



# Universidad Autónoma De Tlaxcala

---

**Posgrado en Ciencias Biológicas**

Identificación de la actividad anticipatoria a la  
administración de nicotina

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIÓLOGICAS**

P r e s e n t a

Karla Yumey Bonastre Melendez

Directora de tesis

Dra. Claudia Janeth Juárez Portilla

Co-Director de tesis

Dr. Francisco Castelán





**Universidad Autónoma De Tlaxcala**

---

**Posgrado en Ciencias Biológicas**

Identificación de la actividad anticipatoria a la  
administración de nicotina

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIÓLOGICAS**

P r e s e n t a

Karla Yumey Bonastre Melendez

Directora de tesis

Dra. Claudia Janeth Juárez Portilla

Co-Director de tesis

Dr. Francisco Castelán

Tutores

Dr. Jorge Rodríguez Antolín

Dra. Rossana Citlali Zepeda Hernández

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2021

Este proyecto se realizó en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Veracruzana. Dr. Luis Castelazo Ayala S/N, Colonia Industrial Las Ánimas, C.P.91190 Xalapa de Enríquez, Veracruz, México; biomedicas@uv.mx; 228 8418900 EXT. 13404

En apoyo del Instituto de Neurootología de la Universidad Veracruzana y del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Veracruzana.

Este proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de beca: 930795

Esta Maestría en Ciencia Biológicas está registrada en el Patrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).

**COORDINACIÓN POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA**  
**P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Karla Yumey Bonastre Melendez** realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: **“Identificación de la actividad anticipatoria a la administración de nicotina”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE

TLAXCALA, TLAX., ENERO 21 DE 2021



DRA. CLAUDIA J. JUÁREZ PORTILLA



DRA. ROSSANA C. ZEPEDA HERNÁNDEZ



DRA. ÉSTELA CUEVAS ROMERO



DR. ÓSCAR LÓPEZ FRANCO



DRA. MÓNICA FLORES MUÑOZ

Xalapa, Ver., a 19 de enero de 2021

**Comité Académico**  
**Maestría en Ciencias Biológicas**  
**Universidad de Tlaxcala**  
**P r e s e n t e**

Por medio del presente hago de su conocimiento que la tesis de la estudiante Karla Yumey Bonastre Melendez, intitulada “Identificación de la actividad anticipatoria a la administración de nicotina” ha sido analizada, sin ningún filtro, con el software antiplagio Copyleaks, para asegurar la originalidad de su contenido. El reporte arrojó un 21% de similitud, mismo que se centra básicamente en la bibliografía y un poco en el método. Con base en lo anterior, encuentro aceptable la originalidad del trabajo para su aceptación.

Sin otro particular, reciba saludos cordiales.

Atentamente



---

Dra. Claudia Janeth Juárez Portilla  
Centro de Investigaciones Biomédicas  
Universidad Veracruzana

## **Agradecimientos**

### **Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala,**

Por la oportunidad de obtener este grado académico.

### **Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT),**

Por la beca otorgada para la realización de este proyecto, con número 930795.

### **A mi directora de tesis,**

Dra. Claudia J. Juárez Portilla, por todo su apoyo para la realización de este proyecto, sus enseñanzas y confianza.

### **A mi Co-director de tesis,**

Dr. Francisco Castelán, por sus valiosas aportaciones a este proyecto y su apoyo y consejos.

### **A mis sinodales,**

Dr. Jorge Rodríguez Antolín, Dra. Rossana C. Zepeda Hernández, Dra. Mónica Flores Muñoz y Dr. Oscar López Franco, por su apoyo en la mejora del proyecto e importantes aportaciones.

### **A mi madre**

Maria Luz Melendez Mejia, por apoyarme en este nuevo logro de mi vida académica, por guiarme y quererme.

### **A mi hermano**

Marcos Bonastre Melendez, por su apoyo incondicional en esta nueva meta, por su compañía y su cariño.

### **A mis hermanos,**

Luz, Dana y Leo, por su comprensión, apoyo y por compartirme de su alegría y cariño

**A mis compañeros y amigos de laboratorio,**

Diana, Sergio, Jesús, Ibis, Jonathan, Cesar, Christian y Nora, por brindarme su apoyo durante toda esta etapa y por hacer mucho más ameno el trabajo en el laboratorio.

**Al Q.F.B. Iván Manuel Rodríguez Elox,**

Por todo su cariño, ayuda y sobre todo su apoyo para la culminación de esta etapa académica.

**A mis amigos y compañeros del posgrado,**

Por acompañarme, aún en la distancia, en esta etapa y ayudarme a esclarecer las dudas que me surgieron en el camino.

## **Dedicatoria**

*A dios,*

Por permitirme alcanzar una meta más en mi vida académica, por bendecirme cada día y por darme la oportunidad de disfrutar cada logro con mi familia.

*A mi mamá y hermano,*

Por creer en mí y darme la motivación de crecer en todos los aspectos de mi vida, porque su apoyo y cariño me dieron la fuerza para alcanzar esta meta.

## Resumen

La actividad anticipatoria es referida como estado de alerta que permite a los organismos prepararse ante la futura llegada de recursos, caracterizada por presentarse ante estímulos de alto valor motivacional. Se ha reportado que las drogas de abuso, como nicotina, pueden fungir como estímulos sincronizadores de ritmos circadianos pues cuando son administradas en horarios diarios regulares se produce una actividad, mostrando un incremento de la actividad locomotora horas previas a la llegada de la droga, conocida como conducta anticipatoria (CA). Esta CA puede ser un referente importante de motivación que incrementa la probabilidad de conseguir y aprovechar el estímulo, en este caso la droga, justo antes de que ésta se presente. Las vías neurales así como las conductas relacionadas tanto a la adicción como al consumo de drogas de abuso han sido estudiadas mediante modelos animales. Por su parte, se ha considerado a la CA como un factor con influencia importante en la búsqueda de drogas desde las primeras etapas del consumo. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la administración de nicotina sobre la actividad anticipatoria en rata y ratón, mediante el uso de un sistema automatizado de registro de locomoción (SPAD 10) y uno de registro manual del estado de alerta. Para ello, en cada modelo se evaluaron dos grupos asignados al azar, el grupo experimental (nebulizado con una solución nicotina 2.5 mg/ml para ratón y 3.0 mg/ml para rata) y el grupo control (nebulizado con agua destilada). La nebulización se realizó en el mismo horario durante 20 minutos por 14 días. La actividad locomotriz de las ratas fue registrada por sensores de movimiento; la actividad del ratón se monitoreó por videograbación y posteriormente se evaluó su conducta por conteo de conductas manualmente. El día 15 de experimentación se seleccionó un sujeto representativo de cada grupo y se sacrificó para la obtención del cerebro. El cual fue preparado y tratado mediante inmunohistoquímica para la identificación de actividad neuronal durante la etapa de anticipación, usando el marcaje de proteína Fos como indicador de dicha actividad cerebral. Para los resultados manuales, ambos métodos de análisis de la CA muestran un incremento en la actividad del grupo experimental 1 h antes de la nebulización respecto al grupo control, por lo concluimos que los sujetos que recibieron nicotina, a pesar de ser modelos con características diferentes, anticiparon la llegada de la droga, lo cual nos está indicado que dentro del consumo y la búsqueda compulsiva a la nicotina, puede existir un factor circadiano que participe dentro del ciclo adictivo. Para la identificación de la actividad neuronal no obtuvimos marcaje significativo en las estructuras esperadas, por lo que se propone replantear el método y abordaje del mapeo de la actividad neuronal durante esta etapa anticipatoria. Concluyendo que el estudio de los factores que pueden contribuir al consumo de drogas, como la nicotina, mediante el uso de modelos animales, representa una herramienta muy útil para la exploración de conductas como la anticipación y así generar nuevas contribuciones al estudio de la adicción.

## **Glosario de abreviaturas**

**Am:** Amígdala

**ATV:** Área tegmental ventral

**CPF:** Corteza prefrontal

**DA:** Dopamina

**GABA:** Ácido ácido  $\gamma$ -aminobutírico

**Hipp:** Hipocampo

**LC:** Locus coeruleus

**Nac:** Núcleo accumbens

**nAChR:** Receptor colinérgico nicotínico

**NC:**Núcleo caudado

**NR:** Núcleo del rafé

**SNC:** Sistema nervioso central

## Contenido

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES	2
	2.1. Drogas y adicción	2
	2.2. Conducta adictiva	2
	2.3. Modelos animales para el estudio de la conducta adictiva	4
	1) Autoadministración	5
	2) Administración forzada	5
	2.4. Vías de administración de drogas	5
	2.5. Nicotina	7
	2.6. Proceso neurobiológico del consumo de nicotina	8
	2.6.1 Receptores colinérgicos nicotínicos	8
	2.6.2. Circuitos neurales del consumo de nicotina	11
	2.7. Cronobiología y ritmos biológicos	14
	2.8. Conducta de anticipación	15
III.	HIPÓTESIS.	19
IV.	OBJETIVOS.	19
V.	MATERIALES Y MÉTODO	20
	5.1. Animales y alojamiento	20
	5.2. Preparación de la droga	20
	5.3. Sistema de nebulización	20
	5.4. Grupos experimentales	21
	5.5. Protocolo para administración por nebulización	22
	5.6. Análisis conductual de locomoción por registro circadiano automatizado	22
	5.7. Análisis conductual por método manual	22
	5.8. Actividad en estructuras cerebrales durante la anticipación	23
	5.9. Análisis estadístico	24
VI.	VI. RESULTADOS	24
	6.1. Identificación de la actividad anticipatoria por método de registro circadiano	
	6.2. Identificación de la actividad anticipatoria por método de registro manual	24

6.3. Marcaje de Fos por inmunohistoquímica	30
VII. CONCLUSIÓN	41
VIII. REFERENCIAS	43
IX. ANEXOS	60

## Índice de figuras

<i>Figura 1. Patrón de concentración plasmática de nicotina.</i>	6
<i>Figura 2. Estructura molecular de la nicotina.</i>	7
<i>Figura 3. Topología del receptor nicotínico neuronal.</i>	9
<i>Figura 4. Distribución de nAChRs en el Sistema Nervioso Central de la rata.</i>	10
<i>Figura 5. Vía mesocorticolímbica.</i>	12
<i>Figura 6. Actividad anticipatoria al alimento.</i>	17
<i>Figura 7. Actividad anticipatoria a metanfetamina.</i>	18
<i>Figura 8. Aparato experimental:</i>	21
<i>Figura 9. Análisis cualitativo de la actividad locomotora de un sujeto representativo de cada grupo.</i>	25
<i>Figura 10. Conducta diaria locomotora grupal.</i>	26
<i>Figura 11. Actividad anticipatoria a nicotina en rata.</i>	27
<i>Figura 12. Fotografías de algunas de las conductas contempladas en el estado de alerta.</i>	28
<i>Figura 13. Perfil de actividad durante una hora previa de cada grupo.</i>	29
<i>Figura 14. Tasa neta de cambio en la conducta.</i>	30
<i>Figura 15. Marcaje de células inmunorreactivas a Fos en ratón.</i>	31
<i>Figura 16. Marcaje de células inmunorreactivas a Fos en ratón.</i>	32
<i>Figura 17. Marcaje de células inmunorreactivas a Fos en rata.</i>	33
<i>Figura 18. Área correspondiente a la corteza motora (M1) en rata.</i>	34
<i>Figura 19. Panel de imágenes correspondientes a la corteza prefrontal (CPF), septum lateral (SL) y núcleo dorsomedial del hipotálamo (HDM) en ratón y rata, del grupo administrado con nicotina (N) y el grupo control administrado con solución libre de nicotina (C).</i>	35

## I. INTRODUCCIÓN

La adicción a las drogas es un trastorno que afecta a millones de personas en todo el mundo (Kutlu y Gould, 2016). La conducta adictiva involucra el consumo compulsivo de una sustancia como resultado del uso repetido y prolongado de la misma, debido a los efectos gratificantes y a pesar de las consecuencias perjudiciales (Becker et al., 2016; Andrianarivelo et al., 2019). El abuso de drogas, como la nicotina, es considerado un problema de salud pública, tanto a nivel nacional como internacional (García et al., 2017; Clemens et al., 2014).

Actualmente se ha reportado que el horario en que las drogas son consumidas puede ser un factor importante en el desarrollo de la conducta de búsqueda de la misma y su efecto. Basado en el hecho de que la mayoría de los organismos vivos exhiben fluctuaciones periódicas en su fisiología y conducta, estos ritmos se adaptan para permitir a los organismos prepararse a eventos diarios predecibles (Webb et al., 2009). Estas oscilaciones con duración cercana a las 24 horas son conocidas como ritmos circadianos, los cuales permiten a los organismos adaptarse a los cambios en su entorno (Mistlberger, 2020).

Se ha sugerido que las drogas de abuso, al ser estímulos altamente recompensantes, pueden funcionar como sincronizadores de estos ritmos (Gatto et al., 1994; Honma y Honma, 1995). La función adaptativa de los ritmos circadianos se basa en la sincronización o coordinación temporal de los osciladores circadianos entre los tejidos centrales y periféricos, además del acoplamiento de esos osciladores con el entorno externo, lo que le permite a los sujetos prepararse e incluso anticiparse a los estímulos (Webb et al., 2009, Depoy, 2017). En este sentido, la conducta anticipatoria es un estado de alerta que permite a los organismos prepararse ante futuros eventos o estímulos. El despliegue de una conducta de anticipación hacia un recurso hace que se incremente la probabilidad de conseguirlo y aprovecharlo cuando éste se presente (Schultz, 1998).

## **II. ANTECEDENTES**

### **2.1. Drogas y adicción**

Farmacológicamente, una droga es considerada como cualquier sustancia química que modifica los procesos fisiológicos y bioquímicos de los tejidos o los organismos (OMS, 1994; Pons, 2008). Coloquialmente este término hace referencia a sustancias psicoactivas, cuyo efecto es caracterizado por producir un estado placentero, mediado principalmente por las áreas de recompensa del cerebro (Dafny y Rosenfeld, 2017). La investigación actual sobre los mecanismos del consumo y abuso de las drogas son la base fundamental del entendimiento de este trastorno que actualmente representa uno de los principales problemas de salud a nivel mundial (Koob y Volkow, 2010; Kutlu y Gould, 2016). El abordaje del estudio de la conducta adictiva considera otros parámetros además de los cambios en los sistemas de recompensa, debido a que actualmente es bien sabido que se trata de un proceso complejo en el cual se pueden encontrar involucrados distintos factores fisiológicos, sociales, genéticos, etc., (Brockett et al., 2018).

El abuso de sustancias adictivas, referido principalmente como adicción, se caracteriza por la pérdida de control sobre el consumo persistente, a pesar de las consecuencias negativas, y una motivación alta por consumir la droga a expensas de otras actividades (Milton y Everitt, 2012; Koob y Volkow, 2016, Andrianarivelo et al., 2019). Actualmente, la adicción ha dejado de ser considerada como una simple decisión del individuo para ser contemplado como un trastorno. De tal manera que, tanto en la última edición (2013) del Manual de Diagnóstico y Estadística de Trastornos Médicos de las Asociaciones de Psiquiatría de Estados Unidos (DSM-5) como en la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10), ya se incluye la adicción. Ambos documentos reconocen que se requiere una variedad de criterios identificados por una evaluación exhaustiva por parte de un psicólogo clínico, un psiquiatra o un consejero de alcohol y drogas con licencia para su diagnóstico (Zou et al., 2017).

### **2.2. Conducta adictiva**

La estigmatización social y la culpa moralizada, que ha acompañado por décadas a las personas adictas, son dos de los factores más contraproducentes para lograr la comprensión completa del concepto de la adicción. Actualmente, con base en los descubrimientos neurocientíficos se ha

llegado a describir esta afección como una condición generada por un patrón multifactorial de conductas, y como ya se mencionó, ahora es abordado como un trastorno (Ross, 2020). Las conductas que se han identificado como base de la adicción se encuentran incluidas en cuatro etapas: intoxicación, tolerancia, síndrome de abstinencia y recaída (OMS, 2011; Zehra *et al.*, 2018).

Si bien, las razones para el uso inicial de drogas son diversas, se describe como etapa de intoxicación a las primeras administraciones, en las cuales se experimentan los efectos placenteros de la droga, efecto que termina por disiparse, propiciando el uso repetido de la droga (Leshner, 2001). Como resultado del consumo constante de la sustancia se desarrolla la dependencia, la cual se caracteriza por el desarrollo de procesos como la tolerancia y la abstinencia (He y Tao, 2017).

La tolerancia surge como consecuencia de la exposición crónica y repetida a una sustancia psicoactiva que conduce a fenómenos de adaptación cerebral progresiva (Turton y Lingford, 2016; Karila y Benyamina, 2019). Lo anterior implica que la droga debe administrarse en dosis cada vez más grandes para lograr la intoxicación o el efecto deseado (Di Chiara, 2000; Zou *et al.*, 2017).

Posteriormente, el cese del consumo de cualquier droga adictiva conlleva a un síndrome de abstinencia y estado motivacional de búsqueda continua (Ciccocioppo *et al.*, 2001). En algunas drogas, como la nicotina, este estado surge desde unas horas después del último consumo y puede durar más de 6 meses (Shiffman *et al.*, 2004). Los síntomas de la abstinencia incluyen irritabilidad, estrés, ansiedad, déficit cognitivo y de atención, problemas para conciliar el sueño e incremento de apetito, entre otros (Pereira, 2008; Leshner, 2001). Finalmente, la búsqueda de la eliminación de los síntomas negativos que se experimentan durante la abstinencia conlleva a la fase de recaída, es decir, la reincidencia en el uso de la droga y el restablecimiento de su consumo (King *et al.*, 2020), reiniciado así el ciclo adictivo (Di Chiara, 2000).

Como se ha descrito, los sujetos dedican mucho tiempo y esfuerzo a la adquisición de drogas. Dicha búsqueda compulsiva se presenta a pesar de las consecuencias negativas y ocurre

aun después de que la droga se ha eliminado del sistema. Es así como se ha inferido que esta compulsión no es simplemente el resultado del efecto farmacológico, sino que es desencadenado por factores promovidos por la droga, pero no regulados directamente por la misma (Lüscher et al, 2020). Por lo que este estado de deseo o búsqueda ha surgido como base fundamental en la fisiopatología de los comportamientos adictivos, siendo un síntoma clínico clave en la adicción (Tiffany y Wray, 2011; Di Nicola et al., 2015).

El estado de preocupación/anticipación ocasionado por el deseo constante de la droga, desencadena a su vez la conducta de búsqueda compulsiva (Koob y Volkow, 2010; May et al., 2020). Este deseo es considerado crucial tanto en la transición del consumo controlado al abuso, como en el mecanismo involucrado en la recaída (Di Nicola et al., 2015). A este incremento del deseo por ingerir la droga se le conoce como “*craving*”, en inglés, e involucra grandes gastos de energía física y mental por parte del individuo para su consumo (Sinha, 2001; Spanagel y Heiling, 2005; Robinson y Berridge, 2008). El *craving* se ha relacionado con el comportamiento motivado, que implica tanto una receptividad del individuo para estímulos ambientales, como una manifestación conductual destinada a un objeto concreto (Pereira, 2008).

### **2.3. Modelos animales para el estudio de la conducta adictiva**

Los modelos animales han sido utilizados por las ciencias biológicas casi desde sus inicios; la investigación actual en medicina se basa principalmente en estos (Laborda, 2009), dado que son una herramienta que tiene la ventaja de permitir que el experimentador pueda controlar ciertos factores, tales como: el ambiente, las bases genéticas y la exposición del animal experimental. Además, permite conocer los correlatos neuroconductuales, neuroquímicos y neurofisiológicos asociados con el estado conductual, fisiológico y/o neurológico que se modela (Bell *et al.*, 2017).

Es por ello que los modelos animales son ampliamente usados en estudios de los mecanismos neurobiológicos subyacentes al comportamiento adictivo (Koob y Volkow, 2010). Aunque ningún modelo animal de adicción emula completamente la condición humana del padecimiento, sí permiten la investigación de elementos específicos del proceso de adicción a las drogas, reproduciendo diferentes etapas del ciclo de adicción (Luscher, 2013; Kenny et al., 2018).

Los protocolos diseñados para el abordaje de la conducta adictiva son diversos; con respecto a la manera en que la droga es administrada al sujeto experimental, se consideran, de manera general, dos modelos de consumo:

### **1) Autoadministración**

En el método de autoadministración de drogas, el sujeto emite una conducta que conduce a la administración contingente de una droga (Smit, 2019). Puede ser bajo un paradigma basado en el condicionamiento operante, en el cual el animal debe realizar un comportamiento, como presionar una palanca para recibir una dosis de la sustancia, principalmente por vía intravenosa u oral, o un paradigma en el cual el animal tiene libre acceso a la sustancia y puede consumirla fácilmente (Marchant et al., 2013; García et al., 2017). Estos modelos tienen como base la evaluación de conductas voluntarias. Sin embargo, se ha observado que en algunos casos, al proporcionar el acceso voluntario ilimitado, los sujetos pueden llegar a ingerir sobredosis que los conduce a una fuerte intoxicación o hasta la muerte (Spanagel, 2017).

### **2) Administración forzada**

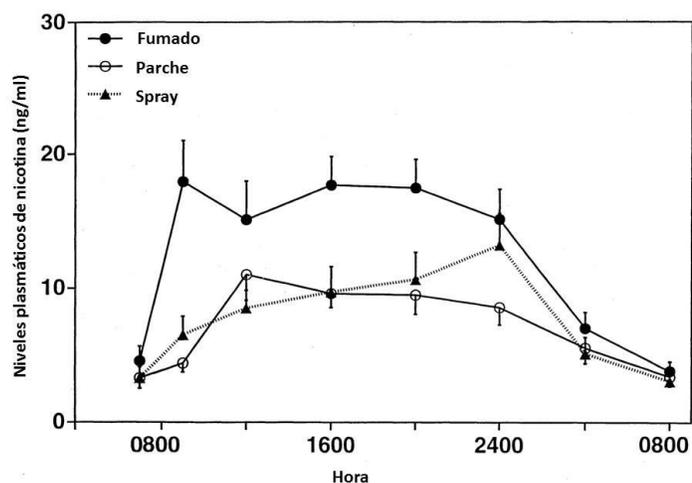
Los modelos de administración forzada se refieren al consumo no voluntario de la droga, de los cuales los más utilizados se basan en la inyección de una dosis conocida de la droga, para luego evaluar diversas conductas en distintos períodos. En estos modelos, el investigador puede controlar la dosis, la periodicidad y el momento de la prueba, lo que representa ventajas importantes (Mustaca y Kamenetzky, 2006). Dentro de los métodos de administración forzada más empleados se incluyen la vía intragástrica (oral), intraperitoneal y subcutánea (Diehl et al., 2001). Aunque este método no se basa en la búsqueda voluntaria, es utilizado en protocolo como el condicionamiento asociativo, donde los sujetos pueden asociar características ambientales con la administración de la droga (Venniro et al., 2018).

## **2.4. Vías de administración de drogas**

La vía de administración es la ruta por la que una droga o fármaco es introducida al organismo y por lo tanto afecta la biodisponibilidad del mismo y determina tanto el inicio como la duración del efecto (Ruiz y Scioli, 2018). En el caso de las sustancias con efectos psicoactivos, éstas

deben cruzar la barrera hematoencefálica para poder llegar al cerebro y, así, desencadenar sus efectos centrales (Devadasu et al., 2018).

Con base en los principios farmacocinéticos, está reportado que, a igualdad de dosis, la concentración plasmática de una sustancia es directamente proporcional a la velocidad en que se absorbe, e igualmente, más rápido es el aumento y el decremento de estas concentraciones. En este sentido, se ha propuesto que la propensión a desarrollar adicción, a una droga en particular, depende de la rapidez con que la sustancia llegue al cerebro, lo que indica la relevancia de la vía de administración (Fig. 1) (Otero, 2013; Galvalisi et al., 2016).



**Figura 1. Patrón de concentración plasmática de nicotina.**

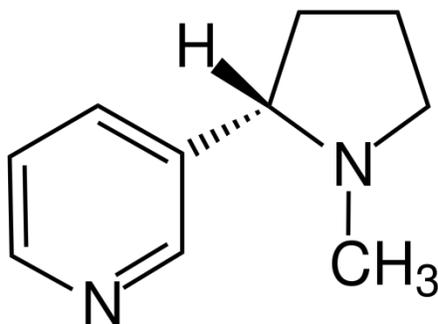
*Niveles de nicotina durante consumo de nicotina por distintos productos de administración (Tomado de Benowitz et al., 2002).*

Aunque existe una variedad de factores que condicionan el potencial adictivo de una sustancia, se ha observado que la forma de la droga y la vía de absorción influyen tanto en la respuesta como en los efectos adversos (Montoya y Mazón, 2017). El efecto de una droga depende directamente de lo rápido que se produzcan las acciones centrales y de lo intensos que éstos sean. Por lo anterior, la vía inhalatoria es considerada particularmente adictiva (Otero,

2013), pues se han observado diferencias importantes en los niveles plasmáticos usando esta vía en relación con otras vías de administración de drogas (Newmeyer et al., 2016).

## 2.5. Nicotina

La nicotina, una amina terciaria compuesta de una piridina y un anillo de pirrolidina (Fig. 2), es un alcaloide natural, que se obtiene de las hojas de la planta del tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Yorgancilar et al., 2012). De entre las más de 4000 sustancias identificadas en el humo del tabaco, la nicotina es considerada como el químico farmacológicamente activo principal del tabaco que tiene efectos a nivel de sistema nervioso central (SNC); así, juega un papel fundamental en la adicción al tabaco (Pérez et al., 2007; Goodwin et al., 2014; Zhang et al., 2019). La nicotina es consumida principalmente por vía inhalatoria en productos como cigarrillos (Otero, 2013), así al inhalar el humo de tabaco, el fumador promedio consume entre 1 y 2 mg de nicotina (National Institute of Drug Abuse, 2010).



*Figura 2. Estructura molecular de la nicotina.*

En México, el Instituto Nacional de Salud Pública, a través de la Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco (ENCODAT) 2016–2017, estima que 14.9 millones de mexicanos son fumadores actuales, lo que corresponde al 17.6% de la población de 12 a 65 años. Se considera que el tabaco representa una de las mayores amenazas a la salud pública, al ser la primera causa de muertes prevenibles en el mundo con aproximadamente 6 millones de muertes anuales (OMS, 2011; Clemens et al., 2014).

Al fumar cigarrillos, la nicotina se destila a partir de la combustión de tabaco y se transporta en partículas de alquitrán hacia la parte inferior del tracto respiratorio (inhalación) (Hukkanen et al., 2005; Anderson y Chan, 2016). La nicotina contenida en el humo del tabaco se absorbe rápidamente debido a la gran superficie de los alvéolos del pulmón y las pequeñas vías respiratorias (Shao et al., 2018). Después de una inhalación, niveles altos de nicotina llegan al cerebro en 10-20 segundos. Se ha demostrado que tanto la velocidad como la ruta de administración de nicotina juegan un papel importante en el potencial adictivo de la droga, con base en que cuanto más rápido se administra, más rápido se alcanza el sitio blanco, desencadenando un fuerte efecto farmacológico, lo que se interpreta como un mayor riesgo de dependencia. Lo anterior explica por qué la inhalación de nicotina del humo del tabaco se considera más adictiva que otras vías de consumo, y a su vez la vía con mayor potencial reforzador, conduciendo a un estado de dependencia (Benowitz et al., 2009; Majdi et al., 2017).

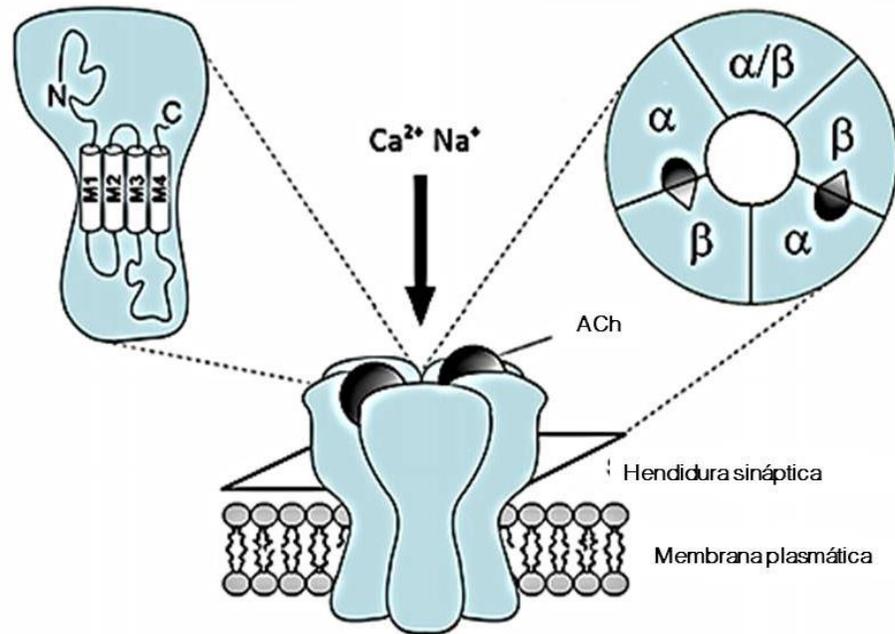
La mayoría (70 - 80%) de nicotina se degrada al metabolito cotinina por la acción de microenzimas hepáticas (Elhassan et al., 2017). El citocromo P450 2A6 (CYP2A6) es responsable del 90% de esta degradación, aunque la participación de la isoforma de las enzimas de citocromo puede depender de la concentración en el hígado de cada individuo (Tiwari et al., 2020).

## **2.6. Proceso neurobiológico del consumo de nicotina**

### **2.6.1 Receptores colinérgicos nicotínicos**

Los receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChR) son canales iónicos transmembranales selectivos para cationes ( $K^+$ ,  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$ ). Estos pertenecen a la superfamilia de canales iónicos activados por ligando (Fig. 3). Los nAChR de la placa neuromuscular están formados por cinco subunidades diferentes:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$  (fetal) o  $\epsilon$  (adulto), pero los receptores nicotínicos neuronales se forman mediante la combinación de solo dos tipos de subunidades ( $\alpha 2-10$  y  $\beta 2-4$ ) (Ferreira et al., 2016; Criado, 2017). Una variedad amplia de subtipos de nAChR, que surge de las posibles combinaciones de subunidades que componen el complejo canal-receptor, han sido reportados. Sin embargo, hasta la fecha, el receptor heteromérico  $\alpha 4\beta 2$

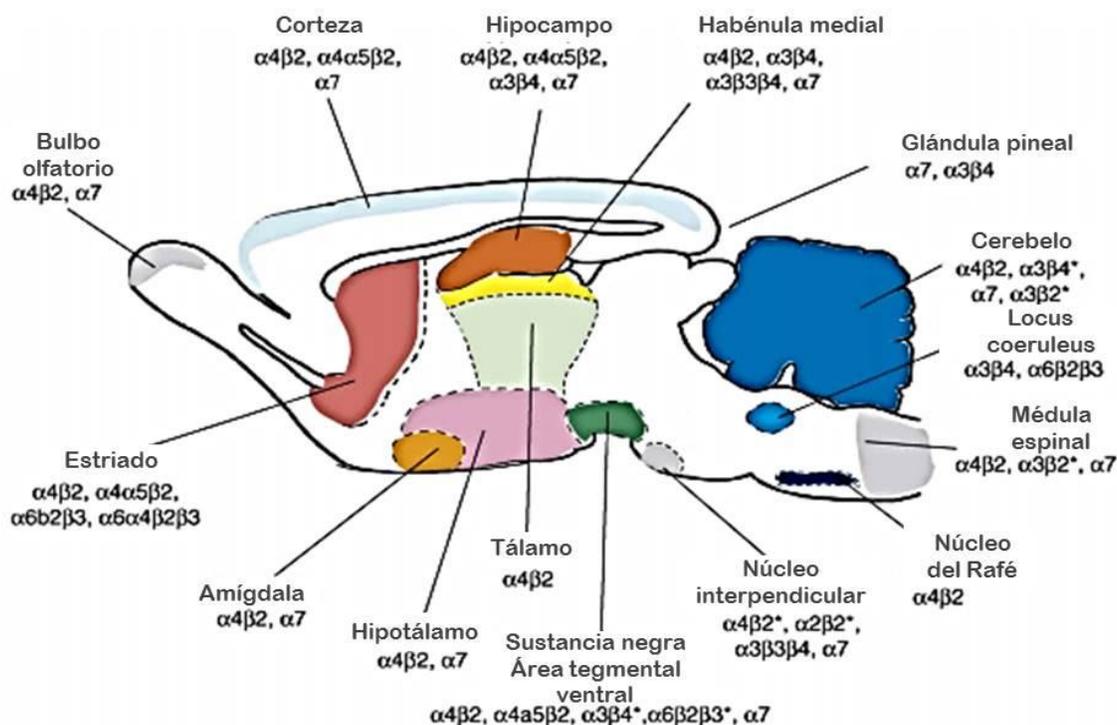
y el homomérico  $\alpha 7$  son los subtipos predominantes encontrados en el cerebro de los mamíferos (Terry y Callahan, 2020).



**Figura 3. Topología del receptor nicotínico neuronal.**

*Izquierda: Diagrama que muestra la topografía de las subunidades nAChR, con una porción amino terminal extracelular seguida por tres dominios transmembrana hidrófobos (M1-M3), una gran asa intracelular y un cuarto dominio transmembrana hidrófobo (M4). Medio: Disposición de las subunidades en un receptor ensamblado. Derecha: Localización y organización de los sitios de unión a acetilcolina en un receptor heteromérico (Modificado de Zoli et al., 2015).*

Los nAChR se encuentran distribuidos en diferentes zonas cerebrales y se han ubicado por la identificación de algunas de las subunidades conformacionales (Fig. 4), aunque particularmente están ubicados en el cuerpo estriado, el núcleo accumbens (NAc), el área tegmental ventral (ATV) y el mesencéfalo (Tiwari et al., 2020).



**Figura 4. Distribución de nAChRs en el Sistema Nervioso Central de la rata.**

*Distribución regional y organización de las principales subunidades identificadas de los nAChR en cerebro de roedor (Modificado de Gotti et al., 2006).*

Si bien se han identificado una gran variedad de subtipos de receptores a nicotina, a pesar de presentar diferentes propiedades funcionales y farmacológicas, estos comparten características básicas (Dani y Bertrand, 2007). La mayoría de estos receptores son excitadores de acción rápida (rango de milisegundos), modulando la liberación de otros neurotransmisores, incluyendo acetilcolina (ACh), dopamina (DA), serotonina, glutamato, ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y norepinefrina. Estos receptores se localizan principalmente en las neuronas presinápticas, sin embargo, los nAChR de las neuronas dopaminérgicas del ATV, una región cerebral crítica para el refuerzo de drogas, se localizan en neuronas postsinápticas (Valentine y Sofuoglu, 2018). Se ha reportado que, al modular distintos eventos conductuales, los nAChR participan en aspectos fundamentales de la plasticidad sináptica que están involucrados en la

atención, el aprendizaje, la memoria y el desarrollo, así como en la disminución, la interrupción o las alteraciones de los mecanismos colinérgicos, como la adicción (Dani y Bertrand, 2007).

La actividad de la nicotina en el cerebro, incluidas sus propiedades de refuerzo que conducen a la adicción, se debe a su interacción con los nAChR, funcionando como agonista de la acetilcolina (Gotti et al., 2009; Morales et al., 2016), por lo que este receptor es considerado como el mediador principal de la dependencia a la nicotina (Benowitz, 2010).

Debido a la distribución amplia de los nAChR, la administración de nicotina promueve la liberación de una variedad de neurotransmisores en todo el cerebro, pero las interacciones entre los receptores glutamato-GABA-dopamina-acetilcolina han mostrado tener la participación principal en numerosas respuestas conductuales a la nicotina (Markou, 2008).

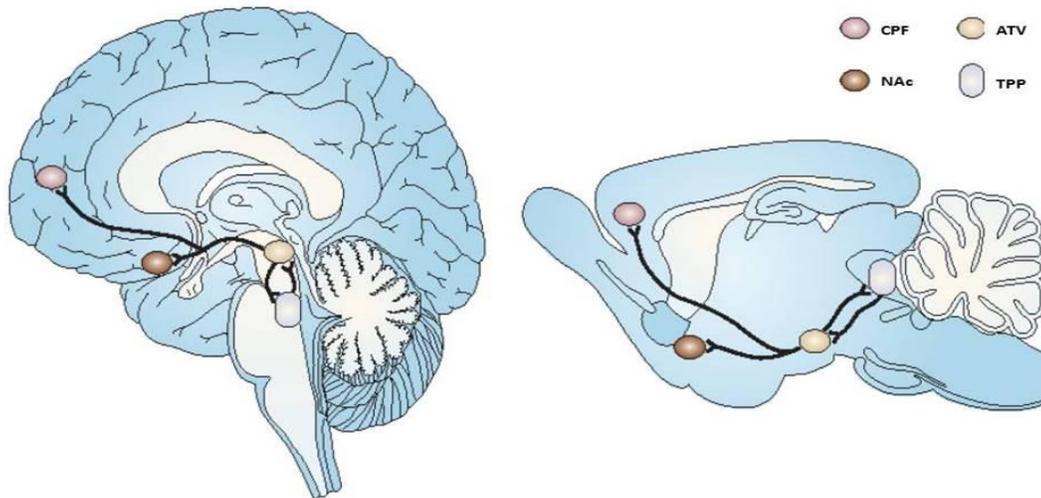
### **2.6.2. Circuitos neurales del consumo de nicotina**

Para comprender los cambios ocasionados por el consumo repetitivo de un psicoestimulante, es necesario identificar los sitios del cerebro donde el fármaco se une para ejercer su efecto. El principio general señala que todas las sustancias de abuso comparten un neurocircuito común conocido como sistema de motivación o recompensa cerebral, en el cual participan una gran variedad de sistemas neurales, incluyendo áreas normalmente involucradas en la motivación de los refuerzos naturales como la comida, el agua, el sexo, la música y los juegos electrónicos (Dafny y Rosenfeld, 2017; Feltenstein et al., 2020), por mencionar algunos ejemplos.

El circuito de recompensa involucra el sistema mesolímbico, responsable principal en el manejo y mediación de la motivación, la emoción y la actividad motora. Este circuito consta de la interconexión de una variedad de estructuras cerebrales como son el ATV, NAc, corteza prefrontal (CPF), hipocampo (Hipp), amígdala (Am), núcleo caudado (NC), locus coeruleus (LC), y los núcleos del rafé (NR) (Dafny y Rosenfeld, 2017; Tiwari et al., 2020).

Además de la variedad estructural, una serie de sistemas de neurotransmisores están involucrados en las respuestas a recompensas, particularmente la DA, que está fuertemente implicada en el procesamiento de recompensas y los efectos reforzadores de las sustancias adictivas (Richter, 2019).

La vía mesolímbica dopaminérgica es un componente importante implicado en la recompensa y la adicción, e incluye proyecciones dopaminérgicas (DAérgicas) que se originan desde el ATV hacia el NAc. Durante el estado de reposo, las neuronas DAérgicas suelen seguir un patrón de activación constante y de baja frecuencia, el cual al responder a estímulos recompensantes se disparan en un patrón fásico, lo que a su vez indica un comportamiento motivado por objetivos (Criscitelli y Avena, 2016).



**Figura 5. Vía mesocorticolímbica.**

*Eferencias y aferencias del área tegmental ventral (ATV). Cerebro humano (izquierda) y cerebro de roedor (derecha), que muestran las vías de dopamina (DA) mesolímbica y mesocortical que se originan en el ATV y envían proyecciones ascendentes al núcleo accumbens (NAc) y la corteza prefrontal (CPF) y proyección descendente al núcleo tegmental pedunculopontino (TPP) (Modificado de Laviolette y Van, 2004).*

Al igual que otras sustancias adictivas, la nicotina aumenta la actividad del sistema DAérgico. Este sistema está constituido por diferentes vías y núcleos; la vía mesolímbica es la que se ha identificado, principalmente en los procesos de adicción a esta droga (Pérez Ahuactzin, 2014). Como se mencionó anteriormente, este aumento de DA es considerado como el responsable principal de los efectos gratificantes y placenteros de la nicotina (Fig. 5). Además, se presentan aumentos en la liberación de DA en otras estructuras como el Hipp, el cual participa en los efectos cognitivos de la nicotina sobre la atención y la memoria junto con los efectos directos de la acetilcolina (Laviolette y Van, 2004; Pérez et al., 2011; Chawla y Garrison, 2018).

Si bien la DA es considerada como esencial en los efectos de la nicotina sobre el cerebro, la actividad de esta droga involucra otros sistemas neurales, como el sistema GABAérgico, el cual tiene un efecto inhibitorio o de "frenado" clave en las neuronas dopaminérgicas. Lo anterior se debe a que los receptores nicotínicos regulan la actividad errática de GABA, modulando a su vez las neuronas dopaminérgicas de recompensa mesolímbica. Por lo tanto, cuando estos receptores inhibidores se activan por el consumo de estimulantes como la nicotina, la inhibición neuronal de la neurona dopaminérgica por GABA se reduce, lo que, en consecuencia, permite el aumento de las concentraciones de dopamina en el NAc y el estriado ventral en la recompensa y la adicción (Turton y Lingford, 2016). Es por ello que las investigaciones recientes han resaltado la importancia de otros neurotransmisores, incluidos la acetilcolina, serotonina, GABA, glutamato, noradrenalina y endorfinas, como mediadores importantes de varios efectos vinculados al consumo de nicotina (Benowitz, 2008; Jiloh, 2019).

Además de las respuestas al consumo agudo de la nicotina, estudios de imagenología han detectado diferencias en la estructura del cerebro entre fumadores y no fumadores en las áreas de la sustancia blanca del cerebro, específicamente en el haz cingulado anterior y sus conexiones con circuitos relacionados con la memoria, la motivación, la función ejecutiva y el estado de ánimo. Con ello se respalda el hecho de que el consumo crónico, además de regular positivamente los receptores implicados en su efecto farmacológico, a lo largo del tiempo puede provocar cambios neuroplásticos en los sistemas cerebrales, lo cual repercute en varios síntomas de la dependencia de la nicotina (Siqueira, 2016; Siscitelli y Avena, 2016).

## **2.7. Cronobiología y ritmos biológicos**

Aunado a los factores y vías que participan en el desarrollo del efecto farmacológico de un fármaco o droga de abuso, así como otros estímulos, se cree que pueden ser dependientes de las variaciones temporales. Partiendo de que básicamente todos los aspectos de eventos vitales como la frecuencia cardíaca, la presión arterial, la temperatura corporal y el sueño tienen una organización temporal durante el período de un día, la respuesta a estímulos presenta variaciones en distintas etapas (Garbani et al., 2016). La cronobiología, entonces, se basa en el estudio de estas oscilaciones biológicas transcurridas en un tiempo determinado, donde se evalúa el cambio de la respuesta fisiológica, psicológica o conductual ante estímulos físicos o farmacológicos (Zaki et al., 2019; Ohdo et al., 2019).

Las variaciones cíclicas en la fisiología y la conducta que presentan la mayoría de los organismos como adaptación al ambiente, les permite prepararse ante eventos predecibles (Reppert y Weaver, 2001). Es por ello que los ritmos biológicos son una base importante para la supervivencia de los organismos influyendo en varios aspectos del comportamiento a nivel bioquímico y fisiológico. De manera natural, estas oscilaciones se acoplan al medio ambiente modificando el comportamiento en los sujetos para permitir una adaptación óptima al entorno (Kuhlman et al., 2017; Fang, 2019).

Las señales ambientales capaces de adaptar los ritmos biológicos son conocidas como sincronizadores. Los ciclos de luz/oscuridad son los sistemas de sincronización más estudiados. Actualmente se conocen algunos otros estímulos con estas capacidades, que son independientes de los estímulos fóticos, como señales auditivas, sociales, estresantes y farmacológicas (Mieda, 2006; Escobar et al., 2001).

La presencia de estas oscilaciones ocurre en una amplia gama de períodos, desde una fracción de segundos hasta años, y con una variedad de mecanismos subyacentes (Goldbeter, 2017). Los ritmos circadianos son los más estudiados, por su presencia en muchas funciones fisiológicas y conductuales, caracterizados por ser intrínsecos al organismo, es decir, aún en ausencia de los estímulos sincronizadores externos, continúan expresándose con un período de

24 horas aproximadamente, lo que sugiere que están bajo el control circadiano endógeno por el reloj cerebral (Baker, 2007; Keith et al, 2013; Reid, 2019).

El sistema circadiano está compuesto por tres elementos neurales principales; un sistema o vía de entrada, un marcapasos circadiano y un sistema o vía de salida. Estos tres componentes están acoplados y funcionan como unidades integradas que envían señales al cerebro, donde son integradas y codificadas, para posteriormente modular la ritmicidad circadianas (Gachón et al., 2004). En el sistema circadiano de los mamíferos el reloj maestro encargado de otorgar esta periodicidad al organismo se encuentra en el núcleo supraquiasmático (SCN) del hipotálamo, presidiendo una red distribuida de los relojes periféricos que se encuentran en todo el cuerpo (Moore y Lenn, 1972; Stephan y Zucker, 1972; Huang et al, 2011; Honma, 2018). Además se ha reportado la existencia de al menos otros dos relojes en el dominio circadiano que son independientes del SCN y que se sincronizan con señales de tiempo no fóticas, como los inducidos por alimentación diaria restringida, aunque no se conoce el sitio ni el mecanismo de estos relojes (Verwey et al, 2007; Homma y Honma, 2011).

## **2.8. Conducta de anticipación**

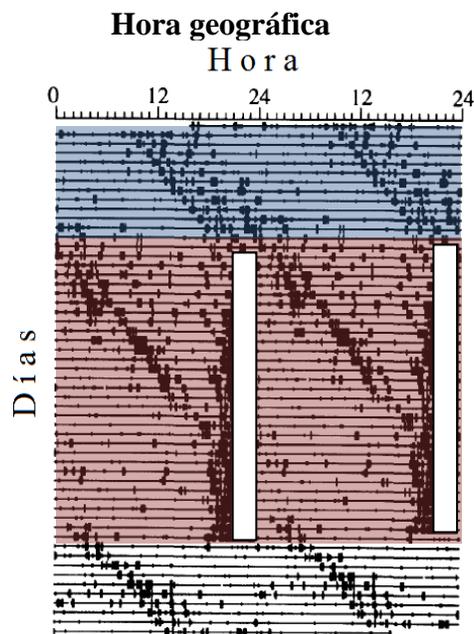
Debido a que las fluctuaciones ambientales son, hasta cierto punto, un reto para la supervivencia, los organismos han generado mecanismos, como estrategia adaptativa, que les permiten ajustar tanto su conducta como sus procesos fisiológicos a estas variaciones cíclicas, e inclusive anticiparse a ellas. En este sentido, la anticipación se puede definir como una conducta de estado de alerta, que permite a los organismos prepararse ante eventos o estímulos futuros, incrementando así la probabilidad de conseguirlos y aprovecharlos justo antes de que estos se presenten (Schultz, 1998). Esta conducta de anticipación se expresa ante estímulos de alto valor motivacional que poseen las características de un reforzador y que se presentan de forma regular (Feillet et al., 2006; Koob y Volkow, 2010).

Tal como se ha descrito anteriormente, las drogas de abuso tienen efecto sobre el sistema límbico, ya que tras ser consumidas producen en el individuo una sensación placentera, de esta manera adquiere el carácter de reforzador positivo, (Dafny y Rosenfeld, 2017). Se ha reportado que el horario en que las drogas son consumidas puede ser un factor importante en el desarrollo

de la conducta de búsqueda de la misma así como su efecto (Kandeger et al., 2018). Mediante modelos animales se ha observado que a diferentes horas del día tanto el patrón de consumo voluntario de metanfetamina como sus efectos conductuales se modifican (Keith et al., 2013; Shappell et al., 1996). En humanos, reportes epidemiológicos han descrito que existe una tendencia de ingreso a las salas de emergencias de pacientes con intoxicación por sobredosis a drogas de abuso a ciertas horas del día (Erickson, et al., 1998; Raymond et al., 1992).

Con base en lo anterior se ha planteado que las drogas pueden funcionar como estímulos capaces de generar comportamientos circadianos en su consumo. Actualmente, es bien sabido que algunas drogas, al igual que otras recompensas como comida, dulces altamente apetecibles y sexo (Pfaus et al., 1990; Ángeles et al., 2007; Pitchers, 2012; Blancas y Escobar, 2013), funcionan como estímulos capaces de generar comportamientos circadianos asociados con la anticipación cuando el consumo es en intervalos programados (Juárez-Portilla et al., 2018).

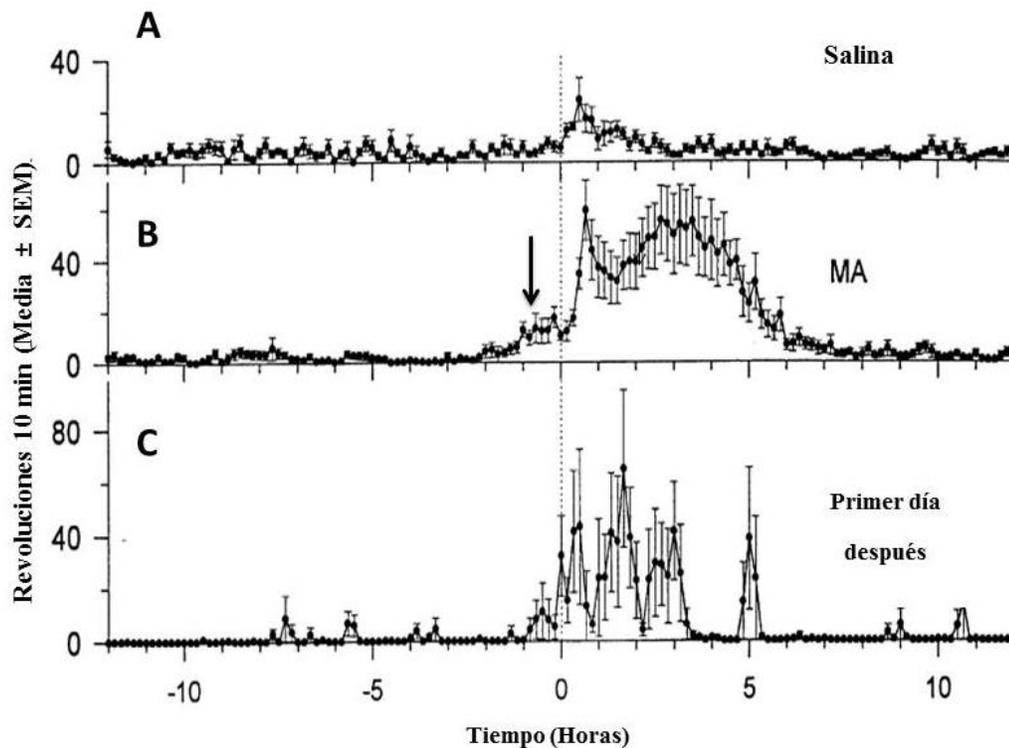
El alimento ha sido uno de los estímulos principales documentado en el estudio de la anticipación (Fig. 6), por ser considerado, no solo necesario para la supervivencia sino uno de los estímulos externos altamente motivacionales. Algunos estudios han propuesto que la expresión de la anticipación al consumo de alimento se basa en el funcionamiento de un sistema multioscilario (Gooley et al., 2006; Mieda et al., 2006), en el que diversas áreas en el cerebro se encuentran regulando esta respuesta.



**Figura 6. Actividad anticipatoria al alimento.**

*Actograma de actividad representativo de una rata bajo condiciones de luz constante, inicialmente alimentada ad libitum y después con acceso restringido al alimento. Los primeros 15 días los sujetos se encontraron bajo condiciones de luz constante, mostrando un corrimiento en su actividad (rectángulo azul). Después de este periodo, los sujetos fueron sometidos a horarios fijos de alimentación (cuadrado rojo) con duración de 3 h (barras verticales blancas). En este período los sujetos exhiben diariamente actividad anticipatoria al horario de alimentación (tomado de Mistlberger y Rusak, 1993).*

Del mismo modo, se ha propuesto que las drogas de abuso, aunque no son un estímulo involucrado en la supervivencia, tienen efecto sobre el sistema límbico al actuar como un reforzador positivo, lo que las hace estímulos altamente recompensantes (Di Chiara e Imperato, 1988). Por lo que bajo algunos protocolos en modelos animales se ha identificado la expresión de la conducta anticipatoria (Kosobud et al., 2007) tras el consumo de algunas de las drogas de abuso, como la metanfetamina (Fig. 7) (Shibata et al., 1994; Kosobud et al., 1998; Keith et al., 2013), la cocaína (White et al., 2000) y la nicotina (Gillman et al., 2008). Al igual que la anticipación al alimento, los sustratos neurales de los que depende la conducta de anticipación a drogas son desconocidos, pero se sugiere que el sistema límbico podría estar relacionado (Koob y Volkow, 2010).



**Figura 7. Actividad anticipatoria a metanfetamina.**

Las gráficas muestran el número de revoluciones de la rueda de actividad de ocho ratas, antes y después de la inyección de metanfetamina (tiempo 0). En A se muestra la actividad de los animales que recibieron inyección de solución salina; no se presenta un cambio importante en la intensidad de la actividad previo a la inyección. Por el contrario, en B se observa un aumento de la actividad locomotriz aproximadamente 2 h previas a la administración de metanfetamina. Esta actividad se mantiene elevada hasta 5 h posterior a su administración. En C se muestra el fenómeno de persistencia, el cual se refiere al aumento de la actividad anticipatoria en ausencia de la inyección de metanfetamina. Los animales exhiben un aumento moderado de la actividad anticipatoria tan solo una hora previa a la hora de la inyección esperada (tomado de Kosobud et al., 1998).

Este comportamiento anticipatorio circadiano al consumo de drogas ha sido identificado por el aumento en la actividad locomotora aproximadamente 22 horas después de la administración. En modelos animales, usualmente se evalúa el contraste entre el sueño y la

inmovilidad versus comportamientos locomotores y motrices, que incluyen el acicalamiento, la exploración, así como sentarse, comer, beber y reposicionarse (Gilman et al., 2008; Dailey, et al., 2012).

Es posible que este factor rítmico circadiano pueda tener un papel importante en el consumo regular y posterior establecimiento de la adicción a las drogas, sugiriendo que se ha desarrollado un comportamiento predictivo a la llegada de la nueva dosificación (Ijima, et al., 2012). Sin embargo, aunque actualmente la capacidad que tienen las drogas para sincronizar a los sujetos ha cobrado relevancia, a la fecha son pocos los estudios relacionados con la anticipación de las drogas de abuso (Honma y Honma et al., 1987; Kosobud et al., 2007; Juárez-Portilla et al., 2018). Es por ello que en este trabajo se buscó poner a prueba la capacidad de una de las drogas de abuso principalmente consumida en el mundo, la nicotina, bajo un protocolo de administración en horario fijo circadiano, sobre la expresión de un estado de alerta anticipado.

### **III. HIPÓTESIS.**

La administración de nicotina en horario fijo regular incrementa la actividad motriz de manera predictiva y anticipada.

### **IV. OBJETIVOS.**

#### **General**

Determinar el efecto de la administración de nicotina sobre la actividad anticipatoria en rata y ratón.

#### **Específicos**

1. Conocer el horario de la expresión de la actividad anticipatoria en rata mediante un sistema de registro circadiano automatizado.
2. Evaluar la conducta de actividad anticipatoria a la nicotina en un modelo de ratón mediante registro manual de conductas de alerta.

3. Observar las áreas cerebrales que se activan durante el intervalo de expresión de la conducta de anticipación a la nicotina.

## **V. MATERIALES Y MÉTODO**

### **5.1. Animales y alojamiento**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 300 g aproximadamente al inicio del experimento y ratones macho de la cepa C57BL/6 de 5 semanas de edad, con peso aproximado de 20g al inicio del experimento, alojados bajo condiciones de luz/oscuridad 12/12 h (encendido de la luz a las 07:00 h) con las luces encendidas definidas como el tiempo zeitgeber 0 (ZT0) y las luces apagadas como ZT12. Los animales fueron criados y mantenidos a una temperatura ambiental de 23°C, con agua y alimento *ad libitum* en el laboratorio de Medicina Traslacional de la Universidad Veracruzana, en Xalapa, Veracruz, México y en Neuro. Dos semanas previas al experimento, los sujetos estuvieron en etapa de acondicionamiento a las condiciones ambientales, alojados individualmente en cajas (32 × 14 × 13 cm) hechas de policarbonato transparente, provistas de pulpa de celulosa. Todos los procedimientos utilizados se realizaron bajo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

### **5.2. Preparación de la droga**

El tartrato de nicotina (N5260-25G, Sigma-Aldrich Corp) se disolvió en agua a una concentración 2.5 mg/mL (concentración obtenida previamente por una curva dosis respuesta; datos no mostrados) y se nebulizó a los animales experimentales. Los animales control fueron nebulizados con una solución libre de nicotina (agua destilada). Se administró un volumen de 4 mL de la solución correspondiente a cada grupo.

### **5.3. Sistema de nebulización**

Las nebulizaciones se llevaron a cabo en cajas de policarbonato (37 x 53 x 19 cm), cada una se encuentra dividida en seis compartimentos triangulares (37 x 25 x 19 cm). En el centro de la caja se encuentra un tubo de policloruro de vinilo de una pulgada de diámetro x 25 cm de altura, de manera que una parte del tubo sobresale de la superficie de la caja. El tubo tiene cuatro

orificios de aproximadamente 3 mm de diámetro posicionados verticalmente y separados equitativamente en el largo del tubo, para que el vapor se distribuya por igual en todos los compartimentos. En cada procedimiento la caja fue cerrada con una tapa de plástico removible, con un orificio en el centro para la salida del tubo principal. El extremo del tubo principal fue conectado durante cada nebulización a un nebulizador de compresor (OMROM NE-C801KD), que coinciden en diámetro, y fue sellado con papel parafina durante cada procedimiento para impedir el escape del vapor.



**Figura 8. Aparato experimental:**

*Caja de nebulización. 1) Nebulizador de compresor (OMROM NE-C801KD), 2) caja de nebulización, compartimentos de acrílico individuales, 3) manguera del suministro de vapor y contenedor de nicotina, 4) tubo principal y orificios dosificadores.*

#### **5.4. Grupos experimentales**

Los animales se separaron en dos grupos para la identificación de la conducta anticipatoria, el grupo nicotina y el grupo control. Se siguieron dos protocolos para la identificación de la actividad anticipatoria locomotora, mediante un método automatizado de

registro circadiano automatizado (n=4) para el modelo en rata, y método manual de identificación de un estado de alerta (n=8) para el modelo en ratón.

### **5.5. Protocolo para administración por nebulización**

Los sujetos fueron asignados al azar en cada uno de los dos grupos, ya fuera para la administración de la droga o la solución control, para la evaluación conductual utilizando ambos métodos. Cada sujeto fue trasladado desde la caja hospedera hasta la caja de administración. Los sujetos fueron nebulizados a las 11:00 h durante 20 min y al finalizar, fueron regresados a las cajas de alojamiento hasta el día siguiente. Se siguió este procedimiento durante 14 días, en el mismo horario, los sujetos fueron rotados aleatoriamente dentro de los espacios dentro del aparato experimental para disminuir el posible sesgo por la existencia de diferencia en el espacio de nebulización por el diseño del aparato experimental.

### **5.6. Análisis conductual de locomoción por registro circadiano automatizado**

La actividad locomotora se evaluó mediante un sistema de registro de actividad locomotora (SPAD 10), el cual obtiene los registros a través de un sensor localizado en la parte superior en cada una de las cajas hospederas. El sensor se basa en captar las emisiones de calor que son detectadas en longitud de onda infrarrojo, por lo que el desplazamiento del animal genera una señal. Dicha información fue almacenada y enviada cada 15 min a una base de datos en una computadora, así, la actividad fue monitoreada durante las 24 horas de los 14 días de experimentación.

### **5.7. Análisis conductual por método manual**

Los sujetos fueron videograbados durante los 14 días de experimentación, posteriormente para la identificación de la conducta de anticipación se analizó manualmente mediante el conteo del tiempo en que se presentaron conductas de alerta (locomoción, acicalamiento, reposicionamiento, exploración y consumo de comida y agua) vs el tiempo de sueño e inmovilidad, a partir de la hora previa a la nebulización.

## **5.8. Actividad en estructuras cerebrales durante la anticipación**

Adicionalmente a la identificación de la actividad anticipatoria se propuso explorar qué áreas cerebrales presentaban un incremento en la actividad neuronal durante el despliegue de la anticipación. Por lo que se realizó la identificación de la actividad neuronal, mediante mediciones directas por medio de los cambios secundarios que se producen en las neuronas después de la despolarización (Gómez, 2017). La detección de la proteína Fos es uno de los métodos utilizados con frecuencia para estudiar los efectos de factores exógenos sobre la transcripción de genes en general; y sobre la actividad del SNC, basado en que se ha demostrado que la excitación neuronal induce inmunorreactividad de tipo Fos dentro de los núcleos de las neuronas (Santos et al., 2017; Iha et al., 2017) Por lo que la expresión de esta proteína funciona como un marcador para la actividad neuronal a nivel de células individuales, utilizada como una herramienta para trazar las vías neuronales involucrados en diferentes respuestas fisiológicas (Naranjo y Gomez, 2009; Pla Ferrer, 2010).

Para un animal representativo del grupo control y nicotina en el modelo de ratón fueron seleccionados y anestesiados con isoflurano (0.5%) a los 90-120 min posteriores al inicio de la actividad anticipatoria identificada (de acuerdo al pico de expresión de la proteína Fos), perfundidos transcardialmente con solución salina (0.9%), seguido de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB, pH 7.4). Inmediatamente después, los cerebros fueron crioprottegidos sucesivamente en 10, 20 y 30% de sacarosa en PB, y cortados coronalmente a un grosor de 50  $\mu\text{m}$  en un criostato (Microm, Alemania) a  $-23^{\circ}\text{C}$  desde la corteza prefrontal hasta el mesencéfalo.

Para el marcaje de la proteína Fos, se siguió la técnica de inmunohistoquímica. Se seleccionó un set representativo del cerebro completo, el tejido se lavó 5 veces con PB 0.1 M durante 10 min cada uno, y después se expuso durante 10 min en una solución de peróxido de hidrógeno al 0.5% para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena. Las secciones se incubaron en anticuerpo primario anti-Fos hecho en borrego (NOVUS 2H2) diluido a 1:1000, en suero normal de caballo al 3% en Triton X-100 (Sigma, St. Louis MO, EE.UU.) al 0,3%, durante 72 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, el tejido se incubó en anticuerpo secundario biotinilado, anti-cabra hecho en caballo diluido a 1:200 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.) en

PBT al 0.3% durante 1 h a temperatura ambiente y luego en el complejo avidina-biotina diluido a 1:200 (Vector Laboratories) en PB 0.1M a temperatura ambiente. Entre cada incubación, el tejido se lavó con PB 0.1M cuatro veces durante 10 min cada uno. Por último, el tejido fue revelado con una solución de 0.05% de diaminobencidina (DAB, Polysciences, Warrington, PA, EE.UU.) en presencia de sulfato de níquel (10 mg / ml, Fisher Scientific) y cloruro de cobalto (Fisher Scientific, NJ, EE.UU.) y 0.01% de peróxido de hidrógeno para obtener un precipitado negro-morado. Después de 10 min, el tejido fue transferido a PB 0.1 M con el fin de detener la reacción. Las secciones se montaron sobre portaobjetos gelatinizados, posteriormente fueron deshidratados y cubiertos con Permount (Caba et al., 2008). Las estructuras seleccionadas se examinaron en un microscopio óptico (BX Olympus) bajo el objetivo 10x. Las imágenes de las secciones fueron capturadas con una cámara Cool Snap Pro digital.

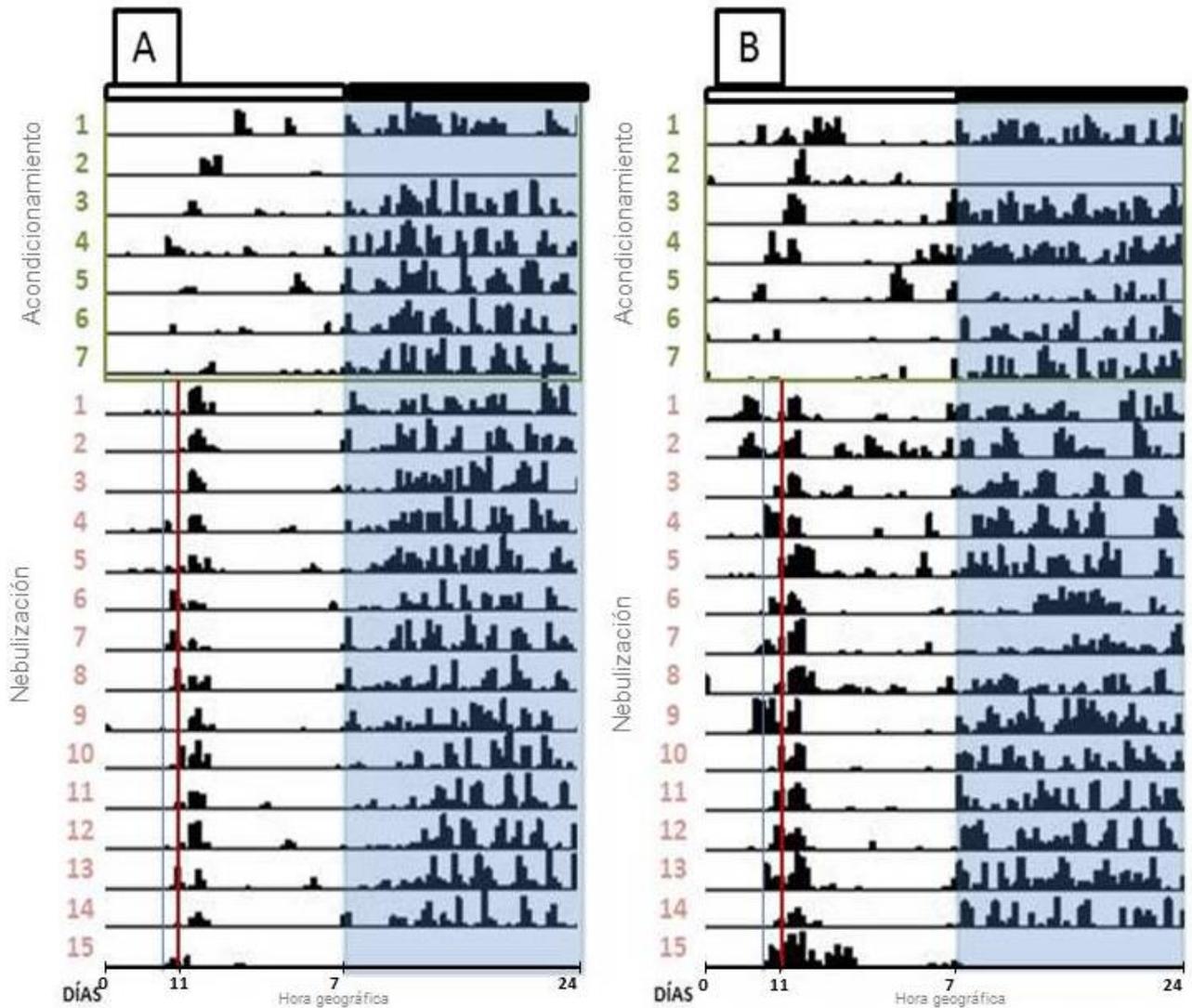
## **5.9. Análisis estadístico**

Para el análisis conductual por registro automatizado los números de movimiento en cada intervalo entre los dos grupos se compararon mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía para medidas repetidas seguido de la prueba post hoc de Tukey. Para la identificación manual de la conducta de anticipación se comparó el tiempo de actividad del primer y último día mediante una ANOVA de una vía. Se consideraron diferencias entre los grupos cuando la significancia fue  $p < 0.05$ , utilizando el programa estadístico Statistica 7.0 stat soft, Inc. 1984-2004.

# **VI. RESULTADOS**

## **6.1. Identificación de la actividad anticipatoria por método de registro circadiano**

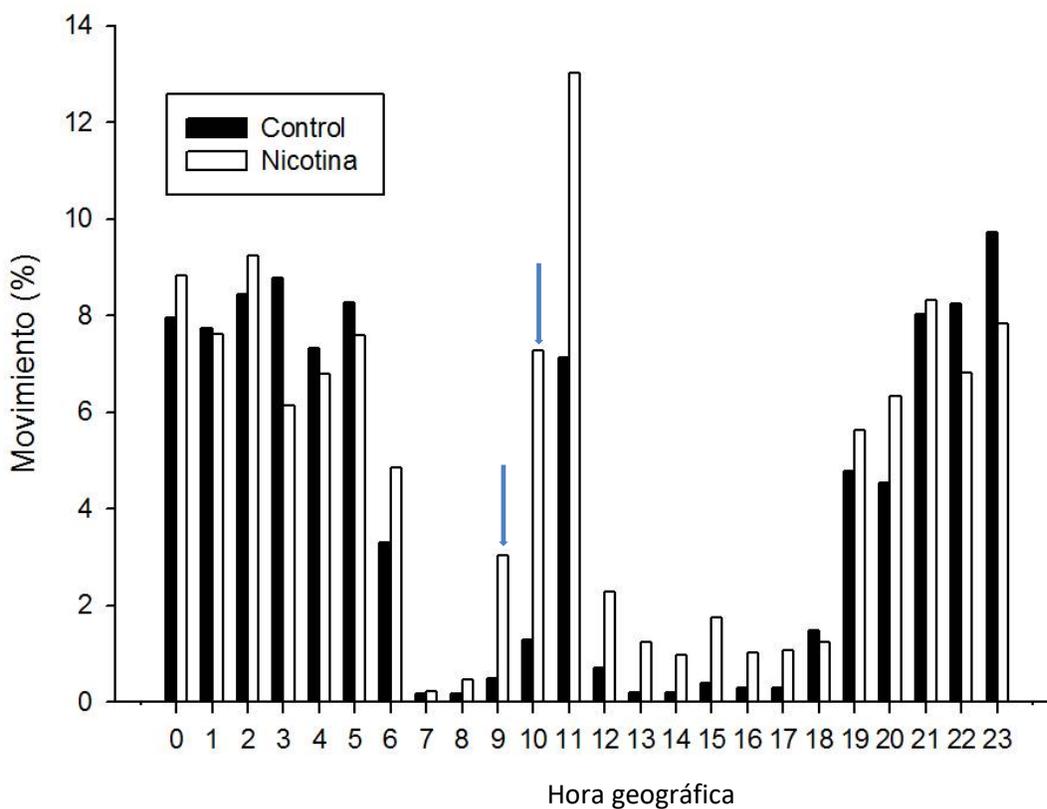
Los datos recabados por el sistema automatizado permitieron obtener actogramas de actividad locomotora que nos muestran el comportamiento de los sujetos durante el tiempo de experimentación, lo que permitió hacer, inicialmente, un análisis cualitativo de los resultados. Al observar los actogramas se identificó la presencia de una mayor actividad a partir de una hora previa a la nebulización (10:00 h; Fig. 9) en los sujetos que recibieron vapores de nicotina con respecto al grupo control.



**Figura 9. Análisis cualitativo de la actividad locomotora de un sujeto representativo de cada grupo.**

Actograma de actividad locomotora de un sujeto representativo de cada grupo: control, nebulizado con agua (A), y experimental, nebulizado con solución de nicotina 2.5 mg/ml (B). Las barras horizontales en blanco y negro en la parte superior del actograma representan el ciclo luz-oscuridad (07:00 h, encendido de la luz). El rectángulo sombreado en azul indica el periodo de oscuridad. La barra vertical roja indica el periodo de nebulización (20 min). La línea azul indica el inicio de la actividad anticipatoria aproximadamente una hora antes de la administración.

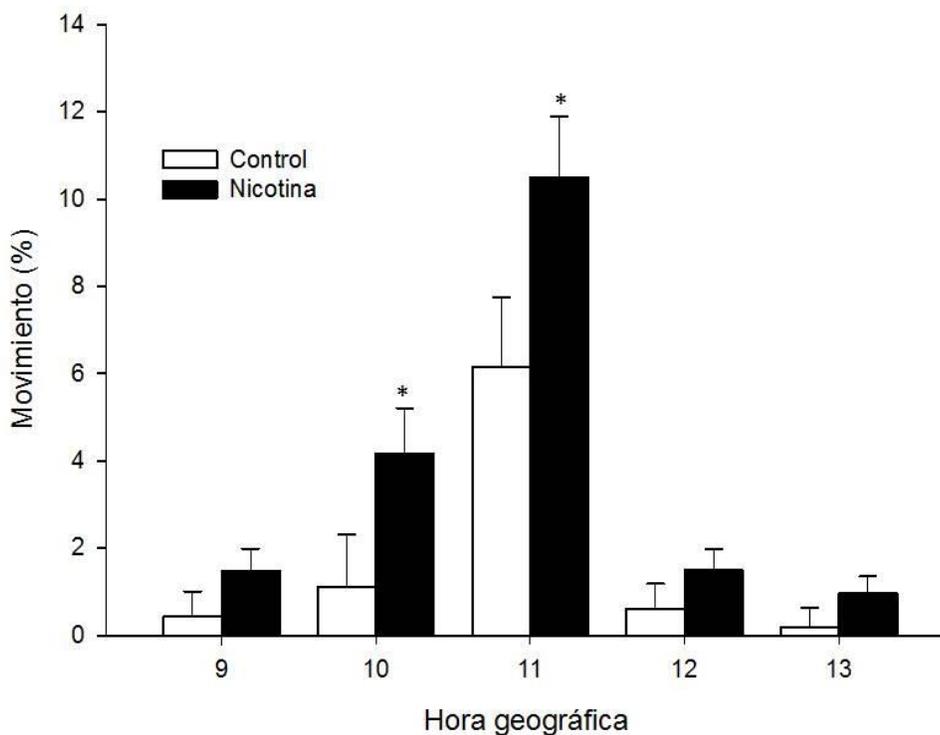
Para poder distinguir la conducta de forma cuantitativa se realizó un análisis de la conducta diaria exhibida por ambos grupos experimentales, donde se logró observar el comportamiento de su conducta locomotora dividida en las 24 horas del día (Fig. 10). Se denota la diferencia en la expresión de conducta locomotora a en horario previo a la administración de nicotina (11:00 h).



**Figura 10. Conducta diaria locomotora grupal.**

La conducta se expresa en el porcentaje de movimientos registrados por cada hora respecto al número total de movimientos. Note que desde las 09:00 h, empieza a observarse un incremento en la actividad locomotora (flechas azules).

Para identificar el horario donde se presentaba la actividad anticipatoria, se seleccionó un intervalo de tiempo dos horas antes y dos horas después de la administración, con base en la gráfica del comportamiento diario (Fig. 11), para poder observar con mayor precisión las diferencias en el intervalo horario de interés sin la influencia de las demás horas del día. El análisis indicó que existe una diferencia significativa en el horario de 10:00 h entre el grupo nicotina y el grupo control, esto nos permite conocer que la actividad anticipatoria se está presentando una hora antes de la llegada del estímulo. Además de que también existe una diferencia durante la hora de administración; esto nos indica que la nicotina está llegando a su sitio blanco mostrando las características conductuales de ser una droga estimulante.



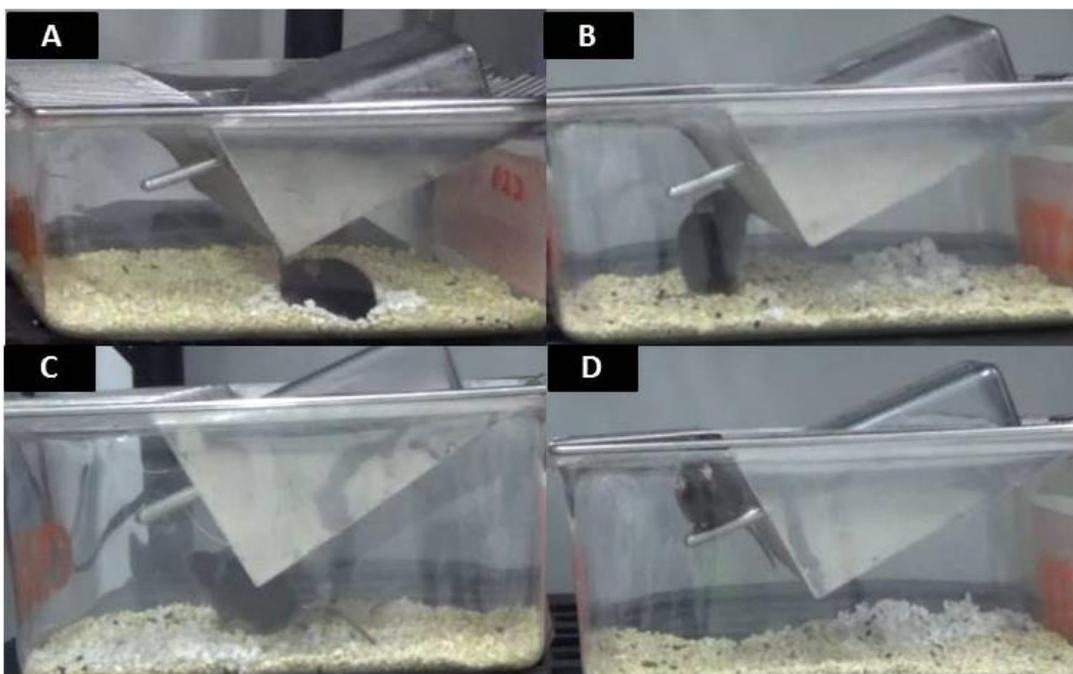
**Figura 11. Actividad anticipatoria a nicotina en rata.**

*Análisis de la conducta locomotora de ambos grupos experimentales, el modelo corresponde a un diseño unifactorial con dos niveles con medidas repetidas, el factor tratamiento incluye el grupo control y el grupo experimental nebulizados con nicotina, que fueron administrados en el tiempo, en el cual, la variable de respuesta “conducta locomotora” se expresa como el*

*promedio de número de movimientos donde el 100% corresponde al total de movimientos expresados en el grupo control y el grupo nicotina en un intervalo de 5 horas ( $p=0.0326$  para la diferencia entre horarios), los horarios 10:00 y 11:00 horas señalados con asteriscos muestran diferencias significativas respecto al grupo control.*

## **6.2. Identificación de la actividad anticipatoria por método de registro manual**

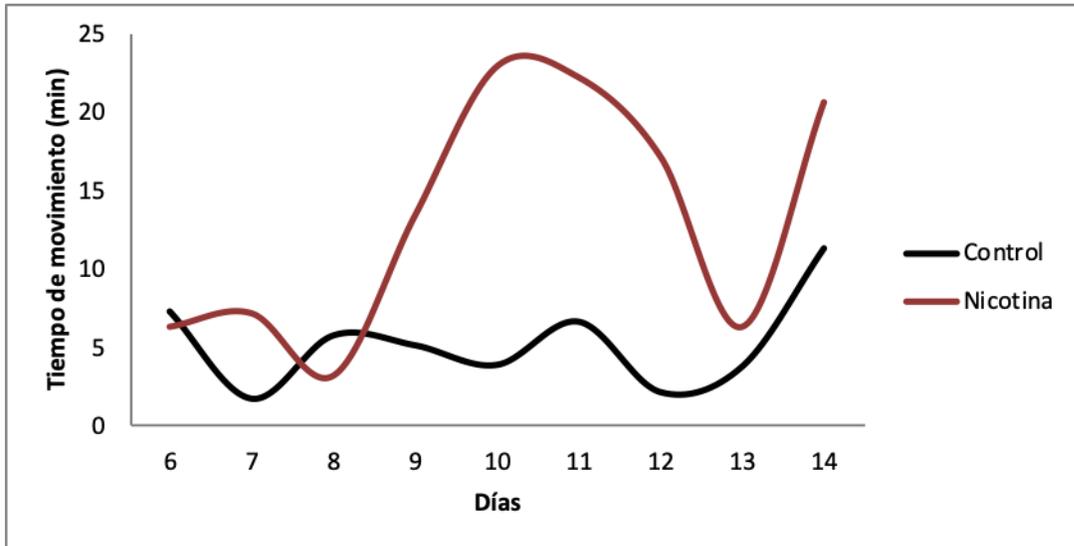
Para el registro manual se seleccionaron las conductas de alerta que fueron contempladas dentro del tiempo de movimiento, de acuerdo con protocolos anteriores (Dailey et al., 2012) se contemplaron conductas tales como locomoción, exploración, acicalamiento, consumo de agua y alimento versus la inmovilidad (Fig.12). Debido a que el registro se da en la etapa de descanso de los sujetos, el aumento de estas conductas indica un estado de alerta antepuesto al descanso.



**Figura 12. Fotografías de algunas de las conductas contempladas en el estado de alerta.** (A) Sujeto grupo control en conducta de descanso. (B, C y D) Sujeto grupo nicotina expresando conductas de alimentación, locomoción y exploración respectivamente.

De acuerdo a los resultados anteriores, en el modelo de ratón se registró el tiempo de movimiento de ambos grupos una hora antes de la administración, para poder conocer la evolución en la expresión de la conducta de anticipación se seleccionaron los últimos diez días

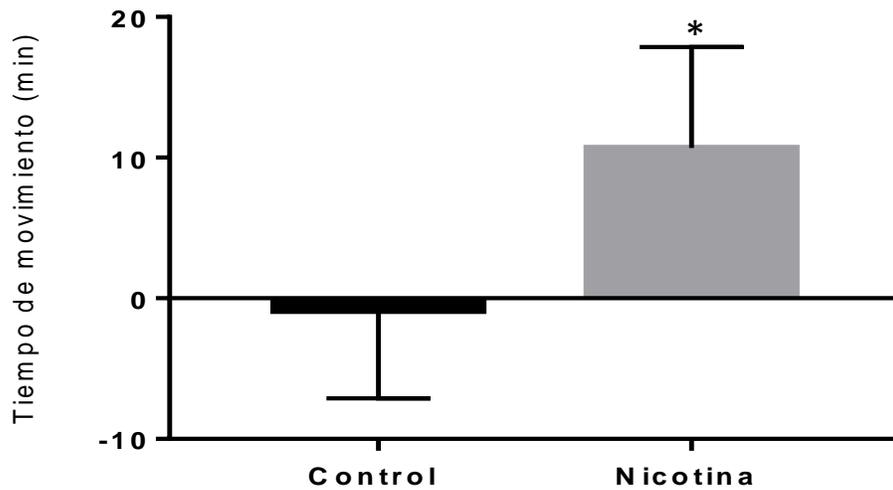
de administración y se realizó un perfil de actividad de cada grupo (Fig. 13). Lo anterior nos permitió notar el cambio en el tiempo, donde se ve una tendencia al aumento alrededor del día 7 en los sujetos que fueron administrados con nicotina.



**Figura 13. Perfil de actividad durante una hora previa de cada grupo.**

*Representación del promedio de tiempo en movimiento una hora antes de la administración de la nicotina.*

Para poder identificar la presencia de la conducta de anticipación se realizó un análisis por ANOVA de una vía de la tasa neta de cambio de cada grupo en el día 1, que corresponde al estado normal previo al inicio del protocolo de administraciones y el día 15 en la hora previa a la administración, que fue el último de administración (fig. 14). Esto nos permitió observar diferencias significativas, evidenciando un aumento en el tiempo de movimiento en los sujetos administrados con nicotina con respecto al grupo control, lo cual evidencia la expresión de un estado de alerta.



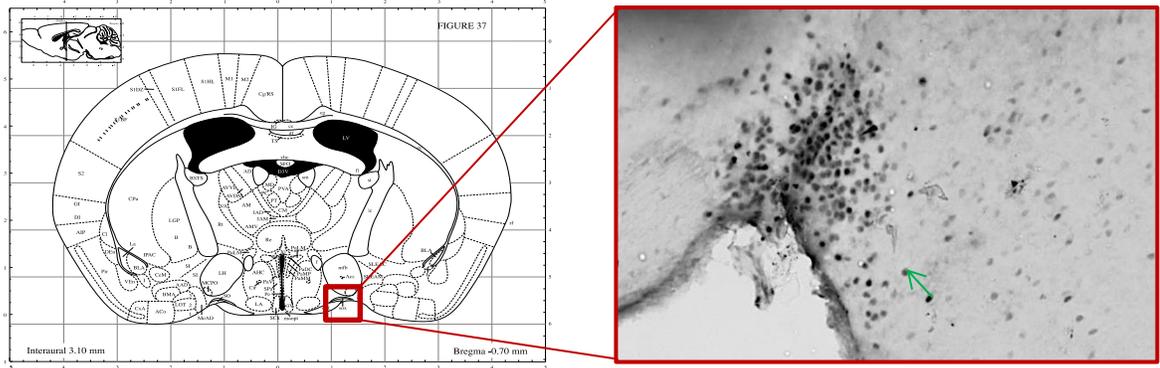
**Figura 14. Tasa neta de cambio en la conducta.**

*Se expresa en análisis de la tasa neta de cambio entre el día 1 y el día 15 en cada grupo, en un modelo de una ANOVA de una vía con distribución Poisson y arreglo de sobre dispersión con Device. Se muestra una diferencia significativa del grupo administrado con nicotina respecto al control indicado con el asterisco.*

### **6.3. Marcaje de Fos por inmunohistoquímica**

Posterior a la identificación de la conducta de anticipación en ambos modelos, se realizó el marcaje de la proteína Fos para la identificación de las estructuras que presentaran actividad durante la etapa de anticipación.

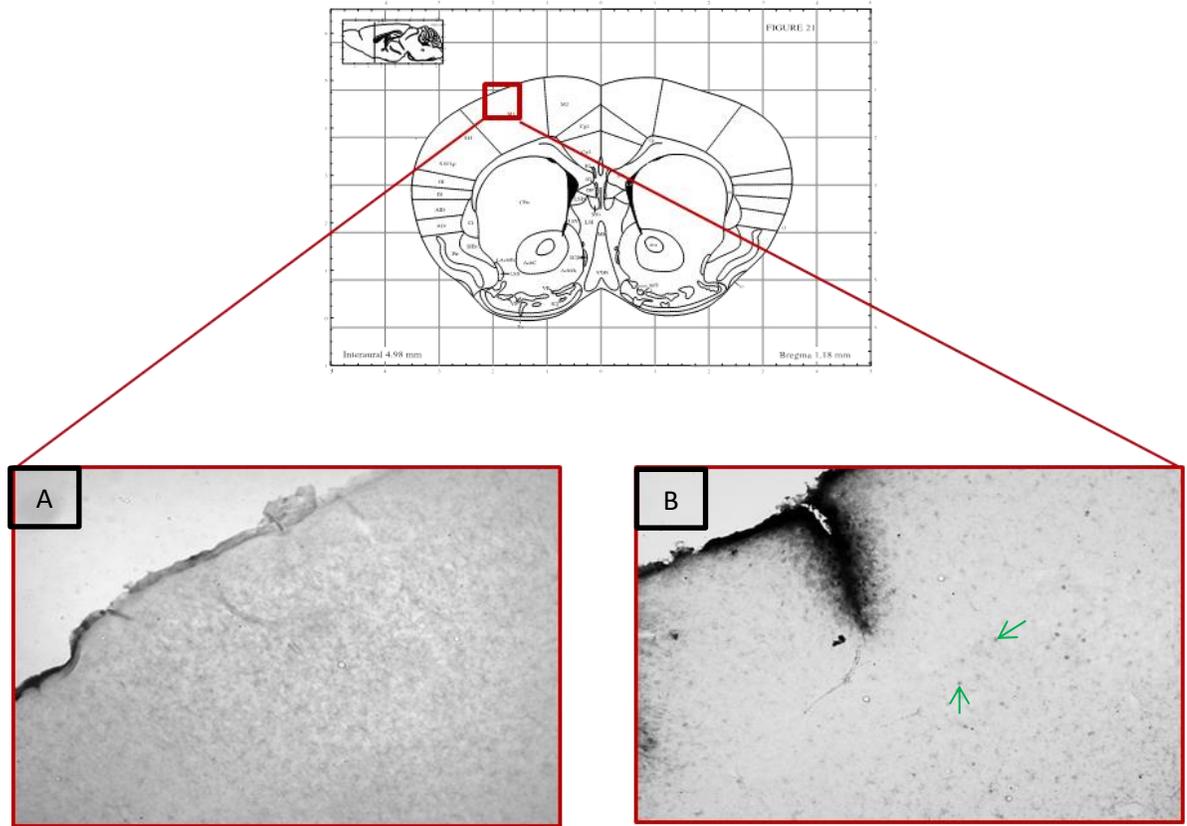
Inicialmente se seleccionó un sujeto para ser administrado con solución hipertónica y evaluar la funcionalidad de la técnica y reactivo. Para ratón (Fig. 15) y rata (Fig. 17) se identificó el marcaje en la zona correspondiente al núcleo supraóptico del hipotálamo.



***Figura 15. Marcaje de células inmunorreactivas a Fos en ratón.***

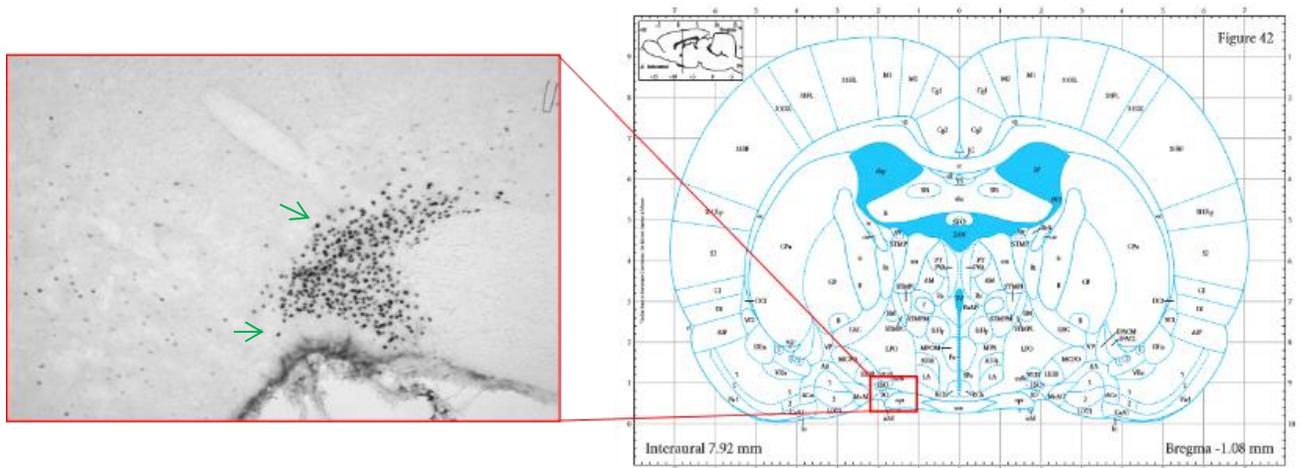
*Área seleccionada correspondiente al núcleo supraóptico del hipotálamo en sujeto administrado con solución hipertónica. El marcaje se ejemplifica en las células señaladas con las flechas negras.*

Para el modelo de ratón se observó la presencia de células marcadas con la proteína Fos en el área de la corteza motora, específicamente en el área M1, durante la etapa de anticipación a la administración de nicotina.



**Figura 16. Marcaje de células inmunorreactivas a Fos en ratón.**

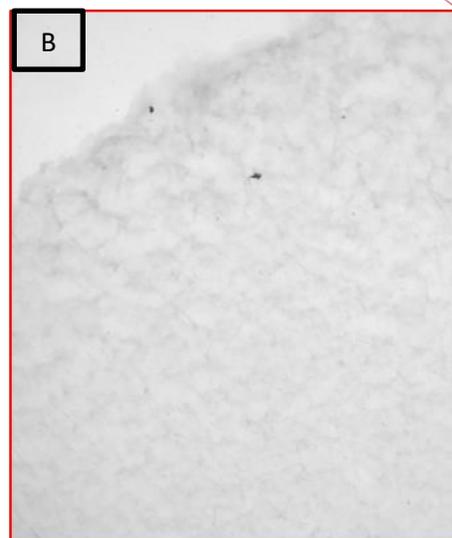
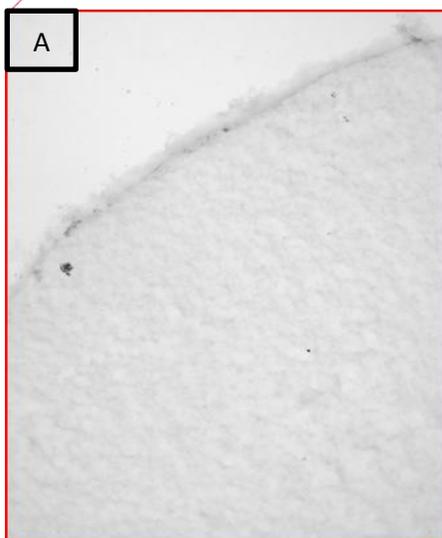
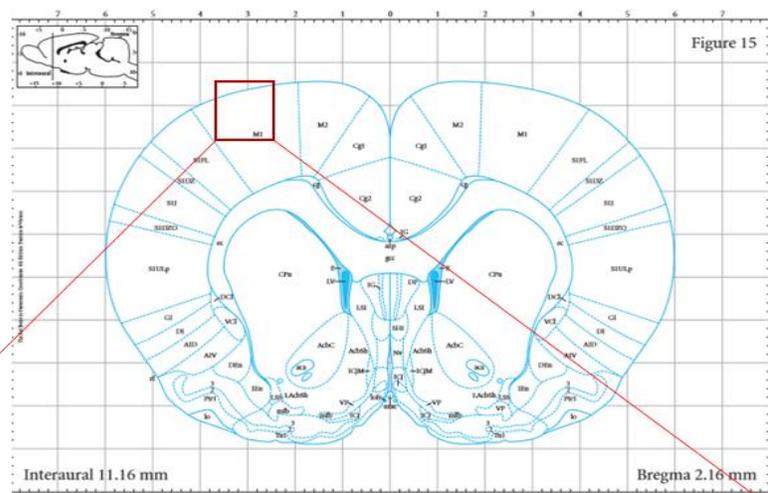
Área seleccionada correspondiente a corteza motora M1 en sujeto control (A) y administrado con nicotina (B). El marcaje se ejemplifica en las células señaladas con las flechas negras.



**Figura 17. Marcaje de células inmunorreactivas a Fos en rata.**

*Área seleccionada correspondiente al núcleo supraóptico del hipotálamo (Paxinos y Watson, 2007) en sujeto administrado con solución hipertónica. El marcaje se ejemplifica en las células señaladas con las flechas negras.*

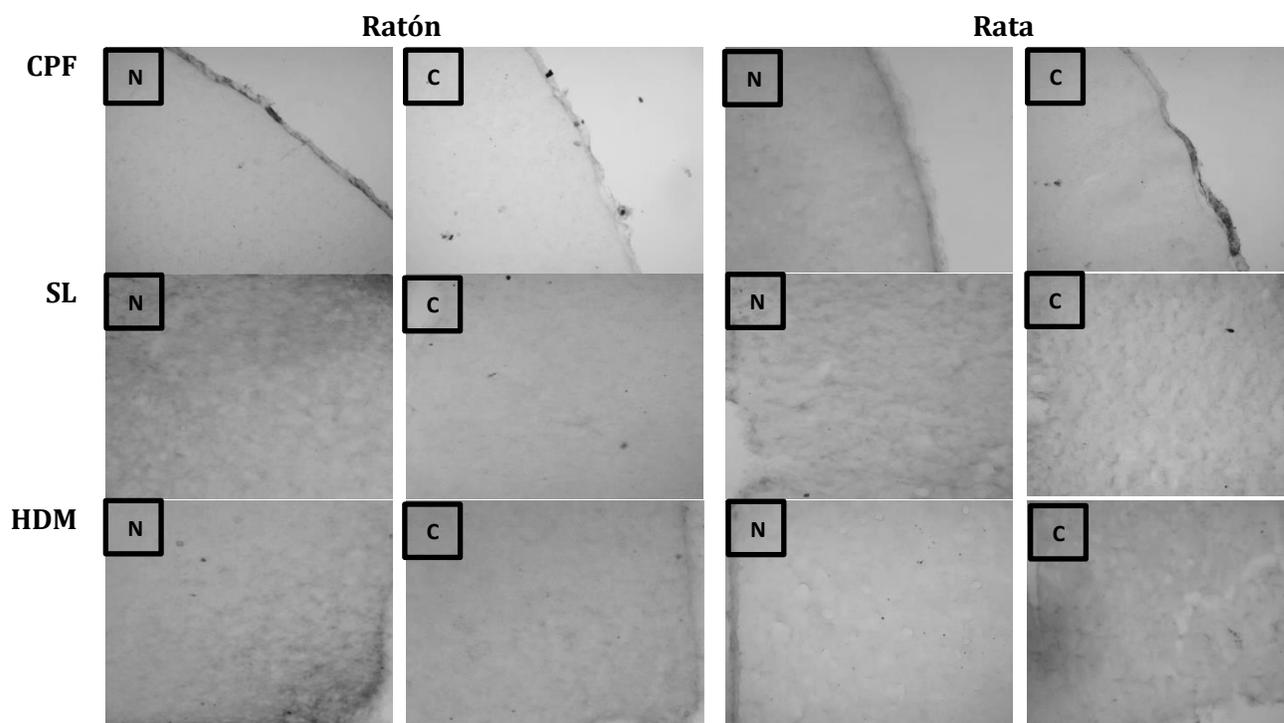
De acuerdo a los resultados observados en ratón se buscó marcaje en la corteza motora en rata (Fig. 18), sin embargo no se observaron células inmunorreactivas a Fos.



**Figura 18. Área correspondiente a la corteza motora (M1) en rata.**

Área seleccionada correspondiente a corteza motora M1 en sujeto control (A) y administrado con nicotina (B) (Paxinos y Watson, 2007).

Con base en reportes anteriores donde se evidenció la participación de estructuras, como el septum lateral, el núcleo dorsomedial del hipotálamo y el estructuras corticales como la corteza prefrontal (Juárez-Portilla, 2018), en ambos modelos se exploró la actividad neuronal, sin embargo tal como se aprecia en el panel siguiente (Fig. 19) en ninguno logramos observar marcaje correspondiente a Fos.



*Figura 19. Panel de imágenes correspondientes a la corteza prefrontal (CPF), septum lateral (SL) y núcleo dorsomedial del hipotálamo (HDM) en ratón y rata, del grupo administrado con nicotina (N) y el grupo control administrado con solución libre de nicotina (C).*

## VII. DISCUSIÓN

La capacidad de predecir la llegada de un estímulo es una conducta necesaria y desarrollada como estrategia adaptativa (Qian y Scheer, 2016, Roenneberg y Merrow, 2005; Juárez-Portilla et al., 2018). Los resultados obtenidos en el presente trabajo aportan hallazgos importantes acerca de la capacidad de drogas, como la nicotina, de funcionar como sincronizadores y modificar la conducta de los sujetos en etapas tempranas del consumo. Mediante dos modelos se identificó la presencia de la conducta de anticipación, la cual puede estar funcionando como un modulador importante de conductas de búsqueda, homólogas a las conductas reportadas en

humanos. Además, se buscó identificar las áreas cerebrales que pudieran participar en la expresión de la conducta anticipatoria a esta droga.

En términos generales, el significado biológico de la anticipación es permitirle al sujeto estar preparado para la llegada de estímulos y así contribuir al aprovechamiento de los mismos (Webb et al., 2009). El alimento es uno de los principales estímulos capaces de desencadenar una conducta anticipatoria. En el laboratorio se han desarrollado protocolos de acceso restringido al alimento, en los cuales los roedores cuentan con un breve periodo de tiempo, alrededor de 3 h, para alimentarse diariamente durante su fase de descanso, después de tres semanas, los sujetos muestran una anticipación conductual y fisiológica ante el acceso a la comida (Mitra et al., 2011). Lo anterior muestra la capacidad de los sincronizadores de ajustar el reloj circadiano para adaptarse a las fluctuaciones ambientales, como método de supervivencia (Gavrila et al., 2017).

Si bien las drogas no son un estímulo necesario para la supervivencia, actualmente se ha denotado cómo algunas drogas, tal como en los alimentos, pueden funcionar como potentes sincronizadoras que ajustan y modifican ciertos procesos y mecanismos circadianos, cuando son consumidas en horarios regulares, dentro del rango circadiano (Keith et al., 2013; Shappell et al., 1996). Los resultados en este trabajo aportan evidencia sobre la capacidad de la nicotina para modificar la conducta de los sujetos tras la administración regular diaria.

Inicialmente en el modelo de registro circadiano, el análisis por actogramas de actividad locomotora, que se obtuvo del monitoreo diario, permitió observar cualitativamente la presencia de un aumento en la actividad de los sujetos en el horario previo a la administración de nicotina, evidenciado esta conducta, no solo al compararlo con el sujeto control, sino también individualmente contra la etapa de acondicionamiento donde se aprecia definida la etapa de actividad y descanso, que posteriormente se modifica con la presencia de la anticipación. Anteriormente la actividad anticipatoria a la nicotina había sido reportada, sin embargo, el protocolo se desarrolló en un ambiente de luz constante, por lo que al administrar la nicotina los sujetos se sincronizaban a su llegada, pero al ser el único estímulo al que estaban expuestos, era difícil apreciar la capacidad de la droga de funcionar como sincronizador (Gilmat et al.,

2008). Por el contrario, en este trabajo se sincronizó inicialmente al periodo de luz/oscuridad para después presentar otro estímulo circadiano, que fue la administración regular de la droga. La presencia de la actividad anticipatoria nos indica que la nicotina es un estímulo altamente recompensante, ya que compite contra la sincronización fónica y modifica la fase de descanso de los sujetos, motivados a estar despiertos.

Posteriormente, el análisis de la conducta locomotora, en el intervalo de horario, mostró que la actividad anticipatoria se presenta una hora antes de la administración, a diferencia de otras drogas como la metanfetamina o al alimento en la cual se ha reportado el intervalo de anticipación más amplio de hasta dos horas (Mistlberger y Rusak, 1993; Honma y Honma, 2009). Esto nos indica que se pueden presentar variaciones en la expresión de la conducta dependiendo del estímulo.

Por otro lado, el aumento de la actividad posterior a la administración que se observa tanto en los actogramas de actividad como el análisis por horario, de los animales con nicotina administrada por nebulización, respecto a aquellos que recibieron nebulización de agua destilada, nos indica que la nicotina nebulizada está aportando el estímulo necesario para desencadenar este efecto estimulante característico de la droga, que ha sido reportado también por otras vías de administración (Jiménez et al., 2004; Gilman et al., 2008; Huerta y Cruz, 2011).

Al incluir otro modelo en ratón permitió considerar otras variables conductuales y, así, obtener más información sobre el desarrollo de la anticipación durante todo el experimento. Primeramente, la obtención del perfil de actividad grupal por día permitió ver que si bien la actividad anticipatoria no es una respuesta inmediata, se expresa pocos días después del inicio del consumo. Protocolos en los cuales los sujetos se auto-administran durante 10 días una cantidad constante de droga a la que tienen libre acceso (Engelmann et al., 2014; Smith y Pitts, 2001) definen esta etapa inicial de consumo como adquisición, misma que concluye con el comienzo de la etapa de escalamiento, en el que los sujetos aumentan la dosis de droga consumida (Engelmann et al., 2014).

La etapa de adquisición que refiere al periodo regular de administración de drogas. En modelos animales, esta etapa es análoga a la etapa de intoxicación en el proceso de adicción en humanos (OMS, 2011), ya que representa los primeros eventos de consumo de la droga. Incluso, se ha reportado que durante este periodo se presentan algunas conductas relacionadas con el desarrollo de la conducta de anticipación, tal como el incremento en el deseo por la ingestión de la droga (craving) (Sinha, 2001; Robinson y Berridge, 2008) y el comportamiento motivado, que implica un esfuerzo para la obtención de la droga (Pereira, 2008).

La idea de que existe una relación entre la disponibilidad de la droga y su influencia en el deseo por la misma ya ha sido mencionada, donde se aborda que la predicción a la llegada de la droga es un factor recompensante que se suma a la recompensa farmacológica de la droga (Sayette y Dimoff, 2016). Es decir, que la disponibilidad de la recompensa aumenta la expresión del deseo por la misma y esto en humanos ocurre cuando se asocian señales ambientales al consumo de droga, lo cual participa negativamente cuando se quiere abandonar el consumo (Wertz, y Sayette, 2001). Por lo cual podemos inferir que la conducta de anticipación puede estar participando en el consumo de drogas en humanos como parte del deseo y necesidad de búsqueda, luego de los primeros días de administración.

El análisis del cambio neto de actividad nos permitió observar con mayor claridad el cambio en la conducta de los sujetos, donde se contemplaron conductas de alerta, además de la locomoción, lo cual nos mostró que la anticipación también puede incluir conductas de alerta que no han sido contempladas anteriormente en la anticipación a drogas, pero sí en el alimento (Dailey, et al., 2012).

Como se mencionó anteriormente la presencia de la actividad anticipatoria, se ha estudiado e identificado principalmente a través de conductas, siendo la restricción al alimento el protocolo más abordado para explorar las bases neurobiológicas de la anticipación. Sin embargo, se ha explorado muy poco acerca de las estructuras cerebrales que puedan estar involucradas en la expresión (Koob y Volkow, 2010) y los resultados que se tienen hasta ahora han sido poco concluyentes por lo que se infiere que no se trata de un locus, sino de un sistema

multioscillatorio (Gooley et al., 2006; Mieda et al., 2006), en el que diversas áreas en el cerebro se encuentran regulando esta respuesta.

Este aumento en la conducta ante la disponibilidad de alimentos se ha reportado no solo con alimento regular, sino también con el alimento considerado apetitoso (Escobar et al., 2001, Ángeles Castellano et al., 2007). En lo cual se ha abordado que a pesar de que ambos promueven la motivación a la alimentación, el alimento apetitoso conlleva un valor hedónico agregado. Actualmente se desconocen cuáles son aquellas estructuras que se encuentran regulando la sincronización tanto al alimento regular como apetitoso. Sin embargo, se ha reportado que las estructuras asociadas a la regulación energética y la saciedad están relacionadas con el alimento regular, mientras que las estructuras límbicas se encuentran regulando las respuestas al alimento apetitoso (Luna et al., 2017; Mitra et al., 2011). Por lo que se considera que, en la conducta de anticipación a drogas, al ser dirigida hacia una recompensa placentera más que de supervivencia, pudiera estar regulada partir de estructuras límbicas tal como se ha mostrado en el alimento apetitoso (Ángeles et al., 2007).

En ambos casos, droga (Honma et al., 1987) y alimento (regular y/o apetitoso), los patrones de anticipación circadiana parecen ser independientes del ciclo de luz/oscuridad y de la influencia del NSQ. Por lo que los trabajos que se han realizado relacionan tanto al alimento como a las drogas y los integran como señales de tiempo no fóticas, reguladas por relojes independientes al NSQ (Homma y Homma, 2009). Partiendo del hecho de que se ha observado la sincronización a estos estímulos incluso a pesar de la lesión del NSQ (Marchant y Mistlberger, 1997; Davidson y Stephan, 1999), además de que bajo condiciones de luz constante funcionan como fuertes sincronizadores de la conducta y expresión de genes reloj (Nováková et al., 2011).

Al igual que en la actividad anticipatoria al alimento, los sustratos neurales de los que depende la conducta de anticipación a drogas son desconocidos y aún muy poco estudiados. En este trabajo se buscó observar las estructuras que presentaban una mayor actividad neuronal, que pudiera indicar su participación durante la expresión de la anticipación, mediante el marcaje de la proteína Fos. Sin embargo, en nuestras observaciones no se detectó el marcaje de las

células inmunorreactivas en ninguna estructura, más que en el área motora de la corteza cerebral en ratón. Este resultado se puede interpretar bajo el hecho de que la corteza cerebral es el sitio en el cual el cerebro evalúa la información sensorial y genera una respuesta al elegir una acción, siendo esta un paso crítico en el circuito neuronal que selecciona e inicia hacia las señales relacionadas con la próxima elección hacia actividades de recompensa (Soul et al., 2011). La corteza motora es el área principal que juega un papel en la planificación y ejecución voluntaria de movimientos (Chen et al., 2017).

Sin embargo, nuestras predicciones para observar el marcaje de Fos apuntaban hacia las estructuras límbicas, principalmente en septum lateral, núcleo dorsomedial del hipotálamo y corteza orbifrontal, que se habían reportado anteriormente como activas durante la anticipación a metanfetamina (Juárez-Portilla et al., 2018). Por lo que se infiere que se excluyeron consideraciones importantes dentro del método que repercutieron en los resultados finales. Inicialmente el método de marcaje de Fos es una técnica que ha sido muy utilizada como marcaje en la actividad anticipatoria a drogas y alimento (Robotham et al., 2012, Luna et al., 2017; Juárez-Portilla et al., 2018). Y aunque se considera que la cinética de su expresión es relativamente conocida, en donde este se activa de forma rápida y transitoria, generalmente, con un pico del ARNm de *c-fos* aproximadamente a los 30 min y de su proteína entre 90-120 min (Pla Ferrer, 2010; Perrin et al., 2016; Gómez Gómez, 2017), tal vez el tiempo considerado para el sacrificio, basado en el tiempo de la expresión de la proteína, no se consideró la variabilidad entre estructuras y el desconocimiento del momento real en que se regula el inicio de la actividad anticipatoria a esta droga. Por lo que la modificación de la técnica hacia identificar el ARNm en lugar de la proteína puede ser una posibilidad para buscar obtener un mejor resultado, ya que en algunos trabajos se ha reportado que el corto periodo de expresión entre la actividad y la expresión de este gen temprano ha logrado que la identificación de las estructuras sea más efectiva, realizándose en sacrificio justo en el horario en que se tiene reportada la expresión de la conducta (Poulin et al., 2008; Mitra et al., 2011). Adicionalmente la identificación de genes o proteínas reloj ha sido también una estrategia muy utilizada para rastrear el comportamiento hacia estímulos circadianos tanto en alimento donde la inactivación del gen reloj *Per2* interfiere en la expresión de la conducta de anticipación (Feillet et al., 2011)

y en drogas se ha reportado que el gen reloj *Per 2* tiene una importante participación en la regulación de las respuestas conductuales a cocaína (Abarca et al., 2002) y etanol (Spanagel et al., 2005), y se ha reportado que los efectos de estas drogas, junto con nicotina, varían cuando son administradas a diferentes horas en el día (Baird y Gauvin, 2000; Kita et al., 1986), lo que indica que la expresión de genes reloj en el cerebro y la periferia no sólo es sensible a las señales del NSQ sino que también responde a los cambios en el estado nutricional y motivacional, lo que es una estrategia para estudiar la sincronización y el comportamiento circadiano a otras drogas como la nicotina.

Adicionalmente el uso de otras técnicas como el uso de imágenes de resonancia magnética funcional (fMRI) actualmente ha cobrado mucha utilidad, con sus adaptaciones a modelos animales ha podido rastrear la actividad cerebral en distintas conductas (Ernst et al., 2004; Tsurugizawa et al., 2012).

Sin embargo, aunque nuestros resultados no coinciden con las estructuras que otros protocolos han identificado, este trabajo integra información conductual importante que brinda aportaciones hacia el conocimiento de la posible participación de un sistema circadiano en la conducta de anticipación en drogas como la nicotina, presentando una marcada actividad conductual en ambos modelos y métodos de monitoreo de actividad.

## **VII. CONCLUSIÓN**

El consumo y abuso de drogas, como la nicotina, es un trastorno que involucra distintos factores, pero la posible participación de un factor circadiano es un tema novedoso que no se ha estudiado lo suficiente. Como pudimos observar en este trabajo, la nicotina tiene la capacidad de sincronizar a los sujetos y modificar su conducta anticipando su llegada. Esto nos indica que existe un sistema circadiano que le permite, aun sin señales externas, saber el momento en que la droga será administrada. Además de que involucra más de la conducta de locomoción, el estado de alerta y búsqueda que involucra la conducta de anticipación. Aunque no se conocen las estructuras cerebrales, y nuestros resultados histológicos aportan poca información sobre qué estructuras participan en esta conducta, se piensa que al igual que el alimento se deba a un

sistema multi-oscilatorio donde más de una estructura esté participando. Por lo que se necesitan explorar otras técnicas y estrategias para próximos proyectos que busquen la identificación de las estructuras que funcionan como relojes hacia este estímulo.

## VIII. REFERENCIAS

1. Abarca Carolina, Albrecht Urs, and Spanage Rainer. 2002. Cocaine sensitization and reward are under the influence of circadian genes and rhythm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol.99, n°13, pag. 9026-30.
2. Akinola Lois, Mckiver Bryan, Toma Wisam , Zhu Andy Z. X., Tyndale Rachel F., Kumar Vivek and Damaj M. Imad. 2019. C57BL/6 Substrain Differences in Pharmacological Effects after Acute and Repeated Nicotine Administration. *Brain Sci*, 9(10), 244.
3. Anderson, G. D., & Chan, L.-N. 2016. *Pharmacokinetic Drug Interactions with Tobacco, Cannabinoids and Smoking Cessation Products*. *Clinical Pharmacokinetics*, 55(11), 1353–1368.
4. Andrianarivelo, A., Saint-Jour, E., Walle, R., Trifilieff, P., & Vanhoutte, P. 2018. Modulation and functions of dopamine receptor heteromers in drugs of abuse-induced adaptations. *Neuropharmacology*.
5. Angeles Castellanos M, Mendoza J, Escobar C. 2007. Restricted feeding schedules phase shift daily rhythms of c-Fos and protein Per1 immunoreactivity in corticolimbic regions in rats. *Neuroscience*. Vol 144 n°1, pag. :344-55.
6. Ángeles-Castellanos M., Salgado-Delgad, Rodríguez R. K., Buijs y R.M. Escobar. 2008. Expectancy for food or expectancy for chocolate reveals timing systems for metabolism and reward. *Neuroscience* 15, 297–307.
7. Becker Jill B. 2016. Sex differences in addictio. *Dialogues in Clinical Neuroscience* - Vol 18 . No. 4 . 2016
8. Benowitz NL .1996. Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. 1996. *Annu Rev. de Pharmacology and Toxicology*; Vol. 36, pag.597-613
9. Benowitz, N. L., Hansson, A., & Jacob, P. 2002. *Cardiovascular Effects of Nasal and Transdermal Nicotine and Cigarette Smoking*. *Hypertension*, 39(6), 1107–1112.

10. Benowitz, N. L., Hukkanen, J., & Jacob, P. 2009. Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers. *Nicotine Psychopharmacology*, 29–60.
11. Blancas Velázquez Áurea Susana y Escobar Briones Carolina. 2013. Activación progresiva de áreas cerebrales inducida por la ingestión diaria de una golosina dulce. *Gaceta Médica de México*. 149 :272-9
12. Bonastre Melendez K.Y. 2018. Sincronización por nicotina en un modelo de nebulización forzada en rata. (Tesis de licenciatura). Universidad Veracruzana, Facultad de Química Farmacéutica Biológica.
13. Borrego Soto G. 2015. Análisis Farmacogenético de la Nicotina en Sujetos Jóvenes Fumadores y No Fumadores (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad De Medicina.
14. Boulos Z., Rosenwasser A. M., Terman M. 1980. Feeding schedules and the circadian organization of behavior in the rat. *Physiology & Behavior*. Vol. 1, pag.39-65.
15. Brockett, A. T., Pribut, H. J., Vázquez, D., & Roesch, M. R. 2018. The impact of drugs of abuse on executive function: characterizing long-term changes in neural correlates following chronic drug exposure and withdrawal in rats. *Learning & Memory*, 25(9), 461–473.
16. Bullitt, E. 1990. Expression of C-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 296(4), 517–530
17. Caba M., Tovar A., Silver R., Morgado E., Meza E., Zavaleta Y., Juárez C. 2008. Nature's food anticipatory experiment: entrainment of locomotor behavior, suprachiasmatic and dorsomedial hypothalamic nuclei by suckling in rabbit pups. *European Journal of Neuroscience* Vol. 2(27), pag. 432-443.

18. Chen, R., Zhang, M., Park, S., & Gnegy, M. E. 2007. C57BL/6J mice show greater amphetamine-induced locomotor activation and dopamine efflux in the striatum than 129S2/SvHsd mice. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 87(1).
19. Chen, T.-W., Li, N., Daie, K., & Svoboda, K. 2017. A Map of Anticipatory Activity in Mouse Motor Cortex. *Neuron*, 94(4), 866–879.e4.
20. Ciccocioppo R., Sanna P. P., Weiss F. 2001. Cocaine-predictive stimulus induces drug-seeking behaviour and neural activation in limbic brain regions after multiple months of abstinence: Reversal by D1 antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 98, pag. 1976-1981.
21. Clemens, K. J., Castino, M. R., Cornish, J. L., Goodchild, A. K., & Holmes, N. M. 2014. Behavioral and Neural Substrates of Habit Formation in Rats Intravenously Self-Administering Nicotine. *Neuropsychopharmacology*, 39(11), 2584–2593.
22. Dafny, N., & Rosenfeld, G. C. 2017. Neurobiology of Drugs of Abuse. *Conn's Translational Neuroscience*, 715–722. x
23. Dailey, M. J., Stingl, K. C., & Moran, T. H. (2012). Disassociation between Preprandial Gut Peptide Release and Food-Anticipatory Activity. *Endocrinology*, 153(1), 132–142
24. Dailey, M. J., Stingl, K. C., & Moran, T. H. 2012. *Disassociation between Preprandial Gut Peptide Release and Food-Anticipatory Activity. Endocrinology*, 153(1), 132–142.
25. Dani, J. A., & Bertrand, D. 2007. *Nicotinic Acetylcholine Receptors and Nicotinic Cholinergic Mechanisms of the Central Nervous System. Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 47(1), 699–729.
26. Davidson, A. J., & Stephan, F. K. 1999. *Feeding-entrained circadian rhythms in hypophysectomized rats with suprachiasmatic nucleus lesions.*

27. Delgado Flores Sebastián Matías. 2015. La Legitimidad del Consumo y Regulación de Drogas Recreativas. Tesis de licenciatura. Universidad San Francisco de Quito, Colegio De Jurisprudencia.
28. DePoy, L. M., McClung, C. A., & Logan, R. W. 2017. Neural Mechanisms of Circadian Regulation of Natural and Drug Reward. *Neural Plasticity*, 2017, 1–14.
29. Devadasu, V. R., Deb, P. K., Maheshwari, R., Sharma, P., & Tekade, R. K. 2018. *Physicochemical, Pharmaceutical, and Biological Considerations in GIT Absorption of Drugs. Dosage Form Design Considerations*, 149–178.
30. Di Chiara G. 2000. Role of dopamine in the behavioural actions of nicotine to addiction. *European Journal of Pharmacology*. Vol 393, pag. 295-314
31. Di Nicola, M., Tedeschi, D., De Risio, L., Pettorruso, M., Martinotti, G., Ruggeri, F., Janiri, L. 2015. Co-occurrence of alcohol use disorder and behavioral addictions: relevance of impulsivity and craving. *Drug and Alcohol Dependence*, 148, 118–125.
32. Diehl K. H., Hull R., Morton D., Pfister R., Rabemampianina Y., Smith D., Vidal J. M., Vorstenbosch C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology*. Vol. 21, pag.15-23.
33. Dougherty J., Miller D., odd G., Kostenbauder H. B. 1981. Reinforcing and other behavioral effects of nicotine. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Vol. 5, pag.487-95.
34. Elhassan, S., Bagdas, D. y Damaj, MI 2017. Efectos de los metabolitos de nicotina en los comportamientos de abstinencia de nicotina en ratones. Investigación sobre la nicotina y el tabaco: revista oficial de la Society for Research on Nicotine and Tobacco , 19 (6), 763–766.
35. Encuesta Nacional de Consumo de drogas, alcohol y tabaco (ENCODAT). 2016-2017. Reporte de tabaco.

36. Engelman A. J., Aparicio M. B., Kim A., Sobieraj J. C., Yuan C. J., Grant Y., Mandyam C. D. 2014. Chronic wheel running reduces maladaptive patterns of methamphetamine intake: regulation by attenuation of methamphetamine-induced neuronal nitric oxide synthase. *Brain Structure Function*. Vol. 219, pag. 657-672.
37. Ernst, M., Nelson, E. E., McClure, E. B., Monk, C. S., Munson, S., Eshel, N., ... Pine, D. S. (2004). Choice selection and reward anticipation: an fMRI study. *Neuropsychologia*, 42(12), 1585–1597.
38. Fait, B. W., Thompson, D. C., Mose, T. N., Jatlow, P., Jordt, S. E., Picciotto, M. R., & Mineur, Y. S. (2017). Menthol disrupts nicotine's psychostimulant properties in an age and sex-dependent manner in C57BL/6J mice. *Behavioural brain research*, 334, 72–77.
39. Feillet, C. A., Ripperger, J. A., Magnone, M. C., Dulloo, A., Albrecht, U., & Challet, E. .2006.. *Lack of Food Anticipation in Per2 Mutant Mice*. *Current Biology*, 16(20), 2016–
40. Feillet, C. A., Ripperger, J. A., Magnone, M. C., Dulloo, A., Albrecht, U., & Challet, E. 2006. Lack of Food Anticipation in Per2 Mutant Mice. *Current Biology*, 16(20), 2016–2022.
41. Ferreira-Vieira H., T., M. Guimaraes, I., R. Silva, F., & M. Ribeiro, F. 2016. *Alzheimer's disease: Targeting the Cholinergic System*. *Current Neuropharmacology*, 14(1), 101–115.
42. Fu Balboa Marcela. 2011. Determinantes de las concentraciones de cotinina en saliva, dependencia de la nicotina, y estadios del cambio en fumadores (Memoria Doctoral). Facultad de Medicina. Universidad de Barcelona.
43. Galvalisi, M., Prieto, J. P., Martínez, M., Abin-Carriquiry, J. A., & Scorza, C. 2016. *Caffeine Induces a Stimulant Effect and Increases Dopamine Release in the Nucleus Accumbens Shell Through the Pulmonary Inhalation Route of Administration in Rats*. *Neurotoxicity Research*, 31(1), 90–98. Montoya-Filardi, A., & Mazón, M. (2017). El

cerebro adicto: imagen de las complicaciones neurológicas por el consumo de drogas. *Radiología*, 59(1), 17–30-

44. García Pardo María Pilar; Roger Sánchez Concepción; de la Rubia Ortiz José Enrique Aguilar Calpe; María Asunción. 2017. Animal models of drug, *Adicciones*. Vol.29, nº4.
45. Garmabi, B., Vousooghi, N., Vosough, M., Yoonessi, A., Bakhtazad, A., & Zarrindast, M. R. (2016). Effect of circadian rhythm disturbance on morphine preference and addiction in male rats: Involvement of period genes and dopamine D1 receptor. *Neuroscience*, 322, 104–114.
46. Gatto G. J., McBride W. J., Murphy J. M., Lumeng L., Li T. K. 1994. Ethanol self-infusion into the ventral tegmental area by alcohol-preferring rats. *Alcohol* Vol.11, nº6, pag. 557-564.
47. Gillman A. G., Kosobud A. E. K., Timberlake W. 2008. Pre- and post-nicotine circadian activity rhythms can be differentiated by a paired environmental cue. *Physiology and Behavior*. Vol.93, pag. 337-350.
48. Gómez Gómez Yvette Magaly.2017. Inmunoreactividad de c-Fos en el hipotálamo y el sistema de recompensa asociada a la novedad social en ratas jóvenes (Tesis licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de México Facultad de Ciencias.
49. Gómez, Raúl Angel 2005. Elementos para una psicobiología- 2ª ed. Córdoba; Ed. Brujas.
50. Goodwin, R. D., Sheffer, C. E., Chartrand, H., Bhaskaran, J., Hart, C. L., Sareen, J., & Bolton, J. (2014). *Drug Use, Abuse, and Dependence and the Persistence of Nicotine Dependence*. *Nicotine & Tobacco Research*, 16(12), 1606–1612. doi:10.1093/ntr/ntu115
51. Gooley J. J., Schomer A., Saper B. C. 2006. The dorsomedial hypothalamic nucleus is critical for the expression of food-entrainable circadian rhythms. *Nature Neuroscience*. Vol. 9, nº3, pag.398-407.

52. Gotti, C., Clementi, F., Fornari, A., Gaimarri, A., Guiducci, S., Manfredi, I., Zoli, M. (2009). Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochemical Pharmacology*, 78(7), 703–711.
53. Honma S., Honma K. 1995. Phase-dependent phase shift of methamphetamine-induced circadian rhythm by haloperidol in SCN-lesioned rats. *Brain Research*. Vol. 674, pag. 283-290.
54. Honma, K., & Honma, S. 2009. The SCN-independent clocks, methamphetamine and food restriction. *European Journal of Neuroscience*, 30(9), 1707–1717.
55. Huang, W., Ramsey, K. M., Marcheva, B., & Bass, J. (2011). Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *The Journal of clinical investigation*, 121(6), 2133–2141.
56. Huang, W., Ramsey, K. M., Marcheva, B., & Bass, J. 2011. Circadian rhythms, sleep, and metabolism. *The Journal of clinical investigation*, 121(6), 2133–2141.
57. Huerta Rivas Alejandra G, Cruz Martín del Campo Silvia L.2011. Adicciones y memoria.El Residente. Vol. VI n°2, pag. 2011: 69-77
58. Hukkanen Janne, Jacob Iii Peyton, And Benowitz Neal L. 2005. Metabolism and Disposition Kinetics of Nicotine. *Pharmacol Rev*, Vol. 57, No. 1. 57:79–115.
59. Iha Higor A.;Kunisawa Naofumi; Tokudome Kentaro; Mukai Takahiro; Kinboshi Masato; Shimizu Saki; Ohno Yukihiro.2017. Immunohistochemical Analysis of Fos Protein Expression for Exploring Brain Regions Related to Central Nervous System Disorders and Drug Actions. In: Philippu A. (eds) *In Vivo Neuropharmacology and Neurophysiology*. Neuromethods, vol 121. Humana Press, New York, NY.
60. Johnson Mary. 2912. Laboratory mice and rats. *MATER METHODS*;2:113
61. Juárez Portilla C., Pitter M., Kim R.D., Patel P.Y., Ledesma R.A., LeSauter J., Silver R. 2018. Brain Activity during Methamphetamine Anticipation in a NonInvasive Self-Administration Paradigm in mice. *eNeuro*, 5(3):1-14.
62. Kamenetzky, Giselle V.; Mustaca, Alba E. 2005. Modelos Animales para el Estudio del Alcoholismo. *Terapia Psicológica*, vol. 23, núm. 1, pp. 65-72

63. Kandeger, A., Selvi, Y., & Tanyer, D. K. (2018). The effects of individual circadian rhythm differences on insomnia, impulsivity, and food addiction. *Eating and Weight Disorders - Studies on Anorexia, Bulimia and Obesity*. doi:10.1007/s40519-018-0518-x
64. Karila, L., & Benyamina, A. 2019. Addictions. *Revue Des Maladies Respiratoires*. 36, 233-240.
65. Keith D. R, Hart C. L., Robotham M., Tariq M., Le Sauter J, Silver R. 2013. Time of day influences the voluntary intake and behavioral response to methamphetamine and food reward. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. Vol. 110, pag. 117-126.
66. Keith D. R, Hart C. L., Robotham M., Tariq M., Le Sauter J, Silver R. 2013. Time of day influences the voluntary intake and behavioral response to methamphetamine and food reward. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. Vol. 110, pag. 117-126.
67. Kenny , P. J., Hoyer, D., & Koob, G. F. 2018. *Animal Models of Addiction and Neuropsychiatric Disorders and Their Role in Drug Discovery: Honoring the Legacy of Athina Markou*. *Biological Psychiatry*, 83(11), 940–946.
68. King, C. E., Gano, A., & Becker, H. C. 2020. *The Role of Oxytocin in Alcohol and Drug Abuse*. *Brain Research*,1;1736:146761
69. Koob G.F., Volkow N.D. 2010. Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology*. Vol.35, pag. 217-238.
70. Koob G.F., Volkow N.D. 2010. Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology*. Vol.35, pag. 217-238.
71. Kosobud Ann E.K., Gillman Andrea G., Leffel Joseph K, Pecoraro Norman C., Rebec G.V. , and Timberlak William. 2007. Drugs of Abuse Can Entrain Circadian Rhythms. *The Scientific World Journal*. Vol. 7, pag. 203–212
72. Kutlu, M. G., & Gould, T. J. 2016. Effects of drugs of abuse on hippocampal plasticity and hippocampus-dependent learning and memory: contributions to development

and maintenance of addiction. *Learning & Memory*, 23(10), 515–533. doi:10.1101/lm.042192.116

73. Laborda Mario A. 2009. Modelos animales en psicopatología experimental: miedo, tolerancia a las drogas y condicionamiento. *Revista de Psicología*, Vol. XVIII, n°2, pag. 81-104.

74. Leshner A. I. 2001. Nicotine Addiction. Research Report Series. National Institute on Drug Abuse. NIH Publication. Vol.1. pag. 4342.

75. Marchant, E. G., & Mistlberger, R. E. 1997. *Anticipation and entrainment to feeding time in intact and SCN-ablated C57BL/6j mice. Brain Research*, 765(2), 273–282.

76. Marchant, N. J., Li, X., & Shaham, Y. 2013. *Recent developments in animal models of drug relapse. Current Opinion in Neurobiology*, 23(4), 675–683

77. Martínez Ruiz Mario y Rubio Valladolid Gabriel. 2002. Manual De Drogodependencia para Enfermería. Madrid, España: Ed.Díaz De Santos.

78. May, A. C., Aupperle, R. L., & Stewart, J. L. 2020. *Dark Times: The Role of Negative Reinforcement in Methamphetamine Addiction. Frontiers in Psychiatry*, 11.

79. Mieda M., Williams S. C., Richardson J. A., Tanaka K., Yanagisawa M. 2006. The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 103, n° 32, pag. 12150-12155.

80. Milton, A. L., & Everitt, B. J. 2012. *The persistence of maladaptive memory: Addiction, drug memories and anti-relapse treatments. Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 36(4), 1119–1139. Mustaca, Alba y Kamenetzky, Giselle . 2006. Alcoholismo y Ansiedad. *International journal of psychology and psychological therapy* Vol. 6 Núm. 3 Pág. 343-364

81. Mistlberger R. E. 2020. Food as circadian time cue for appetitive behavior. *F1000Research*, 9, F1000 Faculty Rev-61

82. Mistlberger R. E. Rusak B. 1987. Palatable daily meals entrain anticipatory activity rhythms in free-feeding rats: dependence on meal size and nutrient content. *Physiology and Behavioral*. Vol.41, n°3, pag. 219-26
83. Mitra, A., Lenglos, C., Martin, J., Mbende, N., Gagné, A., & Timofeeva, E. (2011). Sucrose modifies c-fos mRNA expression in the brain of rats maintained on feeding schedules. *Neuroscience*, 192, 459–474.
84. Molero Chamizo A. y Muñoz Negro J.E. 2005. Psicofarmacología De La nicotina y conducta adictiva *Psycopharmacology of nicotine and addiction*. Rev., Trastornos Adictivos. Vol. 7, Pag. 137-152.
85. Morales-Perez, C. L., Noviello, C. M., & Hibbs, R. E. (2016). *X-ray structure of the human  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptor*. *Nature*, 538(7625), 411–415. doi:10.1038/nature19785
86. Naranjo José Ramón, Gómez-Villafuertes Rosa. 2009. Regulación transcripcional dependiente de calcio en el sistema nervioso. Monografía XXV: Neurotransmisores y Patologías Nerviosas. Instituto De España, Real Academia Nacional de Farmacia Avances En Neurociencia.
87. National Institute drug abuse. 2010. National Institutes of Health (NIH) U.S.
88. NOM O62-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio
89. Nováková, M., Polidarová, L., Sládek, M., & Sumová, A. 2011. Restricted feeding regime affects clock gene expression profiles in the suprachiasmatic nucleus of rats exposed to constant light. *Neuroscience*, 197, 65–71.
90. Ohdo, S., Koyanagi, S., & Matsunaga, N. (2019). *Chronopharmacological strategies focused on chrono-drug discovery*. *Pharmacology & Therapeutics*.
91. Organización Mundial de la Salud. 2011. (OMS) Report on the global tobacco epidemic, 2011: warning about the dangers of tobacco.

92. Otero M., Cortijo C., yesta F. J. A. 2003. El tabaquismo como adicción. *Cardiovascular Risk Factors*. Vol. 12 n° 4, pag. 222-234.
93. Otero M., Cortijo C., yesta F. J. A. 2003. El tabaquismo como adicción. *Cardiovascular Risk Factors*. Vol. 12 n° 4, pag. 222-234.
94. Paraxinos George y Watson Charles.1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* 2ª ed. Academic Prees.
95. Park SL, Murphy SE, Wilkens LR, Stram DO, Hecht SS Le Marchand L.2017. Association of CYP2A6 activity with lung cancer incidence in smokers: The multiethnic cohort study. *PLoS One*. 2017 May 25;12(5):e0178435. doi: 10.1371.
96. Pastor, Verónica; Vázquez, Pablo; Corapi, Enrique y Bernabeu, Ramon. 2013. La adicción a la nicotina: vulnerabilidad, epigénesis y modelos animales de estudio. *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento*, Vol. 5, N°2, 61-73.
97. Peñalver Alonso Ana. 2016. Generación y caracterización de modelos murinos transgénicos para el análisis funcional de glutaminasas cerebrales (Tesis Doctoral). Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Universidad de Málaga.
98. Pereira T. 2008. Neurobiología de la adicción. *Revista de Psiquiatría del Uruguay*. Vol.73.n°1, pag. 9-24.
99. Pérez Ahuactzin, G. 2014. Eficacia del tratamiento sustitutivo nicotínico y tartrato de vareniclina en los derechohabientes fumadores de las clínicas contra el tabaquismo en el ISSSTE. Doctorado. Centros de Integración Juvenil A.C.
100. Pérez Cruz, Nuvia, Pérez Cruz, Hayvin, y Fernández Manchón, Eduardo J. 2007. Nicotina y adicción: un enfoque molecular del tabaquismo. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, Vol.6, n°1.
101. Pérez Rubio Gloria, Urdapilleta Herrera Eryka, Camarena Ángel, Reséndiz-Hernández Juan Manuel, Méndez G Mónica, Ramírez Venegas Alejandra, Sansores Raúl H., Falfán-Valencia Ramcés. 2011. Visión general de la neurobiología y genética en la adicción a la nicotina. *Neumología y cirugía de tórax*. Vol. 70, n°. 3, pag. 179-187.

102. Perrin Terrin, A. S., Jeton, F., Pichon, A., Frugière, A., Richalet, J. P., Bodineau, L., Voituren, N (2016). The c-FOS Protein Immunohistological Detection: A Useful Tool As a Marker of Central Pathways Involved in Specific Physiological Responses *In Vivo* and *Ex Vivo*. *J. Vis. Exp.* (110).
103. Pfau J. G., Damsma G., Nomikos G. G., Wenkstern D. G., Blaha C. D., Phillips A. G., Fibiger H. C. 1990. Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rat. *Brain Research*. Vol. 530, pag. 345-348.
104. Pitchers K. K. 2012. Neuroplasticity in the mesolimbic system induced by natural reward and subsequent reward abstinence. *Biological Psychiatry*. Vol. 67, pag. 872-900.
105. Pla Ferrer Davinia. 2010. Identificación y caracterización funcional de la interacción entre el proto-oncogen c-Fos y la proteína centrosomal. Tesis doctoral. Universidad de Valencia Departamento de Bioquímica y Biología Molecular Instituto de Biomedicina De Valencia.
106. Poulin, A.-M., & Timofeeva, E. (2008). The dynamics of neuronal activation during food anticipation and feeding in the brain of food-entrained rats. *Brain Research*, 1227, 128–141.
107. Pozuelos Estrada J., Martinena Padial E., Monago Lozano I., Viejo Durán I, Pérez Torralba T. (2000), *Farmacología de la nicotina, Medicina Integral*, Vol. 35, Pag. 1-14.
108. Qian, J., & Scheer, F. A. J. L. 2016. Circadian System and Glucose Metabolism: Implications for Physiology and Disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 27(5), 282–293.
109. Raymond R, Craig,; Warren Marshall; Morris Ralph W., Leikin Jerrold B. 1992. PERIODICITY OF PRESENTATIONS OF DRUGS OF ABUSE AND OVERDOSE IN AN EMERGENCY DEPARTMENT *CLINICAL TOXICOLOGY*, 30(3), 467-478

110. Reppert S. M., Weaver D. R. 2001. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annual Review of Physiology*. Vol. 63, pag. 647-76.
111. Robinson T. E., Berridge K. C. 2008. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* Vol. 363, pag.3137-46.
112. Robotham, M.T.N., Tariq, M., Le Sauter, J. and Silver, R. (2012), Effect of time of day on methamphetamine anticipation and neural activation. *FASEB J*, 26: 1b794-1b794.
113. Rodd Z. A., Melendez R. I., Bell R. L., Kuc K A., Zhang Y., Murphy J. M., McBride W. J. 2004. Intracranial self-administration of ethanol within the ventral tegmental area of male wistar rats: Evidence for involvement of dopamine neurons. *The Journal of Neuroscience*, Vol. 24, n°5, pag.1050-1057.
114. Roenneberg, T., Merrow, M. 2005. Relojes circadianos: caída y ascenso de la fisiología. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 965–971
115. Ross, D. 2020. *Addiction is socially engineered exploitation of natural biological vulnerability*. *Behavioural Brain Research*, 386, 112598.
116. Ruiz M.E., Scioli Montoto S. (2018) Routes of Drug Administration. In: Talevi A., Quiroga P. (eds) *ADME Processes in Pharmaceutical Sciences*. Springer, Cham
117. Santos, P. L., Brito, R. G., Matos, J. P. S. C. F., Quintans, J. S. S., & Quintans-Júnior, L. J. 2017 . Fos Protein as a Marker of Neuronal Activity: a Useful Tool in the Study of the Mechanism of Action of Natural Products with Analgesic Activity. *Molecular Neurobiology*, 55(6),
118. Sayette, M. A., & Dimoff, J. D.2016 . In search of anticipatory cigarette cravings: The impact of perceived smoking opportunity and motivation to seek treatment. *Psychology of addictive behaviors : journal of the Society of Psychologists in Addictive Behaviors*, 30(3), 277–286.
119. Schultz W. 1998. Predictive reward signal of dopamine neurons. *Journal of Neurophysiology*. Vol. 80 n°1, pag.1-27.

120. Shao, X. M., Liu, S., Lee, E. S., Fung, D., Pei, H., Liang, J., Xie, X. S. 2018. *Chronic intermittent nicotine delivery via lung alveolar region-targeted aerosol technology produces circadian pharmacokinetics in rats resembling human smokers. Journal of Applied Physiology.*
121. Shibata Shigenobu, Minamoto Yoshitsugu, Ono Michiko, Watanabe Shigenori.1994. Aging impairs methamphetamine-induced free-running and anticipatory locomotor activity rhythms in rats *Neuroscience Letters*. Vol.172, pag. 107 -110.
122. Shiffman S., Pillitteri J. L., Burton S. L., Di Marino M. E. 2004. Smoker and ex-smoker reactions to cigarettes claiming reduced risk. *Tobacco Control*. Vol.13, n°1, pag.78–84.
123. Sinha R. 2001. How does stress increase risk of drug abuse and relapse. *Psychopharmacology*. Vol.158, pag. 343-359.
124. Siqueira, L. M. 2016. *Nicotine and Tobacco as Substances of Abuse in Children and Adolescents. Pediatrics*, 139(1), e20163436.
125. Smith, M. A. 2019. *Nonhuman Animal Models of Substance Use Disorders: Translational Value and Utility to Basic Science. Drug and Alcohol Dependence*, 107733.
126. Spanagel R. 2017. Animal models of addiction. *Dialogues in clinical neuroscience*, 19(3), 247–258.
127. Spanagel, R., & Heilig, M. 2005. *Addiction and its brain science. Addiction*, 100(12), 1813–1822.
128. Sul, J., Jo, S., Lee, D. et al. 2011. Role of rodent secondary motor cortex in value-based action selection. *Nat Neurosci* 14, 1202–1208
129. Terry, A. V., & Callahan, P. M. 2020. *α7 nicotinic acetylcholine receptors as therapeutic targets in schizophrenia: Update on animal and clinical studies and strategies for the future. Neuropharmacology* 15;170:108053.
130. Tiffany, S. T., & Wray, J. M. (2011). *The clinical significance of drug craving. Annals of the New York Academy of Sciences*, 1248(1), 1–17.

131. Tiwari, R. K., Sharma, V., Pandey, R. K., & Shukla, S. S. (2020). Nicotine Addiction: Neurobiology and Mechanism. *Journal of Pharmacopuncture*, 23(1), 1–7.
132. Tsurugizawa, T., Uematsu, A., Uneyama, H., & Torii, K. (2012). Functional brain mapping of conscious rats during reward anticipation. *Journal of Neuroscience Methods*, 206(2), 132–137.
133. Turton, S., & Lingford-Hughes, A. 2016. *Neurobiology and principles of addiction and tolerance. Medicine*, 44(12), 693–696.
134. Valentine, G., & Sofuoglu, M. (2018). Cognitive Effects of Nicotine: Recent Progress. *Current neuropharmacology*, 16(4), 403–414.
135. Venebra-Muñoz, A, Corona-Morales, A, y García-García, F. (2011). Efecto del ambiente enriquecido sobre el consumo de nicotina en la rata wistar. *Universidad y ciencia*, 27(1), 97-102
136. Venniro, M., Zhang, M., Caprioli, D., Hoots, J. K., Golden, S. A., Heins, C., Shaham, Y. (2018). *Volitional social interaction prevents drug addiction in rat models. Nature Neuroscience*.
137. Verwey, M., Khoja, Z., Stewart, J., & Amir, S. (2007). Differential regulation of the expression of Period2 protein in the limbic forebrain and dorsomedial hypothalamus by daily limited access to highly palatable food in food-deprived and free-fed rats. *Neuroscience*, 147(2), 277–285.
138. Verwey, M., Khoja, Z., Stewart, J., & Amir, S. 2007. Differential regulation of the expression of Period2 protein in the limbic forebrain and dorsomedial hypothalamus by daily limited access to highly palatable food in food-deprived and free-fed rats. *Neuroscience*, 147(2), 277–285. doi:10.1016/j.neuroscience.2007.04.044
139. Webb I. C., Baltazar R. M., Lehman M. N., Coolen M. L. 2009. Bidirectional interactions between the circadian and reward systems is restricted food access a unique zeitgeber. *European Journal of Neuroscience*. Vol.30, pag.1739-1748.

140. Webb I. C., Baltazar R. M., Lehman M. N., Coolen M. L. 2009. Bidirectional interactions between the circadian and reward systems is restricted food access a unique zeitgeber. *European Journal of Neuroscience*. Vol.30, pag.1739-1748.
141. Wertz, J. M., & Sayette, M. A. (2001). A review of the effects of perceived drug use opportunity of self-reported urge. *Experimental and clinical psychopharmacology*, 9(1), 3–13.
142. Wertz, J. M., & Sayette, M. A. 2001.. A review of the effects of perceived drug use opportunity of self-reported urge. *Experimental and clinical psychopharmacology*, 9(1), 3–13.
143. White W., Feldon J., Heidbreder C. A., White I. M. 2000. Effects of administering cocaine at the same versus varying times of day on circadian activity patterns and sensitization in rats. *Behavioral Neuroscience*, Vol. 114, n°5, pag.972-582.
144. White W., Feldon J., Heidbreder C. A., White I. M. 2000. Effects of administering cocaine at the same versus varying times of day on circadian activity patterns and sensitization in rats. *Behavioral Neuroscience*, Vol. 114, n°5, pag.972-582.
145. Yorgancilar Ediz; Tunik, Selcuk, Deveci Engin, Gun Ramazan; Bakir Salih, Kinis Vefa; Ayaz Ercan y Topcu Ismail. (2012). The Effects of Systemic Use of Nicotine on the Rat Nasal Mucosa: a Histopathologic and Immunohistochemical Study, *International Journal of Morphology*, vol.30.
146. Zaki, N. F. W., Yousif, M., BaHammam, A. S., Spence, D. W., Bharti, V. K., Subramanian, P., & Pandi-Perumal, S. R. (2019). Chronotherapeutics. *Clinical*
147. Zhang M, Zhang D, Dai J, Cao Y, Xu W, He G, Wang Z, Wang L, Li R, Qiao Z. 2020. Paternal nicotine exposure induces hyperactivity in next-generation via down-regulating the expression of DAT, *Toxicology*
148. Zou Z., Wang H., d'Oleire Uquillas F., Wang X., Ding J., Chen H. 2017. Definition of Substance and Non-substance Addiction. In: Zhang X., Shi J., Tao R. (eds)

Substance and Non-substance Addiction. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 1010. Springer, Singapore.

## **IX. ANEXOS**

### **2° Foro de la Red CIBIO Universidad Veracruzana**

#### **ESTUDIO DE LA CONDUCTA EN ABORDAJE A PROBLEMAS SOCIOCULTURALES: EL CASO DE LA ADICCIÓN**

Karla Yumey Bonastre-Melendez<sup>1</sup>, Albertina Cortés Sol<sup>2</sup>, Thuluz Meza<sup>3</sup>, Óscar López-Franco<sup>4</sup>, Tania Molina<sup>5</sup>, Claudia Juárez-Portilla<sup>6</sup>

#### **RESUMEN**

La adicción es un trastorno que afecta mundialmente a millones de personas; drogas como la nicotina son consideradas como una gran amenaza a la salud pública, relacionada con altos índices de mortalidad y morbilidad, además de presentar altos valores de consumo, con repercusiones no solo de salud sino económicas y sociales. Recientemente se ha propuesto que tanto el uso de drogas como sus efectos están relacionados con la hora del día en que son consumidas, sugiriéndose una influencia circadiana en el desencadenamiento de la conducta adictiva. Esto ha sido demostrado en modelos animales a través de la evolución de distintos parámetros, incluida la actividad anticipatoria locomotriz, pues su manifestación sugiere que se ha desarrollado un comportamiento predictivo y es indicativo de una búsqueda y deseo por obtener la droga. El objetivo de este trabajo fue identificar la conducta anticipatoria locomotriz bajo el método de nebulización forzada de nicotina, método que asemeja el

---

<sup>1</sup>Estudiante de la maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala. La Loma Xicohtencatl, 90070 Tlaxcala de Xicohténcatl, Tlax. C.e.: yumeybonastremelendez@gmail.com

<sup>2</sup>Facultad de Biología, Universidad Veracruzana. Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Zona Universitaria, 91090 Xalapa-Enríquez, Ver. C.e.: alcortes@uv.mx

<sup>3</sup>Facultad de Medicina, Universidad Veracruzana. Médicos, Unidad del Bosque, 91010 Xalapa-Enríquez, Ver. C.e.: tmeza@uv.mx

<sup>4</sup>Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Veracruzana. Av. Dr. Luis Castelazo Ayala s/n. Col. Industrial Animas, C.P. 91190, Xalapa, Veracruz, Mexico. C. e.: oscarlopez01@uv.mx

<sup>5</sup>Facultad de Q.F.B., Universidad Veracruzana. Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán Sn, Zona Universitaria, Xalapa-Enríquez, Ver. C.e.: tmolina@uv.mx.

<sup>6</sup>Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Veracruzana. Av. Dr. Luis Castelazo Ayala s/n. Col. Industrial Animas, C.P. 91190, Xalapa, Veracruz, Mexico. C. e.: cljuarez@uv.mx

Autor por correspondencia: cljuarez@uv.mx

consumo humano. Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, asignadas en grupos nebulizados con: nicotina 3.0 mg/ml, grupo experimental (n=4) y agua destilada, grupo control (n=4). La nebulización se realizó a la misma hora durante 14 días. Diariamente, la actividad locomotriz fue registrada y colectada por sensores de movimiento. Nuestros resultados muestran el incremento en la actividad locomotora del grupo experimental 1 h antes de la nebulización respecto al grupo control. Esto sugiere que los sujetos que recibieron nicotina, por el método de nebulización forzada anticiparon la llegada de la droga; evidenciando el fenómeno de sincronización a nicotina. En conclusión, estudiar y entender las bases biológicas de conductas como la anticipación, en trastornos de alto impacto social como la adicción, genera nuevas perspectivas en la búsqueda de la disminución del consumo de drogas.

**Palabras clave:** Actividad anticipatoria, nebulización, nicotina, sincronización.

## ABSTRACT

Addiction is a disorder that affects millions of people worldwide; drugs such as nicotine represent a major threat to public health, related not just to high rates of mortality and morbidity but also health, economical and social repercussions. Recently, it has been proposed that patterns of usage of drugs and their effects depend on time of day of consumption, suggesting a circadian influence in the development and establishment of addiction. This assumption is based on animal models, through the assessment of several parameters, including behavior, specifically anticipatory activity. This behavior is related to predictive behaviors, such as searching and craving to obtain the drug. Thus, the goal of this study was to identify the anticipatory activity under nicotine forced nebulization method, which is similar to human consumption. Wistar male rats were used, they were assigned in two nebulized groups using: 3.0 mg/ml nicotine; experimental group (n = 4) and distilled water; control group (n = 4). Over 14 days, animals were nebulized at the same hour. Daily; locomotor activity was recorded and collected by motion sensors. Our results show that experimental group increased their activity 1 h before the nebulization time in comparison to control group. This suggests that subjects who received nicotine through forced nebulization, were able to anticipate the arrival of the drug; evidencing the synchronization. Overall, studying and understanding biological basis of behaviors such as anticipation, in disorders of high social impact such as addiction, generates new perspectives in the search for decreasing drug use.

**Keywords:** Anticipatory activity, nebulization, nicotine, synchronization.

## INTRODUCCIÓN

En término farmacológico, una droga es considerada como cualquier sustancia química que modifica los procesos bioquímicos fisiológicos y fisiológicos bioquímicos de los tejidos o los organismos, pero coloquialmente este término suele referirse a aquellas sustancias con potencial psicoactivo (OMS, 1994). Se ha estimado que, dependiendo de la sustancia, del 20-40% de personas que han experimentado con el consumo de una droga tienden a desarrollar una adicción (Egervari et al, 2018).

La adicción es un trastorno crónico que involucra el consumo compulsivo de una sustancia como resultado del uso repetido y prolongado de la misma, debido a los efectos gratificantes, a pesar de las consecuencias perjudiciales (Becker *et al*, 2016; Andrianarivelo *et al*, 2019). Actualmente la adicción es abordada desde una perspectiva diagnóstica, incluido dentro del manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-5), en el cual se considera al abuso de sustancias y la dependencia como una patología (Koob y Volkod, 2016).

La adicción a las drogas es una enfermedad devastadora que afecta a millones de personas en todo el mundo (Terregrosa, 2019), es considerado un problema de salud pública, tanto a nivel nacional como internacional (Sánchez, et al., 2017), en donde el cual ciertas adicciones como el tabaquismo, influenciado por su principal componente psicoactivo, la nicotina, es considerado una de las principales causas de muertes prevenibles en el mundo, por su relación como factor causal de una variedad de enfermedades como el cáncer (Reynales, 2016), además de presentar altos índices de consumo, en México, el Instituto Nacional de Salud Pública, a través de la Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco (ENCODAT) 2016–2017, estima que 14.9 millones de mexicanos son fumadores actuales (17.6%), que corresponde al 17.6% de la población cuyo rango de edad de los consumidores se encuentra entre 12 a 65 años.

En este sentido, se sabe que el consumo estas sustancias psicoactivas genera un sinnúmero de implicaciones negativas sobre la salud física y mental de las personas, pero estas afectaciones no son solo se ven reflejadas en el sector salud, ya que pues conllevan afectaciones a nivel social y económico,

por lo que es un tema de interés para múltiples sectores de la sociedad en todo el mundo (Correa y Pérez, 2013; Velázquez et al., 2016).

Parte importante de la investigación actual sobre el abuso de drogas es comprender los mecanismos que median la transición del uso ocasional y controlado de drogas a la pérdida del control conductual sobre la búsqueda y consumo, partiendo de que el desarrollo de la adicción es un proceso gradual influenciado por una variedad de factores (Koob y Volkod, 2010; Brockett, et al., 2018).

Se ha reportado que el horario en que las drogas son consumidas puede ser un factor importante en el desarrollo de la conducta de búsqueda de la misma y su efecto., Reportes epidemiológicos han descrito reportes médicos donde se muestra como las tendencias de ingreso de pacientes con intoxicación por sobredosis a drogas de abuso a ciertas horas del día se reportan un mayor número de pacientes con intoxicación por sobredosis a drogas de abuso (Erickson, et al., 1998). De lo anterior, se plantea, de ahí es que se plantea que las drogas funcionan como estímulos capaces de generar comportamientos circadianos en su consumo.

Las drogas de abuso tienen efecto sobre el sistema límbico, ya que al ser consumidas producen en el individuo una sensación placentera, de esta manera adquiere el carácter de reforzador positivo, (Dafny y Rosenfeld, 2017). Esto quiere decir, que el individuo buscará repetir la experiencia placentera. El uso de modelos animales ha permitido identificar que al administrarse ciertas drogas en un horario regular diario, su actividad locomotora incrementa alrededor de la hora de consumo, a este incremento se le conoce como actividad anticipatoria (White *et al.*, 2000; Keith *et al.*, 2013 Juárez Portilla *et al.*, 2018). En este sentido, la anticipación se describe como una conducta de estado de alerta que permite a los individuos prepararse ante futuros eventos o estímulos, por lo tanto se incrementa la probabilidad de conseguirlos y aprovecharlos, justo antes de que éstos se presenten (Schultz, 1998). Esta conducta de anticipación se ha observado ante estímulos de alto valor motivacional, como alimento, dulces altamente apetecibles y sexo (Pfaus *et al.*, 1990; Ángeles *et al.*, 2007; Pitchers, 2012; Blancas y Escobar, 2013).

De acuerdo a estas observaciones se cree que existe un factor rítmico circadiano que parece jugar un papel importante en el consumo regular y posterior establecimiento de la adicción a las drogas, sugiriendo que se ha desarrollado un comportamiento predictivo a la llegada de la nueva dosificación (Ijima, et al., 2012), por lo que estudiar si esta conducta se presenta cuando se consumen drogas de gran impacto en distintos factores mundialmente, como la nicotina, puede permitir abordar otro aspecto

relacionado con el comportamiento motivado, que posteriormente pueda ser complementado con los estímulos ambientales y sociales que participan junto con la manifestación conductual (Pereira, 2008) y así, mejorar estrategias para el abordaje y entendimiento del desarrollo de la adicción.

Por lo que el objetivo de este proyecto fue identificar el despliegue de la conducta de anticipación tras administrar nicotina nebulizada en un horario regular, en un modelo de nebulización forzada en rata.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Grupos experimentales

Se utilizaron 8 ratas macho de la cepa Wistar de 12 semanas de edad, con peso aproximado de 250-300 g al inicio del estudio, criadas y mantenidas en el Centro de Investigaciones Biomédicas de Xalapa, Veracruz, México. Los animales se alojaron individualmente bajo condiciones de luz-oscuridad 12:12h (encendido de luz a las 07:00 h) durante todo el periodo experimental. Los animales recibieron alimento (Rat Chow) y agua *ad libitum* y estuvieron bajo condiciones de temperatura controlada (22±1°C). Antes de comenzar el experimento, los animales se mantuvieron sin manipulación alguna durante dos semanas, para su adaptación al ciclo de luz-oscuridad y a las condiciones del cuarto experimental. Inmediatamente después, los sujetos fueron separados en dos grupos, el grupo experimental (n=4) fue nebulizado con una solución de nicotina (3.0 mg/ml) y el grupo control (n=4) con una solución libre de nicotina. Todos los procedimientos utilizados en el experimento fueron regulados por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

### Equipo experimental de administración por nebulización

El sistema de nebulización se diseñó como se muestra en la figura 1: cajas de policarbonato (37 x 53 x 19 cm) con seis compartimentos (37 x 25 x 19 cm). En el centro de la caja se encuentra un tubo de policloruro de vinilo de una pulgada de diámetro x 25 cm de altura, de manera que una parte del tubo sobresale de la superficie de la caja. El tubo tiene verticalmente cuatro orificios de aproximadamente 3 mm de diámetro, separados equitativamente en el largo del tubo, de manera que el vapor se distribuya por igual en todos los compartimentos. En cada procedimiento la caja se cerró con tapas de plástico removibles, con un orificio en el centro para la salida del tubo principal. El extremo del tubo principal se conecta durante cada nebulización a la manguera del nebulizador de compresor (OMROM NE-

C801KD), que coinciden en diámetro, y se sella con papel parafina durante cada procedimiento para impedir el escape del vapor.

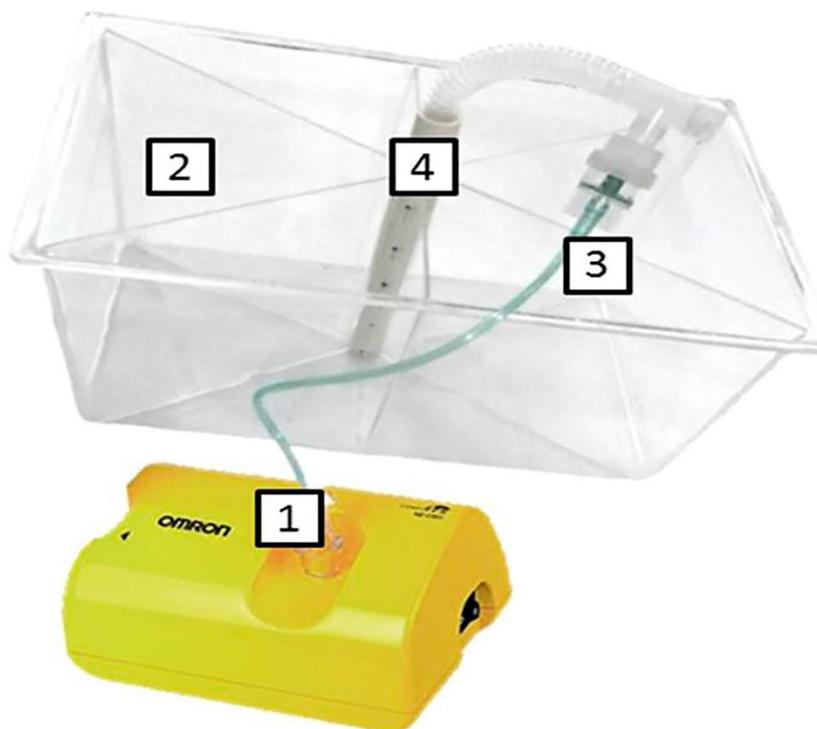


Figura 1. Aparato experimental: Caja de nebulización. 1) Nebulizador de compresor (OMRON NE-C801KD), 2) Caja de nebulización, compartimentos de acrílico individuales, 3) Manguera del suministro de vapor y contenedor de nicotina, 4) Tubo principal y orificios dosificadores.

#### Identificación de la conducta de anticipación

Para la identificación conductual de la actividad locomotora anticipatoria se utilizó un sistema de registro circadiano de locomoción, los datos colectados corresponden a las dos semanas de adaptación y dos semanas de experimentación. El grupo experimental nicotina fue administrado con 4 ml de solución de nicotina diariamente a las 11:00 h, durante 20 min, de manera paralela, y bajo las mismas condiciones, se nebulizó al grupo control con vapor de agua destilada (Fig. 2). Para ello, las ratas fueron trasladadas desde las cajas hospederas hasta las cajas de nebulización y al finalizar, regresadas a las cajas de alojamiento hasta el día siguiente. Cabe mencionar que se siguió este procedimiento durante 14 días y las ratas fueron rotadas aleatoriamente del espacio de nebulización dentro del aparato experimental

para disminuir el posible sesgo de diferencia en el espacio de nebulización por el diseño del aparato experimental.



**Figura 2.** Nebulización de soluciones experimentales, libre de nicotina (izquierda) y nicotina (derecha) a ratas macho Wistar. Note que solo los sujetos que reciben nicotina mantienen las fosas nasales junto a los orificios dispensadores de vapor de nicotina.

Para el análisis cualitativo y cuantitativo de la actividad locomotora de anticipación se consideró el número de movimientos de los sujetos en periodos de 24 h durante los 28 días. El número de movimientos fue registrado y guardado con el software del sistema de registro conductual (SPAD9; OMNIALVA). La detección de los movimientos se realizó a través de sensores infrarrojo colocados en la parte superior de las cajas hospederas (Fig. 3). Estos sensores son sensibles a las emisiones de calor que son detectadas en longitud de onda infrarrojo ( $\lambda=5-14$  nm), por lo que cada vez que el animal se movía, el sensor generaba una señal, la cual fue almacenada y enviada cada 15 min a la base de datos.



Figura 3. Sensores de registro de actividad locomotora colocados en la parte superior de la caja hospedera.

## RESULTADOS

Lo primero que se valoró fue el comportamiento de los animales durante el tiempo de acondicionamiento para poder conocer su comportamiento de locomoción basal en las condiciones de hospedaje ya descritas anteriormente. Por lo que se graficó el promedio de la actividad locomotora de cada hora durante la última semana de acondicionamiento (Fig. 4). Al graficar los datos obtenidos se observó que todos los individuos presentan mayores índices de actividad durante las horas de oscuridad con respecto al periodo de luz, dado que las ratas son animales nocturnos, esto nos indica que ambos grupos muestran una actividad nocturna basal y adecuada para el inicio de la experimentación.

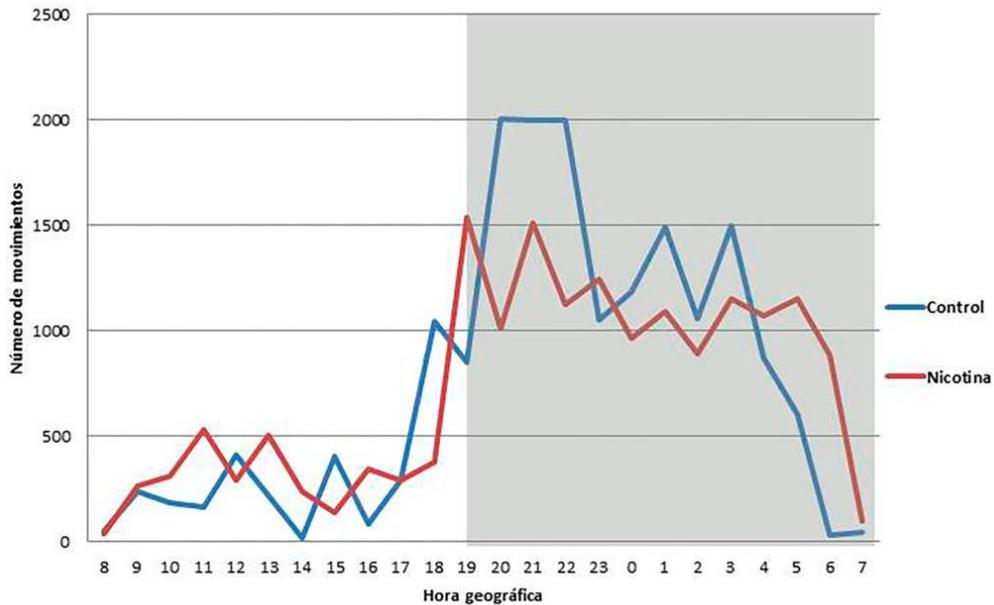


Figura 4. Patrón basal de la actividad locomotora durante el periodo de acondicionamiento. Gráfico del promedio de número de movimientos por hora del grupo control y del grupo experimental durante la última semana de acondicionamiento. El sombreado gris indica el periodo de oscuridad diario y la zona sin sombreado corresponde al periodo de luz.

Al terminar los 14 días de administración se obtuvieron actogramas de actividad, que nos permitieron observar los cambios en el patrón de la actividad locomotora durante todo el experimento, considerando los días de acondicionamiento y los experimentales. Al contrastar los actogramas se destacó que en los sujetos experimentales se presentó un aumento en la actividad en un periodo previo al horario de administración. A continuación se muestra los actogramas de actividad de un animal representativo de cada grupo (Fig. 5), en los cuales de manera cualitativa se puede identificar la presencia de la actividad anticipatoria en el animal que recibió nicotina, luego de los primeros días de administración.

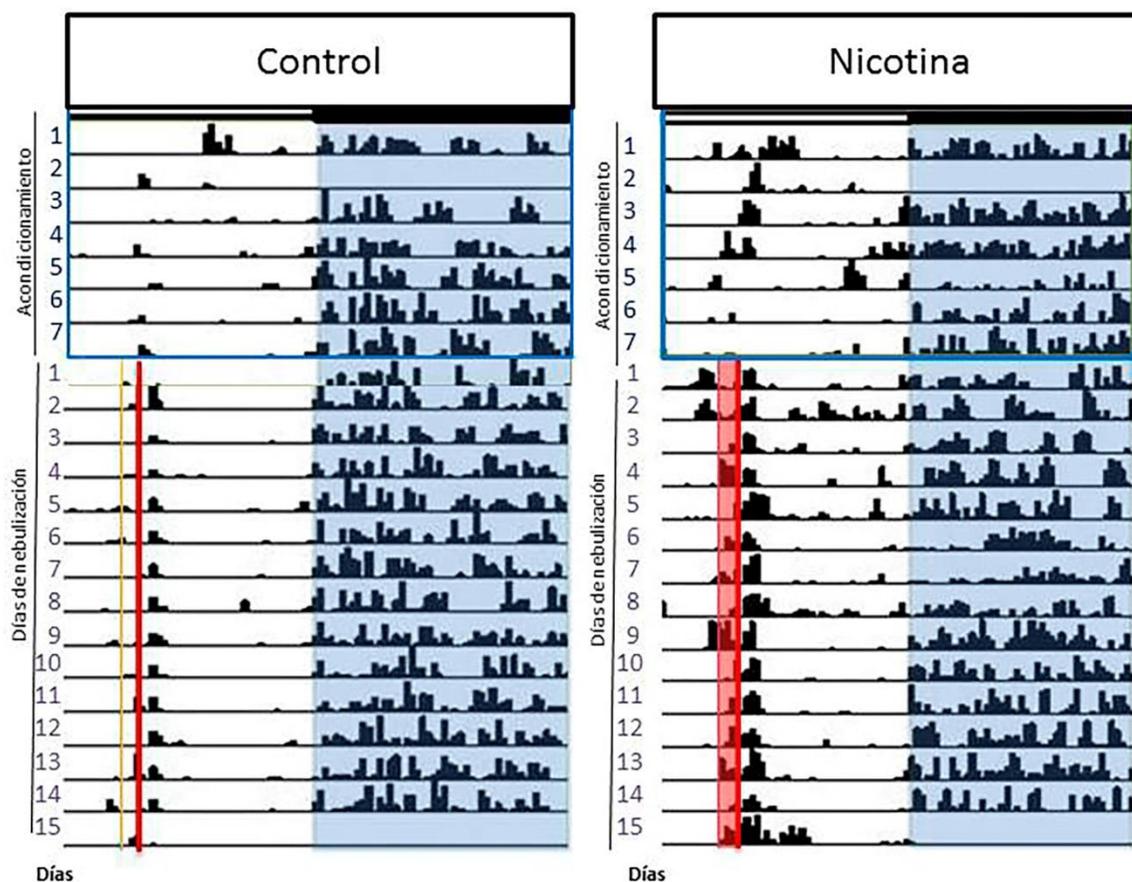


Figura 5. Actividad locomotora. Actograma de actividad de un sujeto representativo de cada grupo: control (nebulizado con agua) y experimental (nebulizado con solución de nicotina 3.0 mg/ml). Las barras horizontales en blanco y negro en la parte superior representan el ciclo luz-oscuridad (7:00 h, encendido de luces). El rectángulo azul indica el registro durante la última semana de acondicionamiento. Las barras verticales rojas indican el periodo de nebulización (20 min). El rectángulo sombreado rojo indica la actividad anticipatoria observada 1 hora antes de la nebulización

Para poder observar el intervalo de tiempo en que se presentaba la actividad observada en los actogramas, así como cuantificar la anticipación, se graficó el número de movimientos diario durante los 14 días de ambos grupos (Fig. 6). Al observar el gráfico se muestra una diferencia conductual del grupo experimental con respecto al control, donde se evidencia un aumento en el número de movimientos aproximadamente a partir de dos horas antes del horario de administración, esto nos indica que los sujetos están a la expectativa de la llegada de la droga lo cual los motiva a estar más activos durante el periodo que corresponde a su descanso. Además se muestra una hiperactividad posterior a la administración en el grupo administrado con nicotina, esto es congruente con los efectos estimulantes

de la nicotina, lo cual nos indica que la droga está actuando a nivel de sistema nervioso, tal como se encuentra reportado con otras vías de administración.

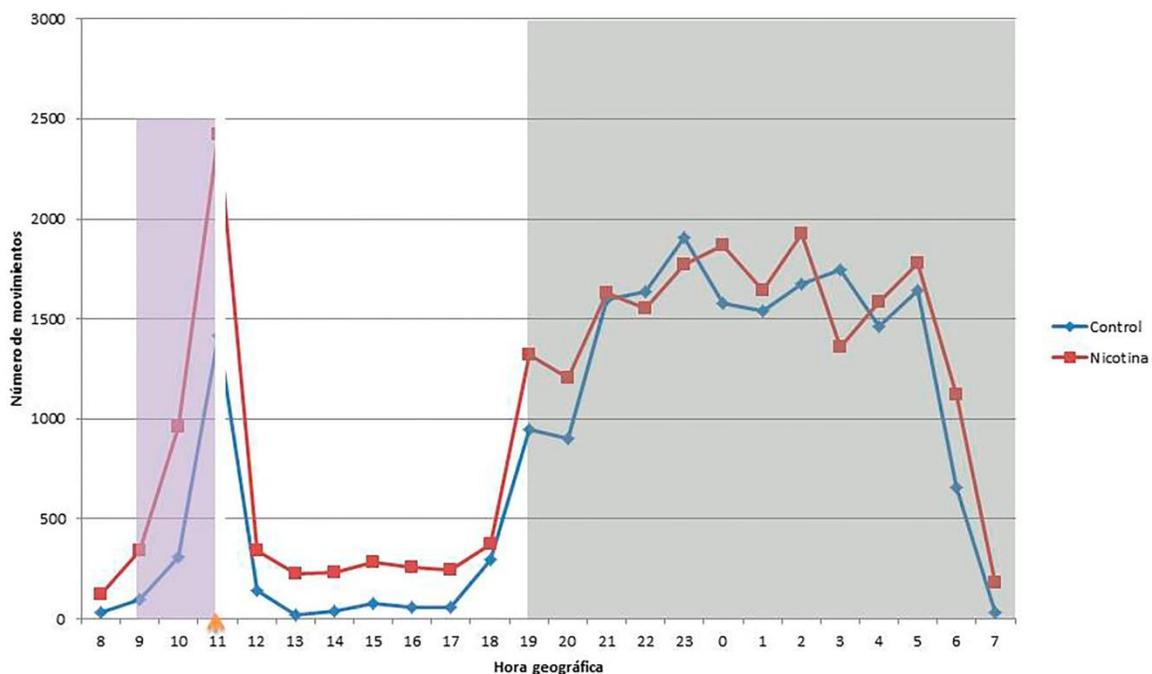


Figura 6. Actividad diaria. Promedio de número de movimientos registrados por hora de cada grupo experimental, el recuadro morado claro indica el horario previo a la administración, La flecha naranja indica el momento de la administración seguida por un recuadro blanco que refiere el intervalo de tiempo en el que fueron nebulizados los sujetos.

## CONCLUSIÓN

La conducta adictiva es un proceso complejo en el que se encuentran involucrados muchos factores tanto biológicos como sociales, es por eso que identificar la posible participación de factores poco abordados hasta el momento, como los circadianos, permite complementar el estudio del desencadenamiento de la adicción. En este trabajo se logró identificar que la nicotina, una de las drogas más consumidas a nivel mundial, tiene la capacidad de modificar la conducta de los sujetos, presentando un incremento de la actividad previo al consumo de la droga (anticipación) como conducta motivada para obtener el estímulo. En este sentido, estos resultados nos permiten concluir que cuando una droga, como la nicotina, se administra de manera regular, desde las primeras administraciones el sujeto logra identificarlo como un estímulo aún más importante que su descanso. En conclusión el estudio de la

adicción, un problema de salud, económico y social, de gran impacto, es necesario para poder abordarlo desde una perspectiva más amplia.

## REFERENCIAS

1. Andrianarivelo, A., Saint-Jour, E., Walle, R., Trifilieff, P., & Vanhoutte, P. 2018. *Modulation and functions of dopamine receptor heteromers in drugs of abuse-induced adaptations. Neuropharmacology.*
2. Angeles Castellanos M, Mendoza J, Escobar C. 2007. Restricted feeding schedules phase shift daily rhythms of c-Fos and protein Perl immunoreactivity in corticolimbic regions in rats. *Neuroscience*. Vol 144 n°1, pag. :344-55.
3. Becker, J. B., McClellan, M. L., & Reed, B. G. 2016. *Sex differences, gender and addiction. Journal of Neuroscience Research*, 95(1-2), 136–147.
4. Blancas Velázquez Áurea Susana y Escobar Briones Carolina. 2013. Activación progresiva de áreas cerebrales inducida por la ingestión diaria de una golosina dulce. *Gaceta Médica de México*. 149 :272-9
5. Brockett, A. T., Pribut, H. J., Vázquez, D., & Roesch, M. R. 2018. The impact of drugs of abuse on executive function: characterizing long-term changes in neural correlates following chronic drug exposure and withdrawal in rats. *Learning & Memory*, 25(9), 461–473.
6. Correa Muñoz A.M. y Pérez Gómez A. 2012. Relación e impacto del consumo de sustancias psicoactivas sobre la salud en Colombia. *LIBERABIT: Lima (Perú)* 19(2): 153-162.
7. Dafny, N. y Rosenfeld, G. C. (2017). *Neurobiology of Drugs of Abuse. Conn's Translational Neuroscience*, 715–722.
8. Egervari, G., Ciccocioppo, R., Jentsch, J. D., & Hurd, Y. L. 2018. Shaping vulnerability to addiction – the contribution of behavior, neural circuits and molecular mechanisms. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 85, 117–125.
9. Encuesta Nacional de Consumo de drogas, alcohol y tabaco (ENCODAT). 2016-2017. Reporte de tabaco.
10. Erickson T. B., Lee J., Zautcke J. L., Morris R. 1998. Analysis of cocaine chronotoxicology in an urban ED. *American Journal of Emergency Medicine* Vol.16, pag. 568-571.
11. *Glosario de términos Organización mundial de la salud*. 1994
12. Iijima Michihiko, Nikaido Takato, Akiyama Masashi, Moriya Takahiro and Shibata Shigenobu. 2002. Methamphetamine-induced, suprachiasmatic nucleus-independent circadian rhythms of

- activity and mPer gene expression in the striatum of the mouse. *European Journal of Neuroscience*, Vol. 16, pag. 921-929.
13. Juárez Portilla C., Pitter M., Kim R.D., Patel P.Y., Ledesma R.A., LeSauter J., Silver R. 2018. Brain Activity during Methamphetamine Anticipation in a NonInvasive Self-Administration Paradigm in mice. *eNeuro*, 5(3):1-14.
  14. Keith D. R., Hart C. L., Robotham M., Tariq M., Le Sauter J., Silver R. 2013. Time of day influences the voluntary intake and behavioral response to methamphetamine and food reward. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. Vol. 110, pag. 117-126.
  15. Koob G.F., Volkow N.D. 2010. Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology*. Vol.35, pag. 217-238.
  16. Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2016). Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The lancet. Psychiatry*, 3(8), 760–773.
  17. Pereira T. 2008. Neurobiología de la adicción. *Revista de Psiquiatría del Uruguay*. Vol.73.nº1, pag. 9-24.
  18. Pfaus J. G., Damsma G., Nomikos G. G., Wenkstern D. G., Blaha C. D., Phillips A. G., Fibiger H. C. 1990. Sexual behavior enhances central dopamine transmission in the male rat. *Brain Research*. Vol. 530, pag. 345-348.
  19. Pitchers K. K. 2012. Neuroplasticity in the mesolimbic system induced by natural reward and subsequent reward abstinence. *Biological Psychiatry*. Vol. 67, pag. 872-900.
  20. Reynales-shigematsu, Luz Myriam. Tobacco and cancer: epidemiology and new perspectives of prevention and monitoring in Mexico. *Salud Pública de México*, [S.l.], v. 58, n. 2, p. 251-260.
  21. Sánchez-Hoil, Alejandro, Andueza-Pech, María Guadalupe, Santana-Carvajal, Andrés Martín, Hoil-Santos, Jolly Josefina, & CuFarfán-López, Julio. 2017. Características sociodemográficas y perfil de consumo de tabaco y drogas en estudiantes de dos universidades de México. *Revista biomédica*, 28(1), 11-27.
  22. Schultz W. 1998. Predictive reward signal of dopamine neurons. *Journal of Neurophysiology*. Vol. 80 nº1, pag.1-27.
  23. Villatoro Velázquez, Jorge Ameth et al. Drugs use in Mexican students: trends and Magnitude of the problem. *Salud Mental*, , v. 39, n. 4, p. 193-203, aug. 2016.
  24. White W., Feldon J., Heidbreder C. A., White I. M. 2000. Effects of administering cocaine at the same versus varying times of day on circadian activity patterns and sensitization in rats. *Behavioral Neuroscience*, Vol. 114, nº5, pag.972-582.

## **XVIII Curso-Reunión del grupo de Bioseñales, Universidad Autónoma de Tlaxcala.**

### **Identificación de la actividad anticipatoria locomotriz a la administración de nicotina mediante dos métodos de análisis conductual: automatizado y manual.**

*Karla Yumey Bonastre Melendez<sup>1</sup> (Estudiante de maestría); Rossana C. Zepeda<sup>2</sup>; Tania Molina Jiménez<sup>3</sup>; Gabriel Roldán Roldán<sup>4</sup>, Mónica Flores Muñoz<sup>5</sup>; Claudia Juárez Portilla<sup>2</sup>.*

*<sup>1</sup>Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala. <sup>2</sup>Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Veracruzana. <sup>3</sup>Instituto Interdisciplinario de Investigaciones, Universidad de Xalapa. <sup>4</sup>Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. <sup>5</sup>Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Veracruzana.*

*Correo electrónico: [yumeybonastremelendez@gmail.com](mailto:yumeybonastremelendez@gmail.com)*

La actividad anticipatoria es referida un estado de alerta que permite a los organismos prepararse ante la futura llegada de recursos, caracterizada por presentarse ante estímulos de alto valor motivacional. Se ha sugerido que algunas drogas de abuso funcionan como sincronizadores de los ritmos circadianos cuando son administradas diariamente en horarios regulares de 24 h aproximadamente, mostrando un incremento de la actividad locomotora horas previas a la llegada de la droga, conocida como conducta anticipatoria (CA). Esta CA puede ser un referente importante de motivación que incrementa la probabilidad de conseguir y aprovechar el estímulo, en este caso la droga, justo antes de que ésta se presente. Las vías neurales así como las conductas relacionadas tanto a la adicción como al consumo de drogas de abuso han sido estudiadas mediante modelos animales. Por su parte, se ha considerado a la CA como un factor con influencia importante en la búsqueda de drogas desde las primeras etapas del consumo. De esta manera, se ha generado interés hacia el estudio de este factor circadiano, los protocolos con modelos murinos son los más utilizados en la actualidad, usando principalmente rata y ratón. Dado que la CA puede tener una influencia importante sobre la conducta locomotora, esta última es evaluada mediante registros automatizados de locomoción, aunque este estado de alerta también puede ser valorado considerando otras conductas como acicalamiento, reposicionamiento, etc., que son difíciles de detectar mediante un sistema automatizado. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la conducta de anticipación a la administración de nicotina por nebulización forzada, en modelo animal de rata cepa Wistar y ratón cepa C57BL/6 mediante el uso de un sistema automatizado de registro de locomoción (SPAD 10) y uno de registro manual del estado de alerta. Para ello, en cada modelo se evaluaron dos grupos asignados al azar, el grupo experimental (nebulizado con una solución nicotina 2.5 mg/ml para ratón y 3.0 mg/ml para rata) y el grupo control (nebulizado con agua destilada). La nebulización se realizó en el mismo horario durante 20 minutos por 14 días. Diariamente los sujetos fueron trasladados de las cajas hospederas a las cajas nebulizadoras. La actividad locomotriz de las ratas fue registrada por sensores de movimiento; la actividad del ratón se monitoreó por videograbación y posteriormente se evaluó su conducta por conteo de conductas manualmente. Ambos métodos de análisis de la CA muestran un incremento en la actividad del grupo experimental 1 h antes de la nebulización respecto al grupo control, por lo concluimos que los sujetos que recibieron nicotina, a pesar de ser modelos con características diferentes, anticiparon la llegada de la droga, lo cual nos muestra la comparación de dos

protocolos que permiten destacar la capacidad de ciertas drogas para modificar los patrones de conducta de los sujetos.

## **XVII Congreso Participación de la Mujer en la Ciencia**

### **Actividad anticipatoria a nicotina en un modelo de nebulización forzada en ratón**

*Karla Yumey Bonastre Melendez<sup>1</sup>; Mónica Flores Muñoz<sup>2</sup>; Tania Molina Jiménez<sup>3</sup>; Albertina Cortés Sol<sup>4</sup>; Thuluz Meza<sup>5</sup>; Claudia Juárez Portilla<sup>6</sup>.*

*<sup>1</sup>Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala. <sup>2</sup>Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Veracruzana. <sup>3</sup>Instituto Interdisciplinario de Investigaciones, Universidad de Xalapa. <sup>4</sup>Facultad de Biología, Universidad Veracruzana. <sup>5</sup>Facultad de Medicina, Universidad Veracruzana. <sup>6</sup>Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Veracruzana.*

#### **Resumen**

Recientemente se ha propuesto que cuando algunas drogas son administradas diariamente, en horarios regulares, funcionan como sincronizadores de ritmos circadianos. Esta sincronización se caracteriza por la presencia de una conducta conocida como actividad anticipatoria (AA), distinguida por la manifestación de un estado de búsqueda del estímulo previo a su llegada. Dado que la AA puede tener una influencia importante sobre la conducta motora del sujeto, su identificación se basa en el registro de un estado de hiperactividad espontánea, aunque algunos trabajos se basan únicamente en la locomoción, este estado de alerta puede ser valorado considerando además otras conductas. En este trabajo nos planteamos como objetivo identificar la actividad anticipatoria bajo el método de nebulización forzada de nicotina. Se utilizaron ratones macho asignados en dos grupos: Grupo experimental (GN) nebulizado con nicotina 2.5 mg/ml y grupo control (GC) nebulizado con agua destilada. La nebulización se realizó a las 11:00 h durante 20 minutos por 14 días. Se monitoreó su actividad mediante videograbación, la AA se determinó mediante el registro manual de las conductas de alerta. Los resultados muestran que la actividad se incrementó en el GE 1 h antes de la nebulización con respecto al GC, mostrando un aumento en las conductas que determinan el estado de alerta. Esto sugiere que los sujetos que recibieron nicotina por el método de nebulización forzada anticiparon la llegada de la droga, evidenciando la sincronización a nicotina. En conclusión, el estudio de los factores que pueden contribuir al consumo de drogas, como la nicotina, mediante el uso de modelos animales, representa una herramienta muy útil para la exploración de conductas como la anticipación y así generar nuevas contribuciones al estudio de la adicción.

## **1. Introducción**

En la actualidad, la adicción a las drogas se trata de un trastorno caracterizado por el consumo compulsivo de una sustancia, como resultado del uso repetido y prolongado de la misma, debido a los efectos gratificantes, a pesar de las consecuencias perjudiciales (Becker et al, 2016; Andrianarivelo et al, 2019, DMS-5). Este trastorno es considerado un problema a la salud pública nacional e internacional, con afectaciones a millones de personas en el mundo (Sánchez et al., 2017; Terregrosa, 2019).

Parte importante del desarrollo de la conducta adictiva involucra el consumo compulsivo de una sustancia, como resultado del uso repetido y prolongado de la misma, debido a los efectos gratificantes y a pesar de las consecuencias perjudiciales (Milton y Everitt, 2012; Koob y Volkow, 2016). Consecuentemente al consumo repetido se presenta un estado de preocupación y una búsqueda compulsiva difícil de controlar como respuesta al alto deseo por el consumo de la droga (Koob y Volkow, 2010; Spanagel y Heiling, 2005). Reportes epidemiológicos han mostrado una tendencia de ingreso a las salas de emergencia de pacientes con intoxicación por sobredosis a drogas de abuso a ciertas horas del día (Erickson et al., 1998). Por lo que, recientemente se ha considerado que el horario en que una droga sea consumida, puede participar en el desarrollo de la conducta de búsqueda y consumo.

El uso de los modelos animales es una de las herramientas más utilizadas para el estudio del consumo de drogas (Kamenetzky y Mustaca, 2005; Venebra et al., 2011), por lo que considerando la relevancia que se le ha dado a el horario en que una droga es consumida, se han realizado protocolos donde se ha identificado que cuando la droga es administrada en un horario fijo regular, se destaca la presencia de la conducta conocida como anticipación (Juárez et al., 2018).

La conducta de anticipación es definida como un estado de alerta que permite a los organismos prepararse ante futuros eventos o estímulos, y por lo tanto incrementa la probabilidad de conseguirlos y aprovecharlos justo antes de que éstos se presenten (Schultz, 1998; Webb et al., 2009; DePoy, 2017). En los modelos animales esta conducta se caracteriza principalmente por un aumento de la actividad motriz y conductas de alerta antes de la exposición a la droga (Mieda et al., 2006; Dailey, et al., 2012).

Con base en estas observaciones se piensa que existe un factor rítmico circadiano que tiene una participación importante como parte del proceso motivado de la búsqueda compulsiva y en el consumo regular, que posteriormente se desarrolla como dependencia y adicción, sugiriendo

que se ha desarrollado un comportamiento predictivo a la llegada de la nueva dosificación (Ijima, et al., 2012). Es por ello, que estudiar esta conducta que se presenta cuando se consumen drogas de gran impacto tanto a nivel de salud, como económico y social, como lo es la nicotina, permite considerar otro aspecto relacionado con el comportamiento motivado, que posteriormente pueda ser complementado con los estímulos ambientales y sociales que participan junto con la manifestación conductual (Pereira, 2008). Lo anterior para el mejoramiento de estrategias para el abordaje y entendimiento del desarrollo de la adicción. Por ello, el objetivo de este proyecto fue identificar la actividad anticipatoria a la nicotina administrada por vía inhalatoria.

## **1. Materiales y métodos**

### *Animales y alojamiento*

Se utilizaron 10 ratones macho C57BL/6 de 5 semanas de edad al inicio del experimento, con peso aproximado de 20g alojados bajo condiciones de luz/oscuridad 12/12 h (encendido de la luz 07:00 h; definido como el tiempo zeitgeber (ZT) 0 y el pagado a las 19:00 h definido como ZT12), criados y mantenidos en el laboratorio de medicina traslacional de la Universidad Veracruzana, en Xalapa, Veracruz, México, a temperatura ambiente ( $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ), con agua y alimento *ad libitum*. Durante dos semanas estuvieron en etapa de acondicionamiento alojados individualmente en cajas de policarbonato ( $32 \times 14 \times 13$  cm), provistas de pulpa de celulosa. Todos los procedimientos utilizados se realizaron bajo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

### *Preparación de la droga*

El tartrato de nicotina (número de catálogo N5260-25G, Sigma-Aldrich Corp) se disolvió en agua a una concentración 2.5 mg/ml (concentración obtenida previamente por una curva dosis-respuesta) y se nebulizó para animales experimentales. Los animales control se nebulizaron con agua destilada. Se expresó un volumen de 4 ml de nicotina nebulizada o agua desde el nebulizador.

### *Sistema de nebulización*

Las nebulizaciones se llevaron a cabo en cajas de policarbonato ( $37 \times 53 \times 19$  cm) divididas en seis compartimentos triangulares ( $37 \times 25 \times 19$  cm). En el centro de la caja se encuentra un tubo de policloruro de vinilo de una pulgada de diámetro x 25 cm de altura, de manera que una parte del tubo sobresale de la superficie de la caja. El tubo tiene verticalmente cuatro orificios de aproximadamente 3 mm de diámetro, separados equitativamente en el largo del tubo, de manera que el vapor se distribuya por igual en todos los compartimentos. En cada procedimiento la caja se cierra con tapas de plástico removibles, con un orificio en el centro para la salida del tubo principal. El extremo del tubo principal se conecta durante cada nebulización a la manguera del nebulizador de compresor (OMROM NE-C801KD), que

coinciden en diámetro, y se sella con papel parafina durante cada procedimiento para impedir el escape del vapor.

#### *Grupos experimentales*

Los animales se separaron al azar en dos grupos experimentales un grupo administrado con nicotina (GN n=5) y el control administrado con solución libre nicotina (GC; agua destilada).

#### *Protocolo para nebulización*

Para la identificación conductual de la actividad anticipatoria, cada sujeto fue trasladado desde la caja hospedera hasta la caja de administración. Los sujetos fueron nebulizados a las 11:00 h durante 20 min y al finalizar, fueron regresados a las cajas de alojamiento hasta el día siguiente. Se siguió este procedimiento durante 14 días, es decir, en el mismo horario, los ratones fueron rotados aleatoriamente del espacio de nebulización dentro del aparato experimental para disminuir el posible sesgo de diferencia en el espacio de nebulización por el diseño del aparato experimental.

#### *Análisis conductual por método manual*

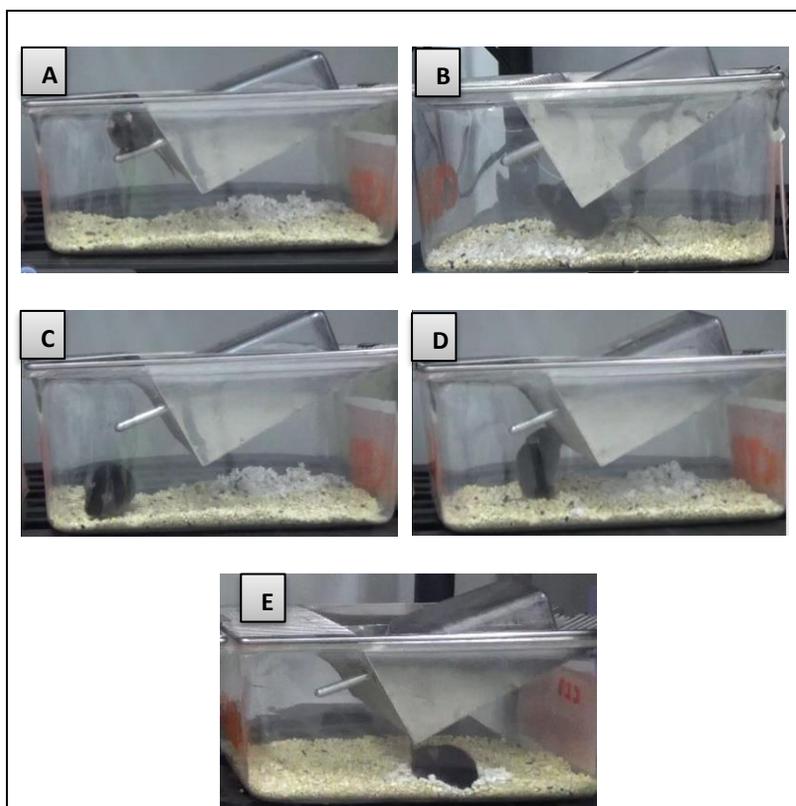
Los sujetos fueron videograbados durante los 14 días de experimentación, posteriormente para la identificación de la conducta de anticipación se analizó manualmente mediante el conteo del tiempo en que se expresan conductas de alerta (locomoción, acicalamiento, reposicionamiento, exploración y consumo de comida y agua) vs el tiempo de sueño e inmovilidad (Dailey et al., 2012), a partir de la hora previa a la nebulización.

#### *Análisis estadístico*

Las diferencias en la actividad anticipatoria entre los dos grupos se compararon mediante ANOVA de una vía para medidas repetidas seguido de la prueba pos hoc de Tukey. Se consideraron diferencias entre los grupos cuando  $p < 0.05$ , utilizando el programa estadístico Statistica 7.0 stat soft,inc. 1984-2004.

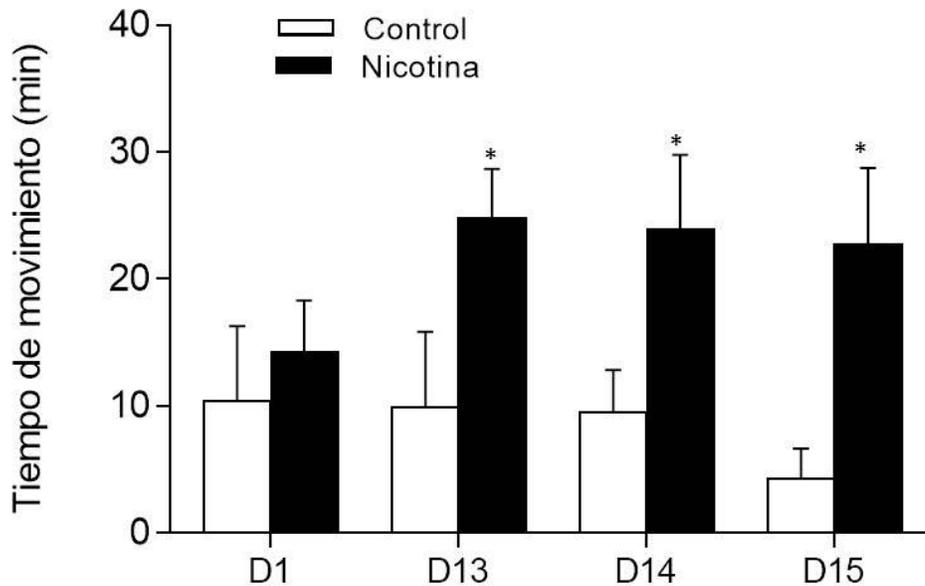
### **1. Resultados**

Para la identificación de la actividad anticipatoria (AA), se monitoreó la actividad mediante videograbaciones diarias, de las cuales se identificaron y analizaron las conductas previamente mencionadas a partir de ZT3, es decir, una hora previa a la administración de la droga. Lo anterior con base en los resultados anteriores (referencia) donde se observó la actividad anticipatoria una hora antes de la administración, para lo cual se consideraron conductas motrices y de alerta contrastándolas con el sueño e inmovilidad (Fig.1).



**Figura 1. Conductas del estado de alerta.** Panel de fotografías de algunas de las conductas consideradas para la identificación del estado de alerta; **A.** Conducta de exploración, **B.** Conducta de locomoción (desplazamiento), **C.** Conducta de acicalamiento, **D.** Conducta de ingestión de alimento y agua, **E.** Conducta de sueño e inmovilidad.

Se analizó el tiempo, en minutos, en que los animales presentaron conductas de movilidad como respuesta a un estado de alerta. El análisis estadístico muestra una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la actividad del grupo administrado con nicotina con respecto al grupo control al comparar la media del tiempo de movilidad durante los tres últimos días, a diferencia del primer día en el que el comportamiento conductual no presentó diferencias (Fig. 2). Lo cual evidencia que la administración regular de nicotina modifica la conducta del sujeto mostrando conductas de alerta como parte de la actividad anticipatoria a la droga.



**Figura 2. Actividad presentada por cada grupo durante una hora previa a la nebulización.** El modelo corresponde a un diseño unifactorial con dos niveles con medidas repetidas, el factor tratamiento incluye el grupo control y el grupo experimental nebulizados con nicotina, que fueron administrados en el tiempo, en el cual, la variable de respuesta tiempo de movimiento se expresa como la media  $\pm$  error estándar, durante el primer y últimos tres días de administración de nicotina. (\* $P = 0.008$ )

## Discusión

Tal como se ha mencionado, los ritmos circadianos parecen tener un papel importante en el consumo y adicción a las drogas, siendo la conducta de anticipación una de las observaciones sobresalientes en el estudio de las drogas como sincronizadores de estos ritmos (Keith et al., 2013). En términos generales, el significado biológico de esta conducta es permitirle al sujeto estar preparado para la llegada y así contribuir al aprovechamiento del estímulo. Por lo que esta capacidad de anticipar es desencadenada por estímulos que son necesarios para la supervivencia del individuo, como lo es el alimento, en donde mediante modelos animales se ha identificado con mayor claridad esta conducta en protocolos de alimentación restringida (Escobar et al., 2001) y en alimento apetitoso (Ángeles Castellano et al., 2007) pues en todos los casos se observa la conducta de anticipación. Sin embargo, la identificación de esta conducta ante estímulos como las drogas como la mentanfetamina, cocaína y alcohol (White et al., 2000; Rodd et al., 2004; Keith et al., 2013, Juárez Portilla et al., 2018), sugiere que más que ser un comportamiento con el único objetivo de la supervivencia, es mayormente un proceso

motivado, que en los modelos animales podemos interpretar por la necesidad de obtener el recurso que en este caso es la droga, presentando un estado de alerta que obliga al sujeto a mantenerse activo durante la etapa que debería estar en descanso, de acuerdo a su naturaleza. En este proyecto se buscó contemplar estas conductas de actividad motriz como parte de la evaluación para tener una idea más amplia del comportamiento en esta etapa y no solo el desplazamiento como se hace principalmente en los protocolos de anticipación a drogas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se identificó la conducta anticipatoria en modelo de ratón tras la administración regular de la nicotina, evidenciando la sincronización a la misma y la capacidad de esta droga de modificar la conducta normal de los sujetos como respuesta a un estado de alerta y búsqueda. Tal como reportó Gilman y colaboradores (2008) donde de igual manera identificaron la anticipación a la nicotina en un modelo animal pero con la variante de que los sujetos se mantuvieron bajo luz constante, por lo tanto no había un sincronizador externo que les indicara el periodo de actividad/descanso, por lo que nuestro trabajo logra destacar la capacidad de la droga de aumentar la actividad a pesar de encontrarse en su etapa de descanso sincronizado al ciclo de luz/oscuridad al ser animales nocturnos.

Adicionalmente en este protocolo se utilizó una vía de administración inhalatoria a diferencia de Gilman y colaboradores en donde ellos administran la droga mediante vía subcutánea, la cual presenta desventajas ante el modelo que se plantea dado que involucra una mayor manipulación del sujeto y una vía de entrada de las drogas que dista de la que es principalmente consumida en humano, que es la inhalatoria, pero se coincide que en ambos protocolos se identifica la conducta de anticipación a nicotina

Aunque está claro que la conducta adictiva es un proceso donde intervienen muchos factores, los resultados nos muestran que los horarios regulares en los que las drogas como la nicotina son consumidas, pueden tener una participación activa en la búsqueda y consumo, como respuesta a la motivación propia de estas sustancias psicoactivas.

## **Conclusión**

De acuerdo a lo observado se concluye la administración regular de drogas como la nicotina y otras drogas reportadas, tiene la capacidad de desencadenar una actividad anticipatoria denotada mediante el aumento de conductas de alerta, lo cual es un aporte para el mayor esclarecimiento de los factores que pueden estar involucrados en la conducta adictiva.