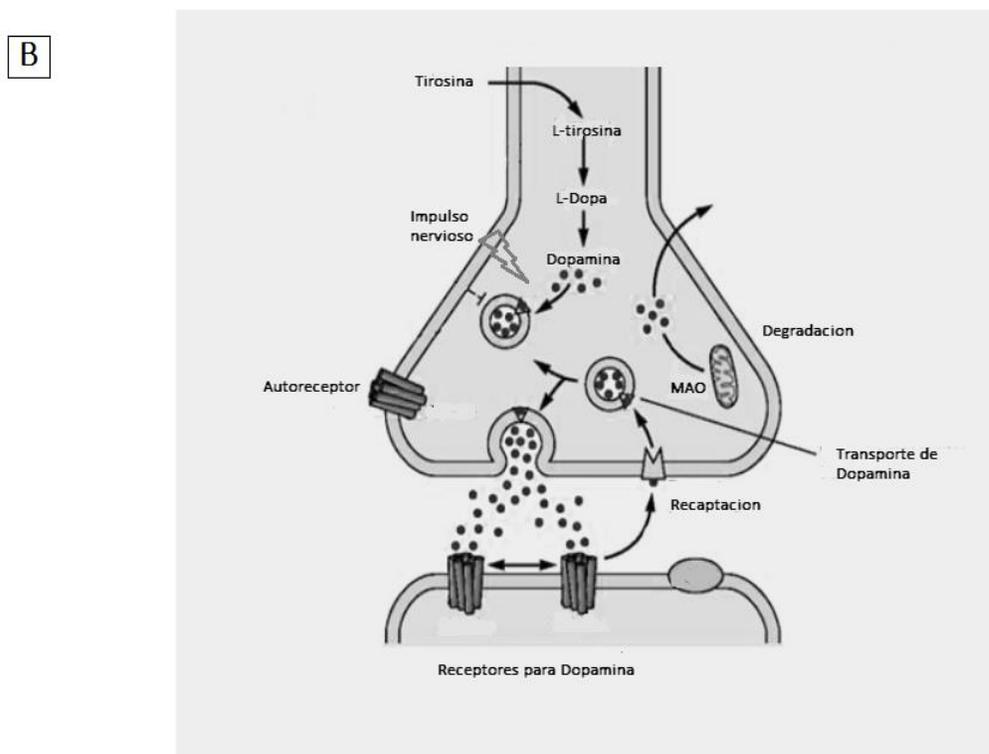
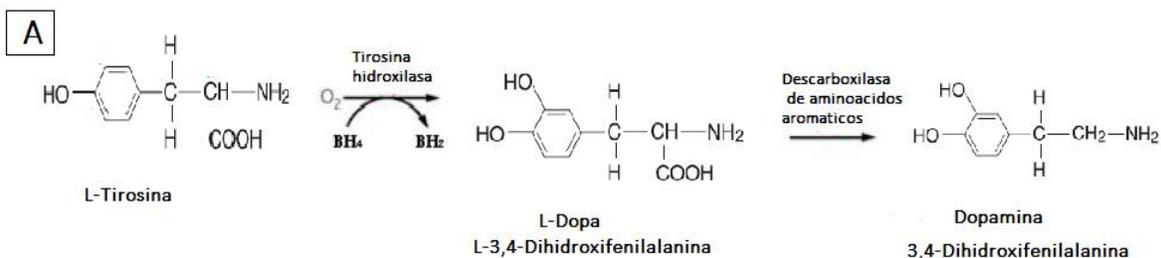
#### Dopamina

La dopamina (DA), es un neurotransmisor (catecolaminico) muy importante del sistema nervioso central. Las catecolaminas son compuestos formados por un núcleo catecol (anillo de benceno con dos hidrógenos) y una cadena de etilamina o alguno de sus derivados en los que también se incluyen la adrenalina y noradrenalina (Bahema-Trujillo, 2000). Las enzimas responsables de la síntesis de la DA es la tirosinahidroxilasa (TH) y la L-DOPA descarboxilasa (Cooper *et al.*, 2003). La Fenilalanina o Tirosina son convertidas a 3,4-dihidroxifenilalanina (L-dopa) por la TH, después la L dopa es metabolizada a DA por la enzima dopa descarboxilasa (Koob, 1999), como se muestra en la figura 1A.

Las neuronas dopaminérgicas se encuentran en mayor cantidad en la sustancia negra y área tegmental ventral (VTA) (Wanat *et al.*, 2010), estas neuronas mandan sus proyecciones a la corteza prefrontal (CPF), núcleo acumbens (NAc), putamen caudado (CPu), núcleo tegmental pedunculo pontino (PPT), amígdala, tegmento dorsal lateral (LDT,) septum lateral e hipocampo (Geisler *et al.*, 2007; Wanat *et al.* 2010). En cuanto a receptores, existen cinco subtipos de receptores dopaminérgicos, que se clasifican en dos familias D1 y D2 basados en la estimulación o inhibición respectivamente (Bahema-Trujillo, 2000), los receptores D1 (subtipos D1 y D5) activan a la proteína adenilatociclasa, los receptores D2 (subtipo D2, D3 y D4) inhiben la adenilatociclasa (Bahema-Trujillo, 2000; koob, 1999).

La nicotina estimula la liberación de dopamina en el NAc shell, favoreciendo el proceso de aprendizaje asociado al estímulo-recompensa con propiedades hedónicas (Di Chiara y Bassareo 2006) y bajo un esquema de condicionamiento

Pavloviano (Di Chiara, 1999, Di chiara y Bassareo, 2006). Sugiriendo que estos mecanismos de aprendizaje asociativo se relacionan con la transmisión de dopamina en diferentes subdivisiones del NAc (Di chiara, 2000). Sin embargo esta propiedad sufre rápidamente habituación a la exposición repetida a esta recompensa (Di chiara y Bassareo, 2006).



**Figura 1.** A, síntesis de dopamina a partir de la Tirosina. B, liberación de Dopamina. Imagen modificada de, Schwartz y Jessell, (2002).

## **Sistema mesocorticolímbico**

En el cerebro de los vertebrados, el sistema mesocorticolímbico (sistema de la recompensa) esta críticamente involucrado en los efectos de varias drogas de abuso (Markou, 2008). Un componente de este sistema es la proyección dopaminérgica desde el VTA para el NAc, la amígdala y la CPF. La actividad de estas neuronas dopaminérgicas del VTA está regulada por la liberación del neurotransmisor excitatorio glutamato que se libera de las proyecciones procedentes de varios sitios, incluyendo el NAc y la CPF (Koop y Le, 2006; Markou, 2008). Las interneuronas inhibitorias GABAérgicas ubicadas dentro del VTA y el NAc y proyecciones colinérgicas de los núcleos del tronco cerebral al VTA también regulan la actividad del sistema mesolímbico (Markou, 2008).

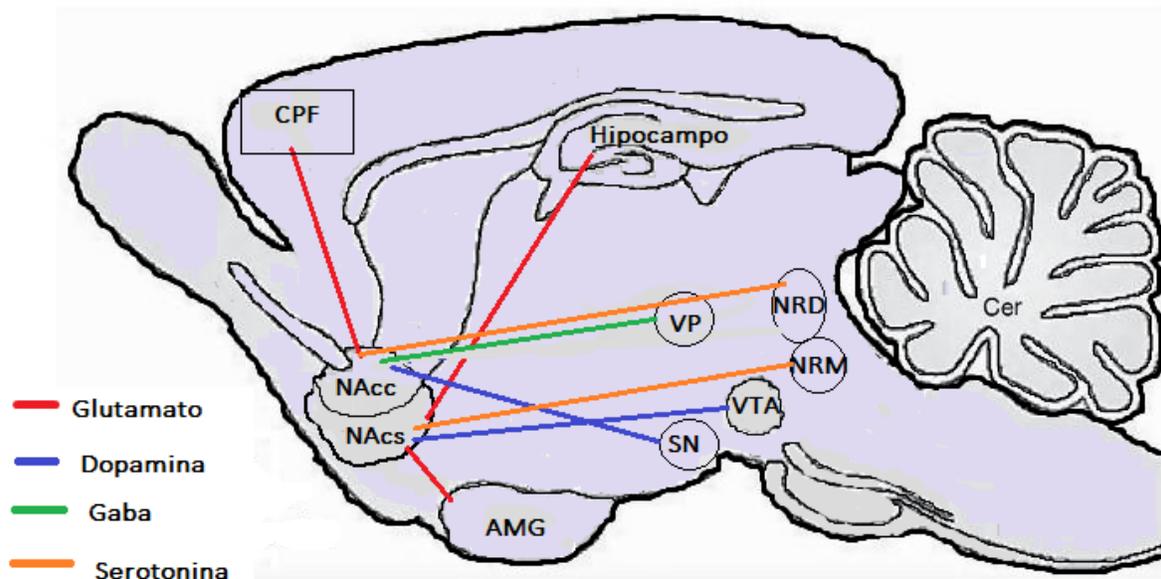
## **NÚCLEO ACUMBENS**

El núcleo acumbens (NAc) en ratas es un conjunto de neuronas que está localizado entre 0.7-2.7mm de bregma (Paxinos y Watson, 1998). Este núcleo se ha involucrado en la integración entre motivación y acción motora (Fernández-Espejo, 2000) funcionando como un enlace crítico entre los circuitos corticales e hipotálamo / tronco cerebral, que controlan el impulso de las recompensas primarias, como la alimentación y el sexo (Di chiara, 2002; Harris, 2007), además de regular el aprendizaje y la ejecución de respuestas motoras adaptativas involucradas en la adquisición de dichas recompensas (Cardinal, 2002, Harris, 2007), estos comportamientos están relacionados con la auto administración, la búsqueda y la recaída a las drogas de abuso (Kalivas y Volkow, 2005; Fuchs *et al.*, 2008; Howard *et al.*, 2009).

El NAc se encuentra dividido en dos sub-regiones anatómicas: la corteza y el centro. La corteza (Shell) es una región límbica (Fernández-Espejo, 2000), que

está involucrada en la motivación de la recompensa (Harris *et al.*, 2007), es especialmente sensible a las recompensas primarias y a las drogas de abuso (Di Chiara *et al.*, 1993). Presenta aferencias dopaminérgicas del VTA, así como glutamatérgicas del hipotálamo y la amígdala (Fernández-Espejo, 2000). El centro (core) que está involucrada en el aprendizaje y ejecución de respuestas motoras (Harris *et al.*, 2007) recibe conexiones glutamatérgicas de la corteza motora CPF y conexiones dopaminérgicas de la sustancia negra y el VTA (Fernández-Espejo, 2000) (Fig. 2).

El 95 % de las neuronas del shell son neuronas espinosas medianas (MSN) (Grueter *et al.*, 2013, O'Donnell y Grace, 1995), que poseen campos detriticos con entradas hipocámpicas, amigdalinas y prefrontocorticales (Fernandez-Espejo, 2000). Estas neuronas se pueden subdividir en dos poblaciones, MSN de vía directa que expresan predominantemente receptores de dopamina D1, y MSN de vía indirecta que expresan predominantemente receptores de dopamina D2 (Grueter *et al.*, 2012, Lüscher *et al.*, 2011). Los receptores dopaminérgicos D1 actúan en cooperación con los receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA) para glutamato pero solo en condiciones de estado electrofisiológico alto (Levine, 1996). Cuando las neuronas se encuentran en estado electrofisiológico bajo, los receptores glutamatergicos NMDA están bloqueados por  $Mg^{2+}$  y no hay interacción D1-NMDA, por lo que predomina la acción dopaminérgica D2 (Fernandez-Espejo, 2000), es decir inhibitoria. Cuando las células se sitúan en estado alto, tras una despolarización mantenida, se remueve el bloqueo con  $Mg^{2+}$  y se activan los canales NMDA facilitando el disparo neuronal, y activando aún más los canales NMDA y los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L, de esta forma la DA actúa como un neuro estabilizador en los estados fisiológicos bajos o altos de las neuronas del shell (Fernández-Espejo, 2000).



**Figura 2.** Conexiones del Núcleo Acumbens Core y Shell con las distintas regiones del sistema mesocorticolímbico. Shell recibe entradas glutamatérgicas desde el hipocampo y la amígdala, aferencias dopaminérgicas desde el VTA y serotoninérgicas del rafe medial. Core recibe aferencias glutamatérgicas de la corteza motora, dopaminérgicas de la sustancia negra, GABAérgicas de salida hacia el palido ventral que forma parte de los bucles motores cortico-estriado-palido-talamico de carácter extrapiramidal y serotoninérgicas del rafe dorsal. VP, palido ventral. NRD, núcleo dorsal del rafe. SN, sustancia negra.

## CORTEZA PREFRONTAL

La Corteza Prefrontal (CPF) fue descrita originalmente como una región cortical con una fuerte interacción recíproca con el núcleo mediodorsal del tálamo (NMD) (Sketee, 2002). La CPF se compone principalmente de neuronas piramidales glutamatérgicas excitatorias que se encuentran bajo un control estricto por las interneuronas GABAérgicas inhibitorias locales (George y Koob 2010; Sketee 2002). Las diferentes regiones de la corteza envían y reciben conexiones altamente organizadas con los ganglios basales a través de los bucles cortico-estriado-talamo-palido-corticales y cortico-palido-nigro-talamo-cortical, a través de sus diferentes sub regiones la CPF puede controlar casi todas las regiones

subcorticales a través de sus eferencias y aferencias (George y Koob 2010). La CPF puede dividirse en tres regiones, medial, dorsal o lateral y frontal u orbital, basado en la inervación del NMD (Steketee, 2002). La corteza prefrontal medial (mCPF) está relacionada con el sistema de recompensa y toma de decisiones arriesgadas y con los comportamientos de impulsividad relacionados con el abuso de drogas (George y Koob, 2010; Perry *et al.*, 2011; Steketee, 2002; Xue *et al.*, 2009). La mCPF se puede dividir en región cingular, área prelimbica y área infralimbica (Steketee, 2002). El área prelimbica es un lugar de convergencia de proyecciones procedentes del hipotálamo, el núcleo amigdalino, la corteza entorrinal y el área infralimbica, lo cual le hace tener una estrecha relación con la corteza orbital y en algunos trabajos se les identifica como corteza orbitomedial que tiene dominio límbico de la corteza prefrontal (Vázquez, 2008). La corteza prefrontal orbital (OFC) se asocia con el valor de recompensa y es importante para el aprendizaje y el control inhibitorio, jugando un papel importante en la toma de decisiones, especialmente en las decisiones que implican la adaptación del comportamiento debido a los estímulos de castigo, además interviene en la vulnerabilidad en el abuso de drogas (Perry *et al.*, 2011)

## **NICOTINA**

La nicotina es un alcaloide psicoestimulante que se encuentra en una amplia variedad de plantas solanáceas, especialmente en el tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Da Silva *et al.*, 2013). La cantidad de nicotina en las hojas secas de tabaco varía de 4% a 8% (Hinds 2012; IPCS-INCHEM 2012). La nicotina puede captarse a través de la mucosa oral, la piel, el tracto gastrointestinal y la vejiga, pero es en los pulmones donde su absorción es mayor (Mathieu-Kia *et al.*, 2002; Yildiz, 2004). La nicotina que se capta se transporta por la sangre, atraviesa la barrera hematoencefálica y llega a las neuronas cerebrales en pocos segundos (Rodrigo,

2011). La nicotina es metabolizada en su mayoría (80-90%) en el hígado y se excreta junto con sus metabolitos cotinina y nicotina-1'-N-oxido mediante la orina (Benowitz *et al.*, 1983), aunque también puede eliminarse por las heces, la bilis, la saliva, los jugos gástricos, el sudor y la leche materna (Yildiz, 2004).

### **Nicotina en el sistema nervioso**

La nicotina ejerce sus efectos mediante sus interacciones con los receptores naturales para acetilcolina (nAChRs) (Yildiz 2004; Rodrigo, 2011). Estos receptores son canales iónicos de membrana con estructura pentamérica permeables principalmente al  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y al  $\text{Ca}^{2+}$  (Rodrigo, 2011). En el encéfalo de los mamíferos se han identificado nueve subunidades  $\alpha$  ( $\alpha 2$ - $\alpha 10$ ) (Pierce y Kumaresan, 2006) y tres  $\beta$  ( $\beta 2$ - $\beta 4$ ) que constituyen los nAChRs (Rodrigo, 2011; Pierce y Kumaresan, 2006). Los receptores son muy heterogéneos, y están formados por diferentes combinaciones de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , aunque  $\alpha 7$  puede formar receptores homoméricos (Rodrigo, 2011).

En el VTA las dendritas y las proyecciones que llegan de diversas zonas encefálicas presentan una gran variedad de nAChRs (Rodrigo, 2011). En el NAc los nAChRs se encuentran principalmente en las terminales dopaminérgicas (Rodrigo, 2011; Pierce y Kumaresan, 2006). Los nAChRs también se encuentran en los cuerpos celulares de interneuronas GABAérgicas y en terminales glutamatergicas en el VTA (Klink *et al.*, 2001) En Las células GABAérgicas, están formados en su mayoría por las subunidades  $\alpha 4$ - $\alpha 2$  y  $\beta 2$ - $\beta 4$  (Klink *et al.*, 2001; Keath *et al.*, 2007). Por el contrario, las células dopaminérgicas del VTA poseen una complejidad mayor en la composición de los nAChR: además de las subunidades  $\alpha 4$ - $\alpha 2$  y  $\beta 2$ - $\beta 4$ , los receptores pueden contener  $\alpha 5$ - $\alpha 6$  y  $\beta 3$  (Klink *et al.*, 2001; Champtiaux *et al.*, 2003; Wooltorton *et al.*, 2003). También se han identificado receptores homoméricos formados por subunidades  $\alpha 7$  tanto en las

neuronas dopaminérgicas como en las GABAérgicas de esta región (Klink *et al.*, 2001; Wooltorton *et al.*, 2003). Asimismo, las terminales glutamatérgicas que proyectan en el VTA, en el NAc y en la CPF también presentan los pentámeros de  $\alpha 7$  presinápticamente (Rodrigo, 2011; Mansvelder y McGehee, 2000; Keath *et al.*, 2007).

### **Efecto de la nicotina en ratas**

Los efectos estimulantes de la nicotina dependen de la edad, las ratas que comienzan la auto-administración de nicotina a las cuatro o cinco semanas de edad muestran una tasa más alta de autoadministración de nicotina en comparación de las ratas que se inician a las siete u ocho semanas de edad (Levin, 2011). El consumo agudo de la nicotina aumenta la locomoción en adolescentes en los días posnatales 27, 28, pero reduce la locomoción en la edad adulta (Cao *et al.*, 2010a, Cao *et al.*, 2007). Los roedores adolescentes son más sensibles que los adultos a los efectos de refuerzo y recompensa de la nicotina (Kota *et al.*, 2007; Torres *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2009).

Los efectos de la nicotina también son dependientes del género: Las ratas hembras muestran un aumento de la sensibilidad a los efectos locomotores de la nicotina (Cao *et al.*, 2010a) y la disminución de los síntomas de la abstinencia (Pentkowski *et al.*, 2011), con relación a los machos. Por otro lado los machos muestran una auto-administración significativamente mayor de nicotina que las hembras en las dos primeras semanas de acceso a la nicotina (Levin, 2011). Las ratas hembras adolescentes muestran mayor motivación en la auto administración de nicotina (Chaudhri *et al.*, 2005; Pentkowski *et al.*, 2011; Lynch, 2009), y continúa un mayor consumo en la auto-administración en etapas adultas, aun cuando el consumo de nicotina inicio en la adultez (Levin, 2011; Torres *et al.*, 2009). Para la auto-administración por libre elección no se muestra diferencia entre géneros excepto que las ratas macho muestran una preferencia por la

solución de nicotina con una concentración de 0,006% (Dadmarz y Vogel, 2003). De manera interesante y particularmente para nuestro grupo, no se ha encontrado ninguna correlación entre el consumo de nicotina y las fases del ciclo estral (Dadmarz y Vogel, 2003; Levin, 2011; Torres *et al.*, 2009).

### **Autoconsumo**

La gran mayoría de experimentos realizados para autoconsumo de sustancias de abuso suelen llevarse a cabo mediante el método operante donde el organismo trabaja para obtener una recompensa (sustancia psicoactiva), esta metodología experimental tiene muchas ventajas pero también tiene ciertas restricciones, tales como el tiempo experimental, la edad y peso de los organismos, consumo de alimento/agua además el proceso previo de aprendizaje, que pueden modificar los resultados del autoconsumo (Brower *et al.*, 2002, citado en Dadmarz y Vogel, 2003). El método oral de libre elección entre dos bebederos evita estas restricciones, la única desventaja es el contenido calórico y el sabor de la sustancia de abuso implicada en el experimento, lo cual no aplica para la nicotina (Dadmarz y Vogel, 2003).

Interesantemente, el primer día los organismos consumen una mayor cantidad de nicotina en comparación con los días posteriores del experimento, en el segundo día ya se puede predecir si el organismos será un alto, moderado o bajo consumidor. La respuesta al consumo de nicotina es altamente individualizado y parece estar determinada por ciertas características del animal ofreciendo una nueva base génica y biológica ante la búsqueda a la adicción a la nicotina (Dadmarz y Vogel, 2003).

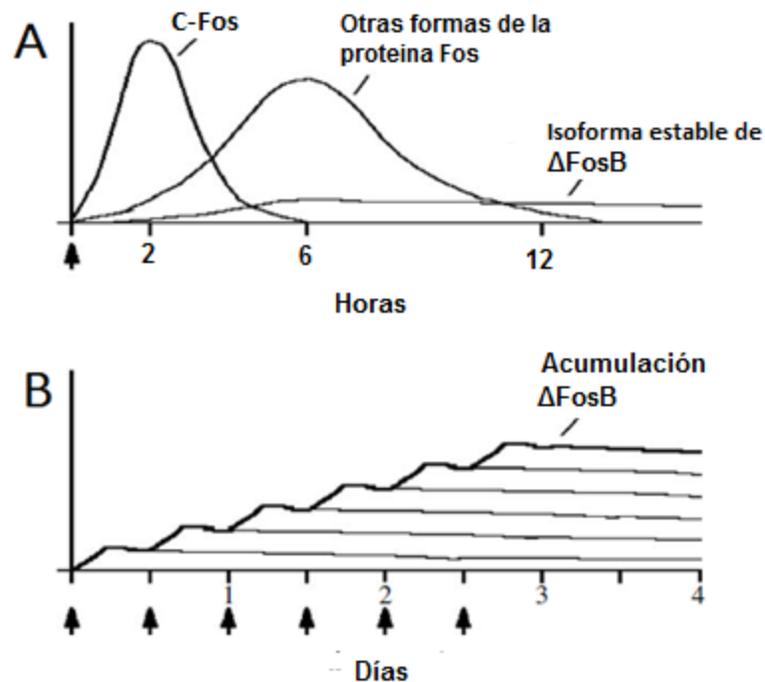
### **$\Delta$ FosB**

$\Delta$ FosB es un miembro de la familia de los factores de transcripción Fos, que incluyen c-Fos, FosB, Fra1 y Fra2, está codificado por el gen FosB (Morgan y Curran, 1995). Las proteínas de la familia Fos se inducen rápida y transitoriamente en regiones específicas del cerebro después de la administración de muchos fármacos de abuso, sin embargo estas proteínas son altamente inestables y regresan a valores basales dentro de pocas horas después de la administración del fármaco, mientras que la isoforma modificada de  $\Delta$ FosB permanece y se acumula en las mismas regiones cerebrales después de la repetida exposición a una droga, a diferencia del resto de miembros de la familia fos que muestran tolerancia ante el consumo crónico de esta droga, (se reduce la inducción en comparación con las exposiciones iniciales de la droga) (Nestler, 2008) (Figura 2). Después de la administración crónica de nicotina estas respuestas se incrementan en el núcleo acumbens, pero también se observan en otras regiones cerebrales como el cuerpo estriado dorsal, y la corteza prefrontal (Nestler, 2012).

El núcleo acumbens funciona normalmente como un regulador de las respuestas a las recompensas naturales (comida, bebida, sexo e interacciones sociales), pero cuando se muestra un mayor interés por alguna de estas recompensas (Comer, jugar, ejercitarse patológicamente) se presenta la denominada “adicción natural” en la cual se presenta la acumulación de la isoforma  $\Delta$ FosB (Nestler, 2008; Werme *et al.*, 2002) sin embargo esta acumulación de  $\Delta$ FosB en el NAc es menor en comparación con la acumulación que se presenta después del consumir de diversas drogas de abuso (Wallace *et al.*, 2008).

Diversas sustancias de abuso son capaces de regular la función sináptica de los mecanismos de plasticidad en el núcleo acumbens (Redolat, 2008). La isoforma  $\Delta$ FosB proporciona un mecanismo molecular por el cual los cambios inducidos por fármacos en la expresión génica pueden persistir a pesar de períodos

relativamente largos de abstinencia. Por lo tanto, las funciones  $\Delta$ FosB son las de un "interruptor molecular" que ayuda a iniciar y mantener un estado adictivo (Nestler, 2012).



**Figura 3.** El panel A muestra un miembro de la familia de los factores de transcripción Fos en el que se muestra el comportamiento de la isoforma  $\Delta$ FosB. El panel B, muestra la acumulación de la isoforma  $\Delta$ FosB tras el uso continuo de sustancias de abuso. Figura tomada y modificada de Nestler (2008).

## **AMBIENTE ENRIQUECIDO**

Donald Hebb (1947) informo brevemente que cuando permitió que algunas ratas de laboratorio exploraran su casa durante algunas semanas como mascotas de sus hijos, al devolverlas al laboratorio mostraron una mejor capacidad de resolución de problemas planteados en los laberintos, en comparación de las ratas que habían permanecido en el laboratorio. A partir de ahí Hebb desarrollo una serie de experimentos para examinar las consecuencias conductuales de la exposición al ambiente de ratas en los que concluyo que una experiencia más rica durante el desarrollo promueve la capacidad de aprovechar la nueva experiencia en la madurez que es una de las características de la inteligencia del ser humano. Bingham y Griffiths (1952) reportaron un experimento en los cuales colocaban un grupo de ratas de 21 días de edad durante treinta días en una caja de grandes dimensiones (180x270 cm) con túneles, corredores y planos inclinadas y lo compararon con otros dos grupos, uno colocado en cajas con movimiento restringido (5x12.7x10.16cm) y el otro colocado en cajas estándar (35.56x22.86x22.86cm). Los resultados expusieron que las ratas criadas en la caja grande eran más eficientes en la ejecución de pruebas de aprendizaje en comparación con los otros grupos. Más tarde Bernstein (1957) y Anderson (1972) afirmaron que la manipulación de un ambiente enriquecido influye en el aprendizaje en una edad posterior. En 1962 Rosenzweig y colaboradores descubren que el ambiente donde un animal crece y se desarrolla produce modificaciones bioquímicas y morfológicas a nivel cerebral. Con este descubrimiento introducen el concepto de Ambiente Enriquecido (AE) como un método por medio del cual se inducen cambios cuantificables en el cerebro de los animales expuestos.

Un AE es un modelo de vivienda que ofrece una mayor estimulación física, cognitiva, sensorial (Mesa-Gresa y Pérez-Martínez, 2012; Toht *et al.*, 2011) y de integración social, que inducen a cambios morfológicos y fisiológicos en el cerebro (Cao *et al.*, 2010b). Dando una respuesta benéfica sobre el comportamiento (Reichmann *et al.*, 2013) y la plasticidad cerebral (Leger *et al.*, 2012; Reichmann *et al.*, 2013, Leger *et al.*, 2012; Valero *et al.*, 2011; Schloesser *et al.*, 2010) y la neurogénesis. Como resultado se muestra una mejora en la memoria (Leger *et al.*, 2012), y la reducción de los efectos del estrés (Reichmann *et al.*, 2013; Schloesser *et al.*, 2010).

Por otra parte, la experiencia de vida y el ambiente influyen en el desarrollo de adicciones a las drogas principalmente en edades tempranas (Gómez *et al.*, 2012; Nader *et al.*, 2012). La exposición a un AE durante las primeras etapas de la vida reduce los efectos de las drogas de abuso y disminuye la vulnerabilidad a desarrollar adicción (Nader *et al.*, 2012; Solinas *et al.*, 2010). La pérdida del control sobre el abuso de drogas ha sido atribuida a una disfunción de la corteza prefrontal, y un ambiente enriquecido puede actuar como un protector sobre la sensibilidad a la recompensa y en el desarrollo de la conducta adictiva a la nicotina (Venebra-Muñoz *et al.*, 2011, Venebra-Muñoz *et al.*, 2015).



**Figura 4.** Ambientes de alojamiento. El panel A muestra el ambiente estándar de laboratorio. El panel B muestra distintos ambientes enriquecidos.

## JUSTIFICACION

En México, el consumo de tabaco ocasiona más de 60 000 muertes al año según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT, 2012). Las principales tendencias del tabaquismo en México son: el inicio del consumo del tabaco a una menor edad, mayor número de menores de edad que fuman, y un incremento en la prevalencia del consumo del tabaco en mujeres (Kuri-Morales et al., 2006). Los patrones de consumo de tabaco en zonas rurales y urbanas muestran solo una ligera diferencia en la edad de inicio de consumo y en la prevalencia de consumo en varones (Campuzano *et al.*, 2004). Pero si se muestra una diferencia de escolaridad entre los fumadores de las zonas urbanas y rurales, ya que mientras el 26% de fumadores urbanos solo cursaron la secundaria, el 18% de los fumadores rurales carecen de toda educación formal (Kuri-Morales et al., 2006).

Nos queda claro que la experiencia de vida y el ambiente influyen en el desarrollo de adicciones a las drogas principalmente en edades tempranas (Gómez *et al.*, 2012; Nader *et al.*, 2012), la exposición a un AE durante las primeras etapas de la vida reduce los efectos de las drogas de abuso y disminuye la vulnerabilidad a desarrollar adicción (Nader *et al.*, 2012; Solinas *et al.*, 2010). Pero también existen otros factores que influyen en las adicciones como son el deterioro de la toma de decisiones (George y Koob, 2010). Por lo que es de importancia estudiar el papel que desempeña la corteza prefrontal en las funciones cognitivas implicadas en la toma de decisiones y en la vulnerabilidad del abuso de las drogas.

Nuestro grupo se ha enfocado en analizar el efecto que tiene la nicotina sobre el cerebro ante distintas variables ambientales (Venebra-Muñoz *et al.* 2011). Pero aún quedan variables sin analizar. En este trabajo nos es de particular interés

conocer la respuesta de la corteza prefrontal ante la misma dosis administrada de dos formas: autoconsumo y consumo inducido en un ambiente estándar. Así mismo nos interesa conocer la respuesta de la corteza prefrontal y el núcleo acumbens ante el consumo inducido en un ambiente estándar y un ambiente enriquecido.

### **HIPÓTESIS**

Si la corteza prefrontal es la responsable de la toma de decisiones entonces los niveles de  $\Delta$ FosB en corteza prefrontal serán mayores en animales expuestos al autoconsumo de nicotina.

Si la corteza prefrontal es la responsable de la toma de decisiones entonces los niveles de  $\Delta$ FosB en corteza prefrontal serán menores en animales expuestos a consumo inducido de nicotina.

Si el ambiente enriquecido actúa como un neuroprotector, entonces los niveles de  $\Delta$ FosB en la corteza prefrontal y núcleo acumbens serán mayores en los animales expuestos a un ambiente enriquecido.

Debido a que se ha observado que las hembras tienen una mayor tolerancia a la nicotina entonces habrá una menor inmunoreactividad a  $\Delta$ FosB en la corteza prefrontal con respecto de los machos ante una misma dosis de nicotina.

## **OBJETIVOS**

Determinar si existen diferencias en la inmunoreactividad a  $\Delta$ FosB en la corteza prefrontal entre hembras y machos ante un auto consumo y consumo inducido de nicotina

Determinar si el enriquecimiento ambiental modifica la inmunoreactividad a  $\Delta$ FosB en la corteza prefrontal y el núcleo acumbens ante un consumo inducido de nicotina en ratas hembra

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Determinar si existen cambios en el nivel de inmunoreactividad a  $\Delta$ FosB en corteza prefrontal, entre hembras y machos con auto consumo y consumo inducido.

Determinar si existen cambios en el nivel de inmunoreactividad a  $\Delta$ fosB en corteza prefrontal, y núcleo acumbens en ratas hembra bajo la misma dosis ante consumo inducido de nicotina en un ambiente enriquecido.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **ANIMALES**

Se utilizaron 16 ratas hembras de la cepa Wistar de 21 días de edad, al inicio del experimento. Los sujetos se alojaron en el bioterio del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), de la Universidad Autónoma del Estado de México. Con una temperatura  $21^{\circ} \pm 1$ , con un ciclo invertido de luz 12/12, la inversión de ciclo de luz se hizo con la finalidad de poder realizar las manipulaciones en el tiempo de actividad de los animales (etapa de oscuridad). El agua y el alimento se les proporciono *ad libitum* durante todo el experimento de acuerdo con la NOM- 062- ZOO- 2003. Todas las manipulaciones realizadas en los animales fueron bajo la aprobación del comité de ética de nuestra institución. Los animales fueron distribuidos al azar en dos grupos control y cuatro grupos experimentales.

### **CONFIGURACIÓN DE AMBIENTES.**

Se colocaron 4 individuos en cajas de policarbonato con dimensiones de 47x33x19 cm. Los individuos fueron alojados bajo condiciones estándar previamente mencionadas.

Por otra parte, también se colocaron 8 individuos en cajas de acrílico con dimensiones 75x60x60 cm, las cajas fueron diseñadas por nuestro laboratorio para estudios de enriquecimiento ambiental (Con objetos, tales como tubos de PVC, bolas de polipropileno, material de excavación y juguetes de diferentes formas, tamaños y texturas).

## **DOSIS**

Los dosis de nicotina utilizadas en el consumo inducido fueron obtenidas de un experimento previo realizado por Morales (2015) (en preparación) en el cual utilizo ratas macho de 21 días de edad, colocó en cajas estándar de laboratorio y en enriquecimiento ambiental con una temperatura  $21^{\circ} \pm 1$ , ciclo invertido de luz 12/12, agua y alimento con acceso *ad libitum* durante todo el experimento. A partir del día 51 inicio el experimento de autoconsumo, aislando a todos los animales (1 por jaula) y se les proporcionó un bebedero con solución de nicotina en una concentración 0.006% por 12 horas, esto durante tres semanas, en el cual se monitoreo diariamente, el peso, el consumo de agua y el consumo de nicotina. Al final del experimento se obtuvieron dosis diarias de consumo de nicotina por individuo. En este trabajo se utilizaron estas dosis y fueron suministradas subcutáneamente en ratas hembras y comparamos la inmunoreactividad existente en corteza prefrontal entre el experimento de Morales-Morales y el nuestro.

## **GRUPOS EXPERIMENTALES**

### **Experimento 1. Efectos del autoconsumo de nicotina en la expresión de $\Delta$ FosB en CPFy NAc en ratas macho**

**Grupo 1.** En condiciones estándar (SE), autoconsumo de nicotina (n=7). Se utilizaron 7 individuos aislados en condiciones estándar previamente mencionados, con acceso de alimento y agua *ad libitum*, sin ningún otro estímulo, por un periodo de 71 días. A partir del día 51 se les proporcionaron dos bebederos, uno con solución de nicotina (0.006 %, Sigma St Louis, MO, EE.UU. N5260) (Dadmarz y Vogel, 2003, Venebra-Muñoz *et al.*, 20014), durante las horas

de oscuridad y otro con agua durante las horas de luz. Cada tercer día, se cambiaron las camas de los alojamientos. Los bebederos se cambiaron de lugar constantemente para descartar consumo por preferencia de lugar y la solución de nicotina se cambió diariamente para tener nicotina fresca. El consumo de líquido y el peso corporal se midieron cada tercer día hasta el día 50. A partir del día 51 y durante tres semanas se midió cada mañana el consumo de nicotina y se calculó la dosis de la siguiente manera, (0.006 mg /ml) (Promedio de los mililitros ingeridos de la solución de nicotina) / (Promedio del peso de los animales) (Dadmarz y Vogel, 2003, Venebra-Muñoz *et al.*, 2014). A dos organismos de este grupo se les proporciono solo agua, como grupo control interno. Al término de las tres semanas, los animales fueron sacrificados y sus cerebros se procesaron para la inmunodetección de  $\Delta$ fosB.

## **Experimento 2. Efectos del consumo inducido de nicotina en la expresión de $\Delta$ FosB en CPF y NAc en ratas hembras en SE y AE**

**Grupo 2.** En Condiciones estándar (SE) y consumo inducido de nicotina (n=8). Se colocaron 4 individuos por caja. Los individuos fueron alojados bajo condiciones estándar previamente mencionadas, sin ningún otro estímulo, por un periodo de 71 días. A partir del día 51 se les administró una inyección subcutánea de nicotina. (Sigma St. Louis, MO, EE.UU. 5260), disuelta con solución salina al 0.9% y neutralizada con NaOH a pH 7 (Torres *et al.*, 2009; Zuo *et al.*, 2011). La dosis fue la misma que se obtuvo por los individuos del grupo de auto consumo. Dos organismos de este grupo fueron inyectados con solución salina al 0.9%, como grupo control interno. Cada tercer día, los organismos fueron pesados y se cambiaron las camas de los alojamientos. Al término de los 71 días los animales

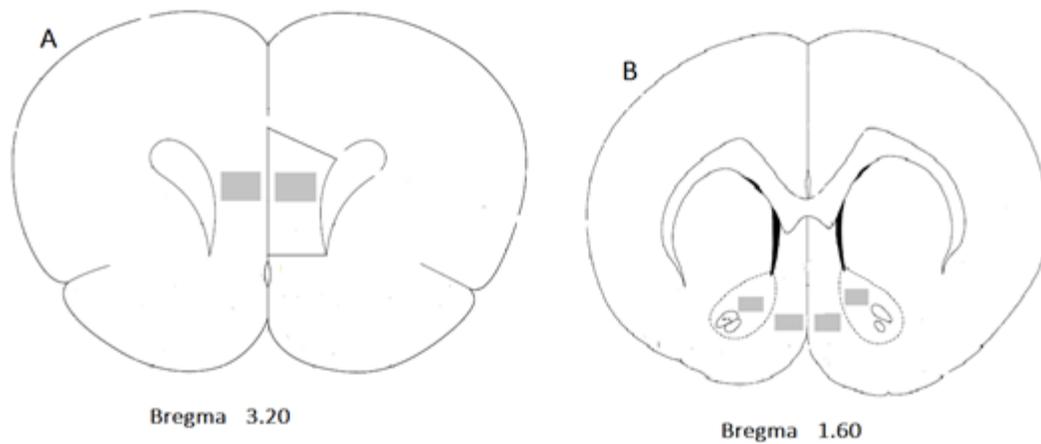
fueron sacrificados y sus cerebros se procesaron para la inmunodetección  $\Delta$ FosB.

**Grupo 3.** En ambiente enriquecido (AE), consumo de nicotina inducido (n=8). Se colocaron 8 individuos por caja. Los individuos fueron alojados bajo condiciones de ambiente enriquecido previamente mencionadas, con acceso de alimento y agua *ad libitum*, por un periodo de 71 días. A partir del día 51 se les administró una inyección subcutánea de nicotina. (Sigma St Louis, MO, EE.UU. 5260), disuelta con solución salina al 0.9% y neutralizada con NaOH a pH 7 (Torres *et al.*, 2009; Zuo *et al.*, 2011). La dosis fue en proporción a la consumida por los individuos de auto consumo. Dos organismos de este grupo fueron inyectados con solución salina al 0.9%, como grupo control interno. Cada tercer día, los organismos fueron pesados y se cambiaron las camas de los alojamientos, así mismo se modificó el enriquecimiento ambiental. Al término de los 71 días los animales fueron sacrificados y sus cerebros se procesaron para la inmunodetección  $\Delta$ fosB.

### **INMUNOHISTOQUÍMICA**

Las ratas fueron profundamente anestesiadas con pentobarbital sódico (60 mg/kg) y perfundidas transcárdialmente con solución salina (0,9%), seguido de paraformaldehído (4 %) en tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 (PB). Los cerebros fueron extraídos y fijados durante la noche en paraformaldehído (4%) posteriormente se crioprotegieron con un gradiente de soluciones de sacarosa (10, 20 y 30 %). El cerebro fue cortado con un criostato en segmentos coronales de 40 $\mu$ m de la corteza prefrontal (CPF) (Bregma 3,20 mm) y núcleo acumbens (NAc) (Bregma 1,60 mm) (Paxinos y Watson, 1998) (Figura 5). Se seleccionó un corte por región de cada cerebro (Harris *et al* 2007). El tejido se lavó en PB cuatro veces y después se expuso a peróxido de hidrogeno al 0.5% durante 10 minutos para neutralizar la peroxidasa endógena. Los cortes se lavaron cuatro veces con PB y

se incubaron durante 1h en suero normal de cabra al 3% con el fin de bloquear reacciones no específicas. Posteriormente los cortes de tejido fueron incubados por 96 horas a 4°C en el anti-FosB/ $\Delta$ 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) (Harris et al 2007). Trascorridas las 96 horas los cortes de tejido se lavaron 4 veces en PB 0.1M y se incubaron por 2h con un anticuerpo anti-conejo biotinilado (81-6140 Invitrogen Laboratories EE:UU) diluido 1:250 en PBT. Nuevamente los cortes fueron lavados 4 veces en PB 0.1 M y se incubaron durante 1h en el complejo avidina-biotina siguiendo las instrucciones del fabricante del kit ABC (Vectastain Elite PK-6100, Vector Laboratories, CA, USA). Se realizaron 4 lavados en PB 0.1M por 5 min cada lavado, finalmente se reveló la inmunoreactividad con una solución 3, 3,-diaminobenzidina (sigma D-5637) al 0.06% en presencia de sulfuro de níquel (1%), cloruro de cobalto (1%) (Sigma 202 185 y A1827, respectivamente) y 0.1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% diluidos en PB. Los cortes se lavaron 2 veces con PB 0.1M por 5 min cada lavado. Finalmente se montaron en portaobjetos gelatinizados, se deshidrataron y aclararon en un tren gradual de alcohol y xilol. Se tomaron fotografías con una cámara digital montada en un microscopio. Se cuantificaron los núcleos positivos al marcaje para  $\Delta$ FosB, la cuantificación se realizó en ambos hemisferios de núcleo acumbens y corteza prefrontal y posteriormente se analizaron las fotografías con la ayuda del software gratuito de análisis de imagen (ImageJ 1,34, NIH, EE.UU.).



**Figura 5.** Esquema de los niveles utilizados para realizar la inmunohistoquímica para la detección de  $\Delta$ fosB. A, Corteza prefrontal (Bregma 3,20 mm). B, Núcleo acumbens (Bregma 1,60 mm). Las zonas en gris muestran las zonas donde se realizaron los conteos de células reactivas.

### **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

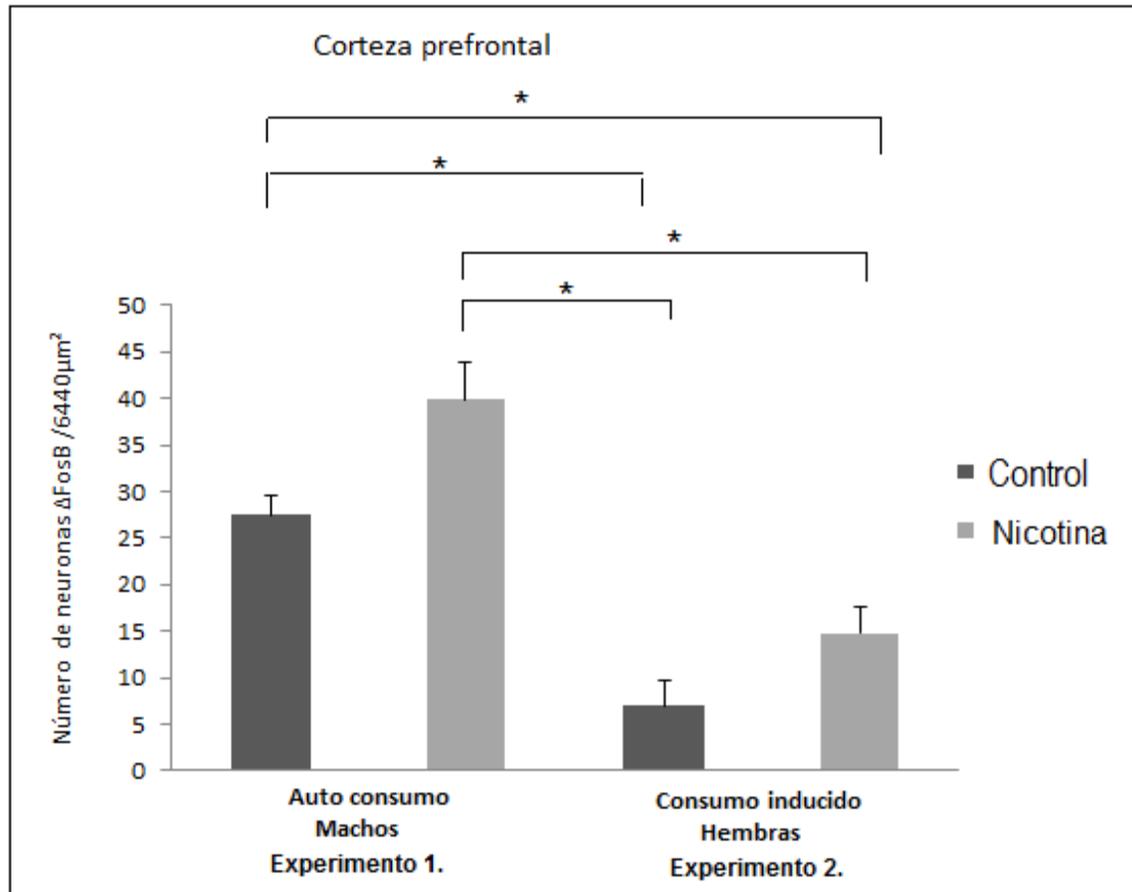
Para determinar las diferencias significativas en el número de neuronas inmunorreactivas  $\Delta$ FosB entre el grupo control y el grupo experimental se utilizaron pruebas de t Student. Para analizar si existen diferencias significativas en el número de neuronas inmunorreactivos  $\Delta$ FosB entre grupos se utilizaron pruebas de ANOVA y pruebas poshoc de tukey o LSD para detectar las diferencias entre los grupos. Un valor de  $p \leq 0.05$  se consideró como valor significativo.

## RESULTADOS

### **Comparación de la inmunoreactividad entre los grupos de auto-consumo machos (experimento 1) y consumo inducido hembras (experimento 2).**

Los resultados muestran que no hay diferencias en el número de neuronas inmunoreactivas  $\Delta$ FosB para el grupo control interno de auto-consumo (agua) y el grupo de auto-consumo por efecto de la nicotina ( $t=1.18137$ ,  $p>0.05$ ) de igual manera no hay diferencias entre el grupo control interno inducido (solución salina) y el grupo de consumo inducido por efecto de la nicotina ( $t=1.74683$ ,  $p>0.05$ ).

Por otra parte, el grupo control interno de auto-consumo (agua) muestra diferencia con el grupo control inducido (inyección de solución salina), y también con el grupo de consumo inducido de nicotina. En el grupo de Auto-consumo existen más neuronas positivas con respecto del grupo control inducido (inyección de solución salina) así como con el grupo inducido (inyección de nicotina) ( $F_{0.05(1)(3,17)}=11.63$ ,  $p<0.05$ ) (Fig. 6).

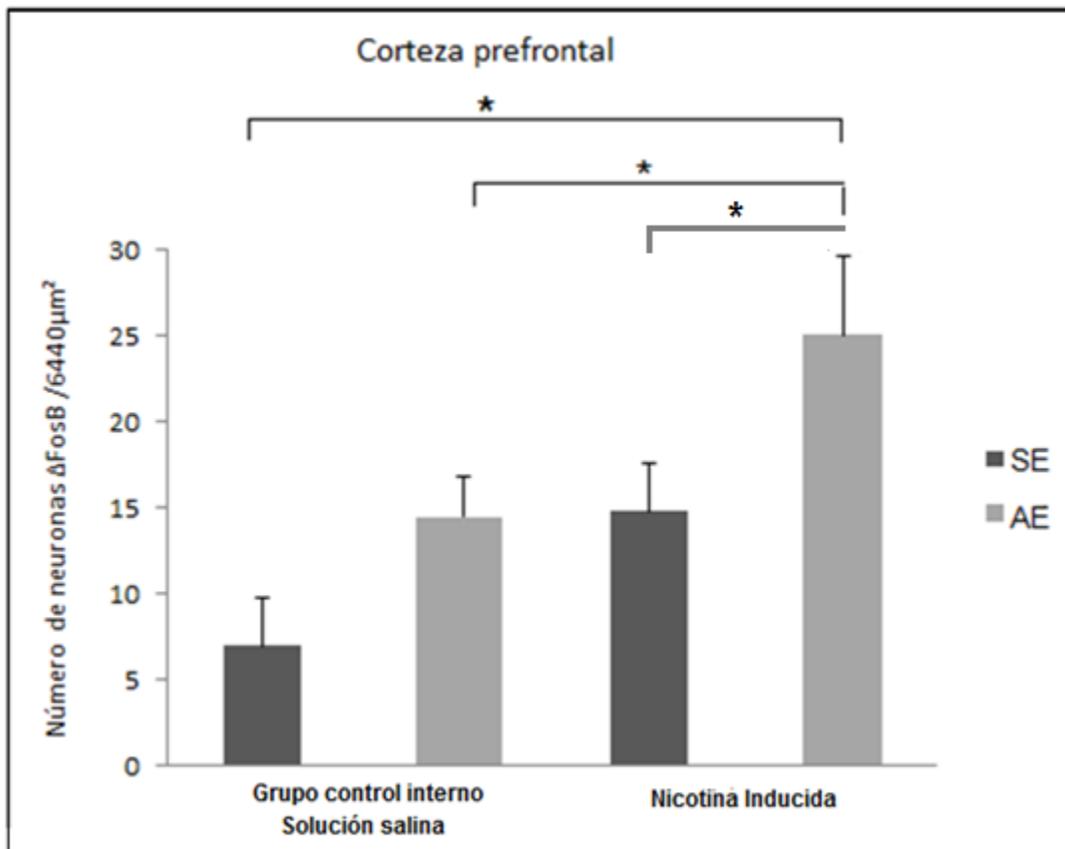


**Figura 6.** Comparación entre el experimento 1 y 2 para inmunoreactividad  $\Delta$ FosB en la corteza prefrontal por efecto del auto-consumo, la gráfica muestra las medias (+ -) el error estándar  $F_{0.05(1)(3,17)}=11.63$ ,  $p<0.05$ .

## **Comparación de la Inmunohistoquímica entre los grupos de Consumo inducido por ambiente (experimento 2).**

### *Corteza prefrontal.*

En el grupo control interno no se muestran diferencias en el número de neuronas inmunoreactivas  $\Delta$ FosB por efecto del ambiente. En el grupo de consumo de nicotina inducido se muestran diferencias ya que el grupo en ambiente enriquecido tiene un número mayor de neuronas inmunoreactivas  $\Delta$ FosB por efecto del ambiente. El grupo control interno en ambiente estándar tiene un número menor de neuronas inmunoreactivas  $\Delta$ FosB en comparación con el grupo de consumo de nicotina inducida en ambiente estándar, pero esto no es suficiente para hacer una diferencia estadística por efecto de la nicotina. Para el grupo de consumo inducido de nicotina en ambiente enriquecido si hay diferencia ya que este muestra un número mayor de neuronas inmunoreactivas  $\Delta$ FosB en comparación con el grupo control interno en ambiente estándar por efecto de la nicotina y del ambiente. El grupo control interno en ambiente enriquecido muestra diferencias ya que tiene un número menor de neuronas inmunoreactivas  $\Delta$ FosB en comparación con el grupo de consumo de nicotina inducido en ambiente enriquecido por efecto de la nicotina, pero no muestra diferencias en comparación con el grupo de consumo inducido de nicotina en ambiente estándar ya que estos grupos tienen un número similar de neuronas inmunoreactivas  $\Delta$ FosB por efecto de la nicotina y el ambiente ( $F_{0.05(1)(3, 27)}=3.28, p<0.05$ ) (Fig. 7) .

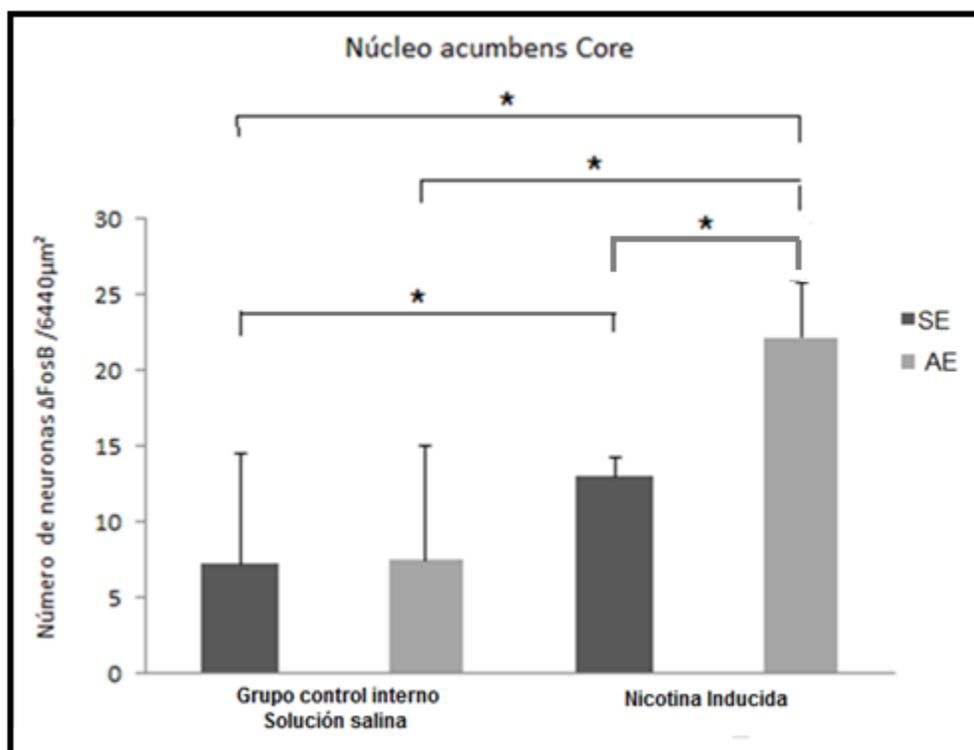


**Figura 7.** Comparación del experimento 2 para inmunoreactividad  $\Delta$ FosB en corteza prefrontal por efecto del ambiente, la gráfica muestra las medias (+ -) el error estándar  $F_{0.05(1)(3, 27)}=3.28$ ,  $p<0.05$ .

#### *Núcleo Acumbens Core.*

En el grupo control interno no se muestran diferencias en el número de neuronas inmunoreactivas  $\Delta$ FosB por efecto del ambiente. En el grupo de consumo de nicotina inducido se muestra un número mayor de neuronas en el grupo de nicotina inyectada en ambiente enriquecido en comparación con el grupo de nicotina inyectada en ambiente estándar, esto por efecto del ambiente. El grupo control interno en ambiente estándar muestra un número menor de neuronas inmunoreactivas  $\Delta$ FosB en comparación con el grupo de consumo de nicotina inducida en ambiente estándar lo que hace una diferencia por efecto de la nicotina.

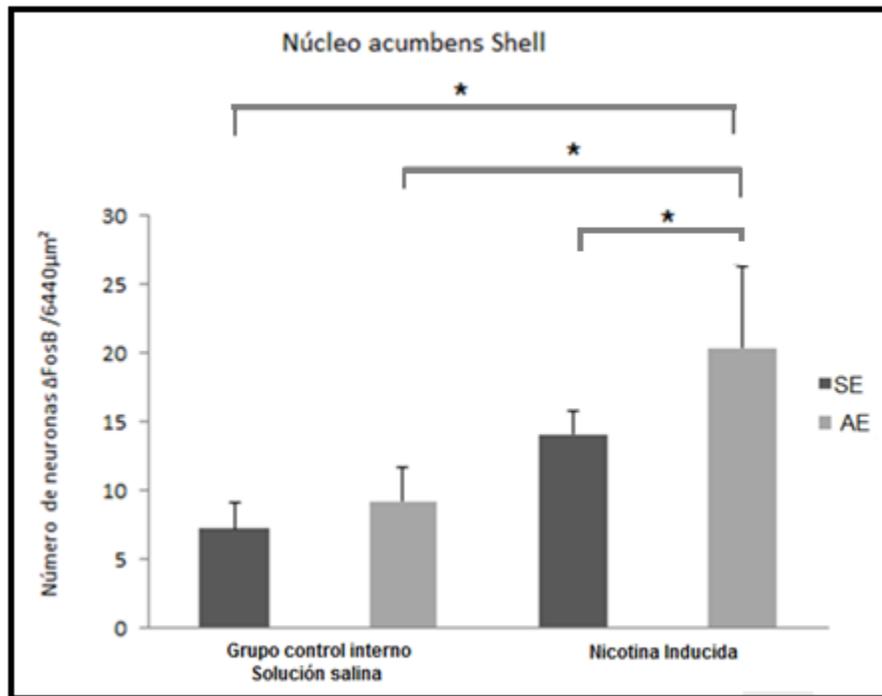
El grupo control interno en ambiente estándar tiene un número menor de neuronas inmunoreactivas  $\Delta$ FosB en comparación con el grupo de consumo inducido de nicotina en ambiente enriquecido por efecto de la nicotina y el ambiente. El número de neuronas inmunoreactivas  $\Delta$ FosB es menor en el grupo control interno en ambiente enriquecido en comparación con el grupo de consumo de nicotina inducido en ambiente enriquecido por efecto de la nicotina. El número de neuronas inmunoreactivas  $\Delta$ FosB es mayor en el grupo de consumo inducido de nicotina en ambiente estándar en comparación con el grupo control interno en ambiente enriquecido por efecto del ambiente y la nicotina, pero esto no hace una diferencia estadística significativa ( $F_{0.05(1)(3,29)}=5.11$ ,  $p<0.05$ ) (Fig. 8).



**Figura 8.** Comparación del experimento 2 para inmunoreactividad  $\Delta$ FosB en núcleo acumbens core por efecto del ambiente, la gráfica muestra las medias (+ -) el error estándar  $F_{0.05(1)(3,29)}=5.11$ ,  $p<0.05$ .

*Núcleo Acumbens Shell.*

En el grupo control interno no se muestran diferencias en el número de neuronas positivas a  $\Delta$ FosB por efecto del ambiente. En el grupo de consumo inducido de nicotina muestra diferencias estadísticas ya que es grupo inyectado con nicotina en ambiente enriquecido muestra un número mayor de neuronas positivas a  $\Delta$ FosB en comparación con el grupo de nicotina inyectada en ambiente estándar esto por efecto del ambiente. El grupo control interno en ambiente estándar tiene un número menor de neuronas con  $\Delta$ FosB en comparación con el grupo de consumo inducido de nicotina en ambiente estándar por efecto de la nicotina, pero esto no hace una diferencia estadística. Por otro lado, si hay diferencia entre el grupo control interno en ambiente estándar y el grupo de nicotina inyectada en ambiente enriquecido, ya que este último tiene más neuronas inmunoreactivas a  $\Delta$ FosB por efecto de la nicotina y el ambiente. El grupo control interno en ambiente enriquecido muestra un número menor de neuronas con  $\Delta$ FosB en comparación con el grupo de consumo de nicotina inducido en ambiente enriquecido por efecto de la nicotina, pero no muestra diferencias en el número de neuronas inmunoreactivas  $\Delta$ FosB en comparación con el grupo de consumo inducido de nicotina en ambiente estándar ya que este último tiene un número mayor de neuronas inmunoreactivas  $\Delta$ FosB por efecto de la nicotina y el ambiente ( $F_{0.05(1)(3,29)}=4.52$ ,  $p<0.05$ ) (Fig.8).



**Figura 9.** Comparación del experimento 2 para inmunoreactividad  $\Delta$ FosB en núcleo acumbens shell por efecto del ambiente, la gráfica muestra las medias (+ -) el error estándar  $F_{0.05(1)(3,29)}=4.52$ ,  $p<0.05$

### Graficas de inmunoreactividad individual por ambientes

Graficas individuales de ratas hembras, bajo la misma dosis en ambiente estándar y ambiente enriquecido

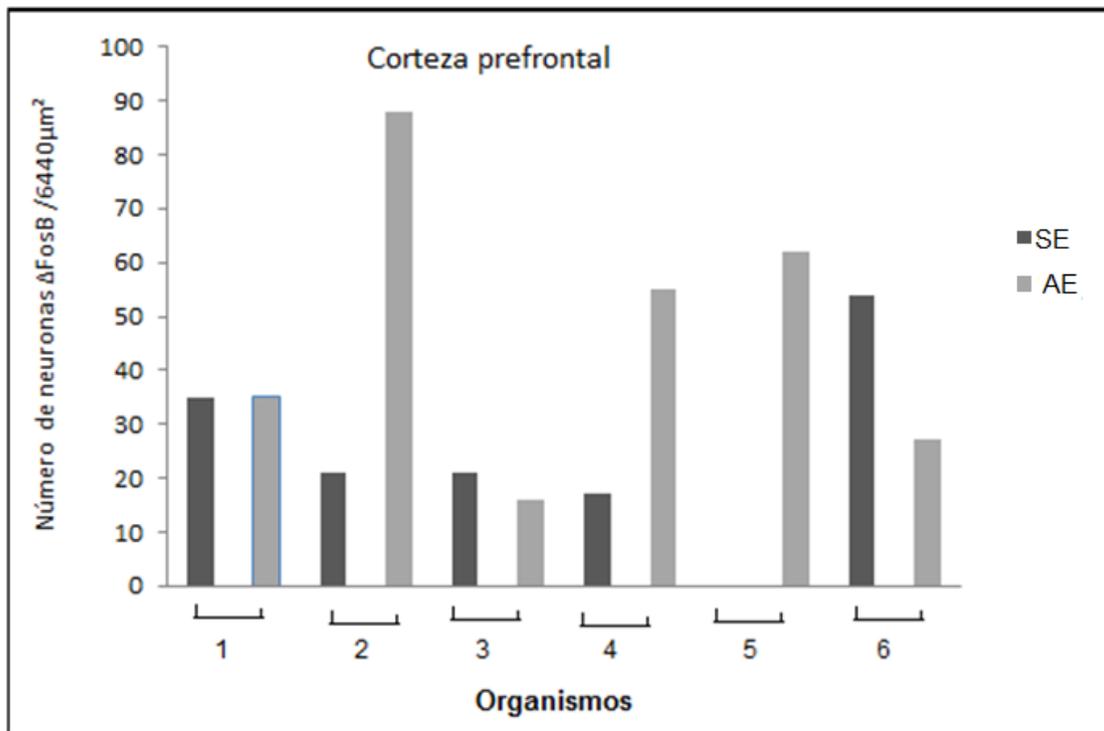


Figura 10. Inmunoreactividad a  $\Delta$ FosB individual por ambiente en la corteza prefrontal.

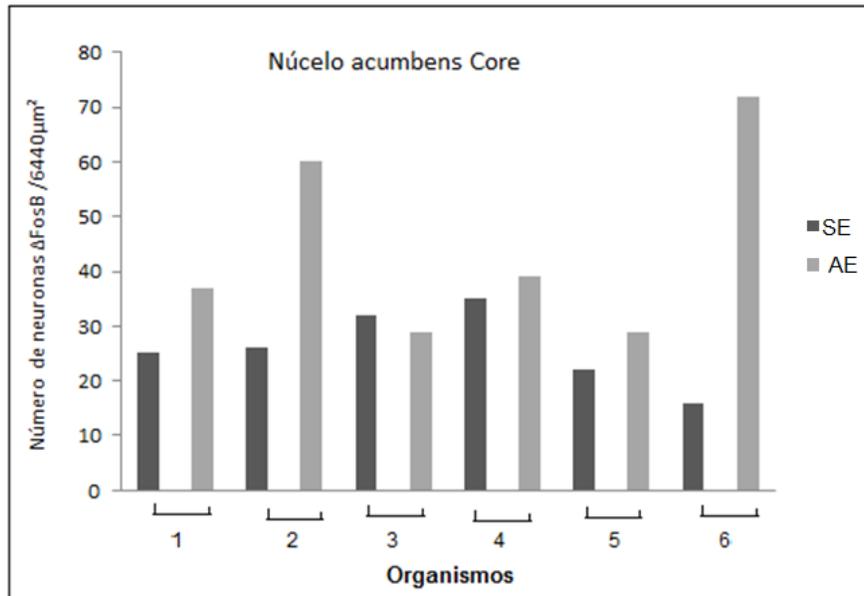


Figura 11. Inminoreactividad  $\Delta$ FosB individual por ambiente en núcleo acumbens Core

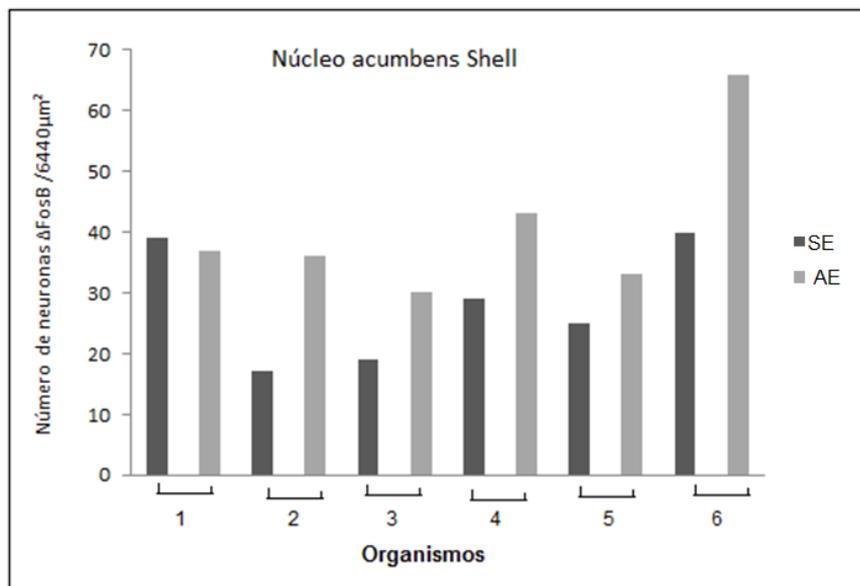
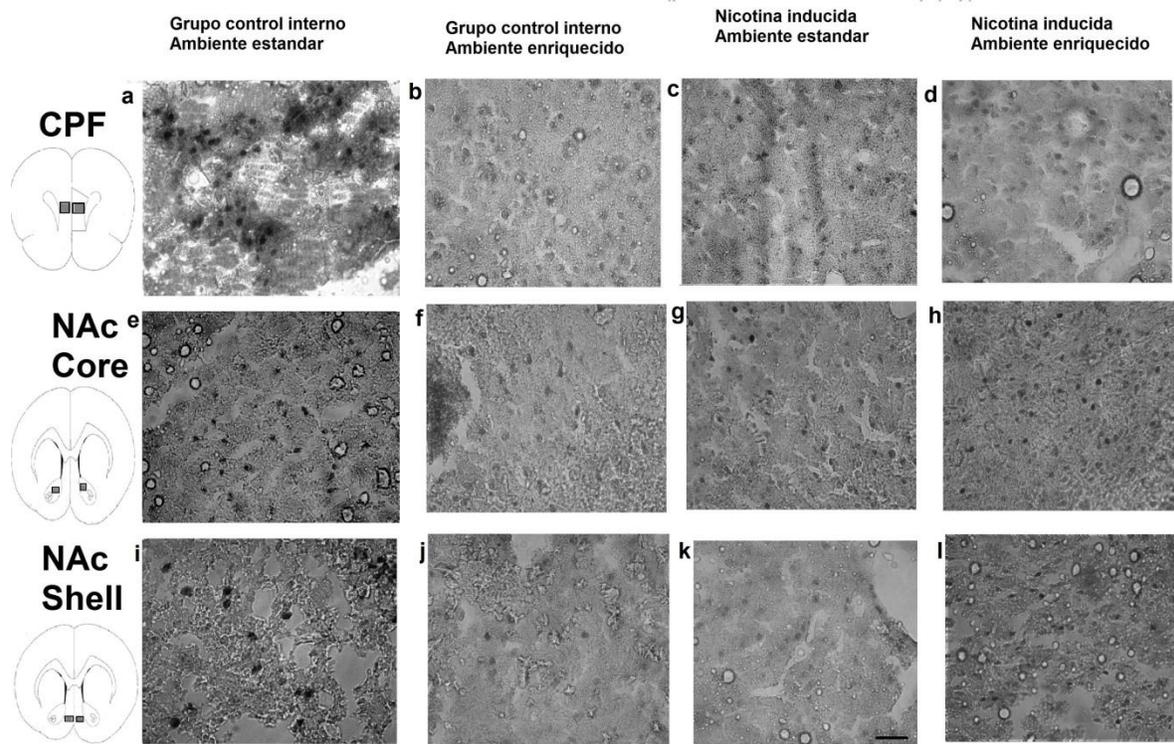


Figura 12. Inminoreactividad  $\Delta$  FosB individuarel por ambiente en núcleo acumbens shell



**Figura 13.** Células positivas a  $\Delta$ FosB en distintas áreas cerebrales de grupos control y en consumo de nicotina en ambiente estándar y ambiente enriquecido. Microfotografías de células  $\Delta$ FosB en corteza prefrontal (a-d), núcleo acumbens core (e-h), núcleo acumbens shell (i-l). La barra representa 30 $\mu$ m.

## DISCUSIÓN

### **Comparación de la inmunoreactividad entre los grupos de auto-consumo machos (experimento 1) y consumo inducido hembras (experimento 2).**

Los resultados que se muestran en la Fig. 6 indican que la nicotina no hace diferencia en el número de neuronas inmunoreactivas a  $\Delta$ FosB cuando los animales la consumen de forma bebida y tampoco de forma inyectada, sin embargo, si existen diferencias entre hembras y machos, al parecer la CPF se activa en mayor medida cuando la nicotina es consumida de forma voluntaria; con respecto a esto Venebra-Muñoz *et al.* (2014) encuentra que en machos la CPF se activa en mayor medida con el enriquecimiento ambiental y cuando consumen nicotina la inmunoreactividad disminuye, estas diferencias quizá radiquen en cuanto al sexo y a la vía de administración, además de la dosis. En algunos estudios se ha encontrado que los niveles de dopamina en áreas cerebrales como es el cuerpo estriado, el puente, el tálamo y el hipotálamo muestran una mayor concentración en hembras en comparación con machos (Peña, 2007; Das y Chudhuri, 1995). Además en algunos casos se ha comprobado que las diferencias en los niveles de dopamina en el estriado persisten por sexo y en ausencia de hormonas: machos castrados y hembras ovariectomizadas (Brazzetti y Becker, 1994). Con respecto a la dosis, está también pudo influir para que no se presenten diferencias estadísticas entre los animales que consumieron o fueron inyectados con respecto a los que no consumieron o fueron inyectados con solución salina, existen trabajos que mencionan que los machos tienen preferencia por una dosis media (0.006 mg/kg) (Dadmarz y Vogge, 2003), así mismo los machos muestran efectos adversos ante dosis altas de nicotina que son gratificantes para las hembras (Torres *et al.*, 2009). Una dosis de 0.3 mg/kg de nicotina es suficiente para producir un efecto de tipo conductual (activación locomotora) en ratas, dosis

mayores muestran inhibición en hembras (Cao *et al.*, 2010a; Gomez *et al.*, 2012). La Fig. 6 no nos muestra diferencias de inmunoreactividad en la CPF, sin embargo a nivel fisiológico pudieron existir diferencias que no fueron medidas en este trabajo, como cambios en la frecuencia cardiaca, y en la presión arterial (Yildiz, 2004). Así como los efectos conductuales correspondientes con la motivación y el aprendizaje entorno a la recompensa (Olausson *et al.*, 2003).

### **Comparación de la Inmunohistoquímica entre los grupos de consumo inducido por ambiente (experimento 2).**

#### *Corteza Prefrontal.*

Los resultados en la Fig.7 muestran que el AE no hace una diferencia en el número de neuronas inmunoreactivas  $\Delta$ FosB en comparación con el SE en ratas inyectadas con solución salina (también manejadas aquí como control interno). Cuando se inyecta la nicotina en ratas criadas en SE no se aprecian diferencias en el número de neuronas inmunoreactivas en comparación con el control de solución salina, esto es consistente con los resultados encontrados en CPF por Venebra-Muñoz *et al.* (2014). Sin embargo, de manera interesante en las ratas criadas en AE e inyectadas (consumo inducido) con nicotina el número de neuronas inmunoreactivas se incrementa en comparación con las ratas criadas en SE e inyectadas (consumo inducido) con nicotina. Con relación a lo anterior, se ha demostrado que las condiciones ambientales son suficientes para modificar la sensibilidad del sistema de recompensa (Bardo *et al.*, 1997; Rahman y Bardo, 2008; Stairs y Bardo, 2009), quizá por esto se encontró un mayor número de neuronas reactivas en CPF en animales en AE. Sin embargo el número de neuronas inmunoreactivas en la CPF de las hembras es menor en comparación con los resultados encontrados en machos por Venebra-Muñoz (2014). Esta diferencia puede deberse en parte, a que la corteza cerebral de ratas hembras y

machos responden de forma diferente al AE, por ejemplo, se han reportado diferencias en cuanto a un aumento dendrítico en neuronas piramidales en la corteza cerebral dependiendo del sexo, por ejemplo Juraska (1984) observó que los machos en AE presentan un aumento de estructuras detriticas en la corteza visual en comparación con las hembras en AE; por el contrario, las hembras en AE presentan una mayor complejidad detritica que los machos en las neuronas del giro dentado del hipocampo, así mismo el AE produce un aumento mayor en el grosor de la corteza occipital en los machos, mientras que en las hembras este cambio era más importante en la corteza somatosensorial (Peña, 2007). Sin embargo en la CPF no existen datos que nos indiquen esto.

#### *Núcleo Acumbens Core.*

En la Fig.8. Se observa que el AE no hace diferencia en el número de neuronas inmunoreactivas en comparación con el SE cuando se inyecta solución salina. Cuando se inyecta nicotina en ratas criadas en SE el número de neuronas inmunoreactivas aumenta por efecto de la nicotina en comparación con el grupo en SE e inyección de solución salina. Varios estudios han demostrado que la nicotina aumenta la liberación de dopamina en el NAc core a través de las aferencias provenientes del VTA (Di Chiara, 2002; Fernández-Espejo, 2000). Además, NAc core es la región más susceptible a los mecanismos de motivación y respuestas motoras en el consumo de drogas (Harris *et al.*, 2007). De acuerdo con esto, Venebra-Muñoz (2014) encontró que ratas macho en SE expuestos a la nicotina tenían niveles más altos de neuronas inmunoreactivas que los no expuestos a nicotina. De forma interesante cuando las ratas se criaron en AE y se les inyectó nicotina el número de neuronas inmunoreactivas se incrementa en comparación con las ratas criadas en SE y con inyección de nicotina. Lo anterior sugiere que el AE provoca diferencias en la motivación y en la motricidad de los animales, esto tiene sentido por la propia configuración del AE (espacios más

grandes y novedosos).

#### *Núcleo Acumbens Shell.*

Los resultados de la Fig.9 son muy similares a las de la Fig.7. Donde se observa que el AE no hace diferencia en el número de neuronas inmunoreactivas en comparación con el SE cuando se inyecta solución salina. Cuando se inyecta nicotina a ratas criadas en SE no se aprecia diferencia en el número de neuronas inmunoreactivas en comparación con el control de solución salina. NAc shell es una región con carácter límbico (Fernández-Espejo, 2000), involucrada en la motivación de la recompensa (Harris *et al.*, 2007) especialmente a las drogas de abuso (Di Chiara *et al.*, 1993), que posee campos detriticos con entradas hipocampales, amigdalinas y prefrontocorticales (Fernandez-Espejo, 2000), lo que puede explicar un resultado similar al encontrado en CPF. De forma interesante cuando las ratas se crían en AE y se les inyecta nicotina, el número de neuronas inmunoreactivas se incrementa en comparación con las ratas criadas en SE y con inyección de nicotina. Los animales bajo AE presentan un mayor número de neuronas inmunoreactivas en NAc Shell (Solinas *et al.*, 2009), esto quizás es debido a que el AE reduce el umbral hedónico a las drogas, los animales criados en condiciones enriquecidas muestran una mayor sensibilidad a los efectos de los fármacos (Rahman y Bardo, 2008; Venebra-Muñoz, 2014), por lo que se necesita una dosis menor para activar el shell (Venebra-Muñoz *et al.*, 20011).

#### *Consumo individual*

Bajo la misma dosis inducida de nicotina en ambientes diferentes el número de células inmunoreactivas  $\Delta$ FosB cambia, y en las diferencias individuales no se muestra una tendencia de efecto por el ambiente. Como se ha visto las drogas de abuso modifican la actividad en regiones de la CPF y NAc favoreciendo la adición.

En el caso de la nicotina esta activación se ve modificada por el ambiente, pero el consumo de nicotina es altamente individualizado y parece estar determinada por ciertas características del animal ofreciendo una nueva base génica y biológica ante la búsqueda a la adicción a la nicotina (Dadmarz y Vogel, 2003).

### **CONCLUSIÓN**

Los experimentos de esta tesis muestran que el autoconsumo de nicotina aumenta los niveles de  $\Delta$ fosB, estos resultados se inclinan a favor de la hipótesis que menciona que la corteza prefrontal es la responsable de la toma de decisiones implicadas en el abuso de drogas, pero estos resultados no son del todo concluyentes ya que en este trabajo se encontraron distintas variables que abren un nuevo panorama sobre el papel de la corteza prefrontal en las adicciones. Por otra parte los resultados apoyan la idea que el AE actúa como un posible neuroprotector sobre la sensibilidad a la nicotina.

## LITERATURA CITADA

Anderson CO, Denenber VH, Zarrow MX (1972). Effects of handling and social isolation upon the rabbit's behavior. *Behavior* XLII 43(1):165-175.

Bahena-Trujillo R, Flores G, Arias-Montaña JA (2000). Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *RevBiomed* 11:39-60.

Bardo MT, Robinet PM, Hammer JR. (1997). Effect of differential rearing environments on morphine-induced behaviors, opioid receptors and dopamine synthesis. *Neuropharmacology*. 36(2):251–259.

Bazzett TJ, Becker JB (1994). Sex differences in the rapid and acute effects of estrogen on striatal D2 dopamine receptor binding. *Brain Res* 637:163-172.

Benowitz NL, Kuyt F, Jacob P, Jones RT, Osman AL (1983). Cotinine disposition and effects. *ClinPharmaTher*. 34:604-611.

Bernstein L (1957). Discrimination learning in the rat. *J. comp. Physiol. Psychol.* 50:162

Bigham WE, Griffiths WJ (1952). The effect of different environments during infancy on adult behavior in the rat. *J. Comp Physiol Psychol.* 45:307-312.

Brower VG, Matta SG, Fu Y, Sharp BM (2002). Rat strain differences in nicotine self-administration using an unlimited access paradigm. *Brain Res*;930:12–20. C.P.

Dadmarz M, Vogel WH (2003). Individual self-administration of nicotine by rats. *Pharmacology, Biochemical and Behavior* 76:425-432.

Cao J, Belluzzi JD, Loughlin SE, Dao JM, Chen Y, Leslie FM (2010a). Locomotor and stress responses to nicotine differ in adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 96:82–90.

Cao J, Belluzzi JD, Loughlin SE, Keyler DE, Pentel PR, Leslie FM (2007). Acetaldehyde, a major constituent of tobacco smoke, enhances behavioral, endocrine, and neuronal responses to nicotine in adolescent and adult rats. *Neuropsychopharmacology*. 32:2025–2035.

Cao L, Liu X, Lin ED, Wang C, Choi E, Riban V, Lin B, and Doring MJ (2010b). Environmental and Genetic Activation of Brain-Adipocyte BDNF/Leptin Axis Causes Cancer Remission and Inhibition. *Cell* 142: 52-64.

Campuzano JC, Hernandez-Avila M, Jaakkola MS et al. Determinants of salivary cotinine levels among current smokers in Mexico. *Nicotine Tob Res* 2004;6(6):997-1008.

Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J, Everitt BJ (2002). Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *NeurosciBiobehav Rev*26:321–352.

Centers for Disease Control and Prevention CDC. (2010) Surgeon General's Report—How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease. Rockville, MD: Department of Health And Human Services, Public Health Service, Office of Surgeon General (2010). [http://www.cdc.gov/tobacco/data\\_statistics/sgr/2010/index.htm](http://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/sgr/2010/index.htm)

Champtiaux N, Gotti C, Cordero-Erausquin M, David DJ, Przybylski C, Lena C, Clementi F, Moretti M, Rossi FM, Le Novere N, McIntosh JM, Gardier AM y Changeux JP (2003). Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *J Neurosci*. 23:7820-

7829.

Chaudhri N, Caggiula AR, Donny EC, Booth S, Gharib MA, Craven LA, et al (2005). Sex differences in the contribution of nicotine and nonpharmacological stimuli to nicotine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 180:258–266.

Cooper J R, Bloom F E, Roth R H. (2003). *The Biochemical basis of Neuropharmacology*. Oxford University Press, Inc. Pp 405.

Da Silva FR, Erdtmann B, Dalpiaz T, Nunes E, Ferraz A, Martins TLC, Dias JF, Da Rosa DP, Porawskie M, Bona S, Da silva J (2013). Genotoxicity of *Nicotina tabacum* leaves on *Helix aspersa*. *Genetics and Molecular Biology*. 36(2):269-275.

Dadmarz M, Vogel W (2003) Individual self-administration of nicotine by rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 76: 425-432.

Das A, Chaudhuri SK. 1995. Effects of sex steroids on the concentrations of some brain neurotransmitters in male and female rats: some new observations. *Indian J Physiol Pharmacol*. 39:223-230.

Di Chiara, G (1999). Drug addiction as dopamine-dependent associative learning disorder. *Eur. J. Pharmacol*. 375, 13–30.

Di Chiara G (2000). Role of Dopamine in the behavioural actions of nicotine related to addiction. *European Journal of Pharmacology* 393: 295-314.

Di Chiara G (2002). Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behavioural Brain Research*. 137:75-114.

Di Chiara G, Bassareo V. (2006). Reward system and addiction: what dopamine does and doesn't do. *ELSEVIER*. 7:69-76.

Di Chiara G, Tanda G, Frau R, Carboni E (1993). On the preferential release of dopamine in the nucleus accumbens by amphetamine: further evidence obtained by vertically implanted concentric dialysis probes. *Psychopharmacology Berl* 112:398–402.

ENA 2011. Instituto Nacional de Psiquiatría Ramon de la Fuente Muñoz; Instituto Nacional de Salud Pública; Secretaría de Salud. Encuesta Nacional de Adicciones 2011: Reporte de Tabaco. [www.conadic.gob.mx](http://www.conadic.gob.mx).

ENSANUT 2012. Gutiérrez JP, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Villalpando-Hernández S, Franco A, Cuevas-Nasu L, Romero-Martínez M, Hernández-Ávila M. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. Resultados Nacionales. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública.

Fernández-Espejo E (2000). Cómo funciona el Núcleo accumbens? *Rev Neurol*. 30:845-849.

Fuchs RA, Ramirez DR, Bell GH (2008). Nucleus accumbens shell and core involvement in drug context-induced reinstatement of cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology*. DOI 10.1007/s00213-008-1234-4

Geisler S, Derst C, Veh RW, Zahm DS (2007). Glutamatergic afferents of the ventral tegmental area in the rat. *J Neurosci*. 23;27(21):5730–5743 .

George O, Koob GF (2010). Individual Differences in Prefrontal Cortex Function and the Transition From Drug Use to Drug Dependence. *Neurosci Biobehav Rev.* 35(2): 232-247.

Gomez AM, Midde NM, Mactutus CF, Booze RM, Zhu J (2012). Environmental enrichment alters nicotine-mediated locomotor sensitization and phosphorylation of DARPP-32 and CREB in rat prefrontal cortex. *PLoS One.* 7: 8- e44149.

Grueter BA, Rothwell PE, Malenka RC (2012). Integrating synaptic plasticity and Striatal circuit function in addiction. *Curr Opin Neurobiol* 22(3):545–551.

Grueter BA, Robinson AJ, Never RL, Nestler EJ, Malenka RC (2013). D FosB differentially modulates nucleus accumbens direct and indirect path way function. *PNAS* 110(5): 1923-1928.

Harris GC, Hummel M, Wimmer m, Mague SD, Aston-Jones G (2007). Elevation of fosb in the nucleus accumbens during forced cocaine abstinence correlate with divergent changes in reward function. *Neurosci.* 147(3): 583-591

Hebb DO (1947). The effects of early experience on problem solving at maturity. *Am. Psychol.* 2:306–307.

Hebb DO (1949) *The organization of Behavior: A Neuropsychological Theory.* Wiley, New York.

Hinds J (2012) *The use of tobacco.* Cumberland Presbyterian Publishing House.

<http://medicolegal.tripod.com/hinds1882.htm>

Howard EC, Shcier CJ, Wetzel JS, Gonzales RA (2009). The dopamine response in the nucleus acumbens core-shell border differs from that in the core and Shell during operant ethanol self-administration. *Alcohol ClinExp Res.* 33(8): 1355-1365.

IPCS-INCHEM International Programme on Chemical Safety (2012). Nicotine. <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/nicotine.htm>

Kalivas P, Volkon ND (2005). The neuronal basis of addiction: A pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry.* 162:1403-1413.

Keath JR, Iacoviello MP, Barrett LE, Mansvelder HD y McGehee DS (2007). Differential modulation by nicotine of substantia nigra versus ventral tegmental area dopamine neurons. *J Neurophysiol*98:3388-3396.

Klink R, de Kerchove DA, Zoli M y Changeux JP (2001). Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *J Neurosci*21:1452- 1463.

Koob (1999). Drug reward and addiction: en *Fundamental neurosci.* Zigmond M, Bloom F, Landis s, Robert J, Squire L. Eds. Academic Press. USA.

Koop GF and Le MM (2006). *Neurobiology of Addiction.* ELSEVIER

Kota D, Martin BR, Robinson SE, Damaj MI (2007). Nicotine dependence and reward differ between adolescent and adult male mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 322:399–407.

Kuri-Morales PA, González-Roldán JF, Jesús-Hoy MJ, Cortés-Ramírez M.

Epidemiología del tabaquismo en México. *Salud Publica Mex* 2006; 48 (Supl. I): 91-98.

Leger M, Quiedeville A, Paizanis E, Natkunarajah S, Freret T, Boulouard M, Schumann-Bard P (2012). Environmental Enrichment Enhances Episodic-Like Memory in Association with a Modified Neuronal Activation Profile in Adult Mice. *PLOS ONE* 7:10-ea48043.

Levin ED, Slade S, Wells C, Cauley M, Petro A, Vendittelli A, Johnson M, Williams P, Horton K, Rezvani AH (2011). Threshold of Adulthood for the Onset of Nicotine Self-Administration in Male and Female Rats. *Behav Brain Res.* 225(2):473-481.

Levine Ms, et al. (1996). Neuromodulatory actions of dopamine on synaptically-evoked neostriatal responses in slices. *Synapse* 24:65-78. C.P. Fernández-Espejo E (2000). Cómo funciona el Núcleo acumbens? *Rev Neurol.* 30:845-849.

Lüscher C, Malenka RC (2011). Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: From Molecular changes to circuit remodeling. *Neuron* 69(4):650–663

Lynch WJ (2009). Sex and ovarian hormones influence vulnerability and motivation for nicotine during adolescence in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 94:43–50

Mansvelder HD y McGehee DS (2000). Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron* 27:349-357.

Markou A (2008). Neurobiology of nicotine dependence. *Philosophical Transactions of The Royal Society B.* 363, 3159-3168.

Mathieu-Kia AM, Kellogg SH, Butelman ER, Kreek MJ (2002). Nicotine addiction:

insights from recent animal studies. *Psychopharmacology (Berl)* 162:102-118

Mesa-Gresa P, Pérez-Martínez A (2012). Nicotina y modelos animales: ¿Qué nos aporta el paradigma de enriquecimiento ambiental?. *ADICCIONES* 24(2):87-94.

Morales M J (2015). Consumo individual de nicotina y presencia de  $\Delta$ FosB en el núcleo acumbens de ratas macho wistar crecidas bajo enriquecimiento ambiental y posteriormente aisladas . Tesis de licenciatura. (en proceso)

Morgan JI, Curran T (1995). Immediate-early genes: ten years on. *Trends Neurosci* 18:66–67.

NaderJ, Chauvet C, El RawasR,Favot L, JaberM,Thiriet N, Salinas M (2012). Loss of environmental enrichment increases vulnerability to cocaine addiction. *Neuropsychopharmacology* 37: 1579-1587.

Nestler EJ (2008). Transcriptional mechanisms of addiction: role of deltaFosB. *Philos Trans R Soc London B BiolSci* 363:3245–55.

Nestler EJ (2012).Transcriptional mechanisms of drug addiction. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience* 10(3): 136-143.

O'Donnell P, Grace AA (1995). Synaptic interactions among excitatory afferents to nucleus acumbens neurons: hippocampal gating of prefrontal cortical input. *J Neurosci* 15:3622-39.

Olausson P, Jentsch JD, Taylor JR. 2003. Repeated Nicotine Exposure Enhance Reward-Related Learning un the Rat. *Neuropsychopharmacology*. 28, 1264-1271

OMS Organización Mundial de la Salud (2011).WHO report on the global tobacco epidemic, 2011: warning about the dangers of tobacco. [http://www.who.int/tobacco/global\\_report/2011/en/index.html](http://www.who.int/tobacco/global_report/2011/en/index.html)

OMS. Organización Mundial de la Salud (2013). WHO report on the global tobacco epidemic, 2011: Enforcing bans on tobacco advertising, promotion and sponsorship. [http://www.who.int/tobacco/global\\_report/2013/en/index.html](http://www.who.int/tobacco/global_report/2013/en/index.html)

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

Pentkowski NS, Painter MR, Thiel KJ, Peartree NA, Cheung THC, Deviche P, Adams M, Alba J, Neisewander JL (2011). Nicotine-induced plasma corticosterone is attenuated by social interactions in male and female adolescent rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 100(1): 1-7.

Peña YO, 2007. El Enriquecimiento Ambiental en ratas: efectos diferentes en función del sexo. Universidad Autónoma de Barcelona. Tesis de Doctorado.

Perry JL, Joseph EJ, Jiang Y, Zimmerman RS, Kelly TH, Darna M, Huettl P, Dwoskin LP, Bardo MT (2011). Prefrontal Cortex and Drug Abuse Vulnerability: Translation to Prevention and Treatment Interventions. *Brain Res Rev*. 1; 65(2): 124-149.

Pierce Ch , Kumaresan V (2006). The mesolimbic dopamine system; the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *NeuroscienceBiobehav Rev.* 30:215-218.

Rahman S, Bardo MT. (2008). Environmental enrichment increases amphetamine induced glutamate neurotransmission in the nucleus accumbens: a neurochemical study. *Brain Res.* 1197:40–46.

Redolat RD (2008). *Cerebro y adicción*. Editorial UOC.Pp 568.

Reichmann F, Painsipp E, Holzer P (2013). Environmental Enrichment and Gut Inflammation Modify Stress-Induced c-Fos Expression in the Mouse Corticolimbic System. *PLOS ONE* 8:1-e54811.

Rodrigo AM (2011). *Modilacion del sistema nitrgico por nicotina: estudio con ratones nutantes*. Instituto de neurociencias castilla y león. Universidad de salamanca (Tesis Doctoral).

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.* 55:429-37.

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.

Solinas M, Thiriet N, Chauvet C, Jaber M (2010). Prevention and treatment of drug

addiction by environmental enrichment. *ELSEVIER Progress in Neurobiology* 92:572-592.

Schloesser RJ, Lehmann M, Martinowich K, Manji HK, Herkenham M (2010). Environmental enrichment requires adult neurogenesis to facilitate the recovery from psychosocial stress. *Molecular Psychiatry* 15: 1152-1163.

Stairs DJ, Bardo MT. 2009. Neurobehavioral effects of environmental enrichment and drug abuse vulnerability. *Pharmacol Biochem Behav.* 92:377-382

Steketee J (2002). Neurotransmitter systems of the medial prefrontal cortex: potential role in sensitization to psycho stimulants *Brain ResearchReviews* 41: 203–228

schwartz M y jessell T (2002). *Principios de neurociencias*. McGraw-Hill. 1400Pp.

Torres OV, Tejeda HA, Natividad LA, O'Dell LE (2008). Enhanced vulnerability to the rewarding effects of nicotine during the adolescent period of development. *Pharmacol Biochem Behav.* 90:658– 663

Torres O V, Natividad LA, Tejeda HA, Van Weelden SA, O'DellLE (2009). Female rats display dose-dependent differences to the rewarding and aversive effects of nicotine in an age-, hormone-, and sex-dependent manner. *Psychopharmacology (Berl)*. 206(2): 303-312.

Toth LA, Kregel K, Leon L, Musch TI (2011). Environmental Enrichment of Laboratory Rodents: The Answer Depends on the Question. *Comparative Medicine*. 61(4):314-321.

Valero J, España J, Parra-Damas A, Martín E, Rodríguez-Álvarez J, Saura CA (2011) Short-Term Environmental Enrichment Rescues Adult Neurogenesis and Memory Deficits in APPSw,Ind Transgenic Mice. *PLoS ONE* 6(2): e16832.

doi:10.1371/journal.pone.0016832

Vázquez PE (2008). Proyecciones de la corteza prefrontal a los núcleos monoaminérgicos del mesencéfalo: vías y receptores. Barcelona. Tesis Doctoral.

Venebra-Muñoz A, Corona-Morales A, García-García F (2011). Efecto del Ambiente Enriquecido Sobre el Consumo de Nicotina en la Rata Wistar. *Universidad y Ciencia* 27(1):97-102.

Venebra-Muñoz A, Corona-Morales A, Santiago-García J, Melgarejo-Gutierrez M, Caba M, García-García Fabio (2014). Enriched environment attenuates nicotine self-administration and induces changes in  $\Delta$ FosB expression in the rat prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Cellular, molecular and developmental neuroscience. NeuroReport* 18;25(9):688-92.

Venebra-Muñoz A, García-García, F., Victoria-Mora J.M., García-López, G., Sánchez-Aparicio, P (2015). Environmental enrichments as therapeutic alternative: studies with animal models. *Life Science Journal* 12(5): 140-145

Wallace D L, Vialou V, Rios L, Carle-Florence T L, Chakravarty S, Kumar A, Graham D L, Green T A., Kirk A, Iniguez S D, Perratti L I, Barrot Michel., DiLeone R, Nestler E, Bolanos C A (2008). The influence of  $\Delta$ FosB in the nucleus accumbens on natural reward-related behavior. *J Neurosci* 8;28(41).

Wanat MJ, Willuhn I, Clark JJ, Phillips PE (2010). Phasic dopamine release in appetitive behaviors and drug addiction. *CurrDrug Abuse Rev.* 2(2): 195-213.

Werme M, Messer C, Olson L, Gilden L, Thore'n P, Nestler E J y Brene' S. (2002)  $\Delta$ FosB regulates Wheel running. *J. Neurosci.* 22, 8133–8138.

WooltortonJR, Pidoplichko VI, Broide RS y Dani JA (2003). Differential desensitization and distribution of nicotinic acetylcholine receptor subtypes in mid brain dopamine areas. *J Neurosci*23:3176-3185.

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. *19*:1019–1027.

Yildiz D. 2004. Nicotine, its metabolism and overview of its biological effects. *ELSEVIER*.43:619-632.

Zuo Y, Lu H, Vaupel DB, Zhang Y, Chefer SI, Rea WR, Moore A, Yang Y, Stein EA. 2011. Acute nicotine-Induced Tachyphylaxis is Defferentially Manifest in the Limbic system. *Neuropsychopharmacology* 36: 2498-2512.