

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**EFFECTOS FARMACOLÓGICOS Y COMPORTAMENTALES DE LA  
ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE NICOTINA EN UNA TAREA DE  
AUTOMOLDEAMIENTO**

Estrella Lirdeya Campos León

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Humanas  
Departamento de Psicología  
Bogotá D.C., Colombia  
2022

**EFFECTOS FARMACOLÓGICOS Y COMPORTAMENTALES DE LA  
ADMINISTRACIÓN CRÓNICA DE NICOTINA EN UNA TAREA DE  
AUTOMOLDEAMIENTO**

Estrella Lirdeya Campos León

Tesis para optar por el título de Magíster en Psicología con énfasis en la línea:  
Efectos del estrés sobre el aprendizaje con modelos experimentales

Directora:

Marisol Lamprea Rodríguez, MSc, Ph.D.  
Universidad Nacional de Colombia

Codirector:

Leonardo Augusto Ortega Murillo, MSc, Ph.D.  
Fundación Universitaria Konrad Lorenz

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Humanas  
Departamento de Psicología  
Bogotá D.C., Colombia

2022

## Agradecimientos

A todas las personas que me acompañaron en este proceso. Especialmente a mis padres, quienes siempre me han apoyado y alentado en el proceso de alcanzar mis metas.

A Leonado Duque por acompañarme y apoyarme de manera incondicional a lo largo de los años.

A mis compañeros de laboratorio quienes me han enseñado que la ciencia es un trabajo colectivo que se nutre del intercambio constante de ideas. Especialmente a Carlos Novoa y José Solano por apoyarme y alentarme constantemente, por las discusiones que permitieron el desarrollo de este proyecto y por compartir conmigo su experiencia y conocimiento.

A la profe Marisol por su dedicación en su labor como docente y tutora, por el tiempo que destinó a apoyarme en este proceso de formación y por su pasión y rigor científico que permearon la visión que tengo ahora de la ciencia. Al profe Leonardo quien me dio la oportunidad de incursionar en el mundo de la investigación desde el pregrado y por su apoyo en el desarrollo de este proyecto.

A la Fundación Universitaria Konrad Lorenz por su apoyo y financiación a través del proyecto de investigación institucional “*Effects of chronic nicotine on autoshaping acquisition and extinction: Brain and stress-related correlates*”.

A la Universidad Nacional de Colombia por su apoyo y financiación a través de la Facultad de Ciencias Humanas – sede Bogotá con la “Convocatoria de Investigación Orlando Fals Borda – 2019 APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN DOCENTES-Facultad de Ciencias Humanas de la Universidad Nacional de Colombia.” Código FCH 47357.

## Resumen

La investigación actual ha destacado la importancia del aprendizaje asociativo en la adicción. Se ha mostrado que por medio de procedimientos pavlovianos las claves asociadas a un estímulo apetitivo como una droga pueden adquirir saliencia de incentivo, volviéndose más atractivas y facilitando comportamientos de búsqueda de droga y recaída. La asignación de saliencia de incentivo puede variar según el fenotipo de los sujetos (*goal trackers* o *sign trackers*). Aunque en ambos fenotipos el estímulo condicionado (EC) adquiere valor predictivo sobre el estímulo incondicionado (EI), solo en los *sign trackers* el EC adquiere saliencia de incentivo. Al respecto, se ha reportado que la nicotina tiene la capacidad de amplificar el valor de incentivo de claves asociadas a estímulos apetitivos como la comida o el agua. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar los efectos de la administración crónica de nicotina en la adquisición de una tarea de automoldeamiento y la expresión de FosB/DFosB en áreas relacionadas con la saliencia de incentivo. 61 ratas macho Wistar clasificadas como *sign trackers* fueron entrenadas en una tarea de automoldeamiento donde se emparejó la presentación de una palanca con la entrega de comida. Los resultados mostraron que la administración crónica tuvo un efecto de mejora temporal en el palanqueo (*sign tracking*) y el sesgo de respuesta. La nicotina crónica también aumentó la expresión de FosB/DFosB en el núcleo accumbens y la corteza orbitofrontal específicamente en ratas que se sometieron a entrenamiento conductual. Estos hallazgos sugieren que la nicotina puede potenciar los cambios plásticos mediados por el factor de transcripción FosB/DFosB en estructuras cerebrales claves para la saliencia de incentivo.

**Palabras Clave:** Nicotina crónica, Automoldeamiento, Saliencia de incentivo, FosB/DFosB, Núcleo accumbens, Corteza orbitofrontal.

## Abstract

### **Pharmacological and Behavioral Effects of Chronic Nicotine Administration on an Autoshaping Task**

Current research has highlighted the role of associative learning in addiction. Environmental cues associated through pavlovian processes with appetitive stimuli such as a drug can acquire an incentive salience value, becoming more attractive and facilitating drug-seeking behavior and relapse. The assignment of incentive salience can vary according to the phenotype of the subjects (goal trackers or sign trackers). Although for both phenotypes the conditioned stimulus (CS) can acquire predictive value over the unconditioned stimulus, only for the sign trackers the CS acquires incentive salience. Consistently, it has been reported that incentive value of cues associated with natural reinforcers such as food or water can be amplified by nicotine administration. Using 61 male Wistar rats, the present study aimed to evaluate the effects of chronic nicotine administration on the acquisition of an autoshaping task and FosB/DFosB expression in brain areas related to incentive salience. Results showed that chronic administration had a temporary enhancing effect on sign tracking and response bias. Chronic nicotine also increased FosB/DFosB expression in the nucleus accumbens and orbitofrontal cortex specifically for rats undergoing behavioral training. These findings suggest that nicotine may potentiate plastic changes mediated by the FosB/DFosB transcription factor in brain structures important for incentive salience processes.

**Key Words:** Chronic nicotine, Autoshaping, Incentive salience, FosB/DFosB, Nucleus accumbens, Orbitofrontal cortex.

## Contenido

Agradecimientos	II
Resumen	III
Abstract	IV
Contenido	V
Lista de figuras	VI
Lista de abreviaturas	VII
Marco teórico	1
Nicotina	1
Automoldeamiento	2
Circuito cerebral del automoldeamiento	5
Acciones de la nicotina sobre el refuerzo y el valor de incentivo	8
Delta FosB	10
Justificación	12
Hipótesis	14
Objetivos	15
General	15
Específicos	15
Métodos	16
Sujetos	16
Diseño	16
Instrumentos	18
Caja operante	18
Procedimiento	19
Tratamiento farmacológico	19
Implantación de mini-bombas osmóticas	19
Automoldeamiento	19
Preparación del tejido	20
Inmunohistoquímica	20

Cuantificación de la proteína DeltaFosB/FosB -----	21
Análisis de datos-----	22
Consideraciones éticas-----	23
Resultados-----	25
El entrenamiento en la tarea de automoldeamiento produjo una proporción mayor de <i>sign trackers</i> -----	25
La nicotina crónica facilita la adquisición de la tarea de automoldeamiento -----	29
La nicotina crónica aumentó la expresión de FosB/DFosB en el núcleo accumbens y la corteza orbitofrontal -----	33
Discusión -----	35
Incremento en la proporción de <i>sign trackers</i> causados por el entrenamiento en automoldeamiento-----	35
La nicotina crónica aumenta el <i>sign tracking</i> y reduce el <i>goal tracking</i> durante el entrenamiento en automoldeamiento -----	36
La exposición crónica a la nicotina durante el automoldeamiento aumentó la expresión de la proteína FosB/DFosB en áreas corticolímbicas-----	40
Consideraciones metodológicas y perspectivas futuras-----	49
Referencias-----	51
Figuras suplementarias -----	69
Anexos -----	70
Anexo 1. Independencia del fenotipo observado según el tratamiento-----	70
Chi-cuadrado -----	70
Razón de momios-----	71
Anexo 2. Pruebas T entre los grupos Control/AM y Sal/AM para las medidas comportamentales -----	73
Anexo 3. Pruebas T entre los grupos Control/AM y Sal/AM para los resultados del ensayo de inmunohistoquímica-----	79
Núcleo accumbens-----	79
Corteza orbitofrontal -----	80
Amígdala central-----	82
Amígdala basolateral-----	83
Anexo 4. Pruebas comportamentales -----	85
Número de palanqueos-----	87

---

Número de entradas a comedero -----	87
Sesgo de respuesta-----	89
Inmovilidad-----	90
Anexo 5. Ensayos de inmunohistoquímica -----	91
Núcleo accumbens-----	91
Corteza orbitofrontal -----	94
Amígdala central-----	97
Amígdala basolateral-----	99

**Lista de figuras**

Figura 1. Diseño experimental.....	17
Figura 2. Caja operante.....	18
Figura 3. Distribución de las variables del índice ACP durante el entrenamiento.....	26
Figura 4. Distribución del índice de ACP en el bloque 4.....	27
Figura 5. Distribución del índice de ACP por grupo en el bloque 4. ....	28
Figura 6. Adquisición de la tarea de automoldeamiento .....	30
Figura 7. Distribución del índice de ACP a lo largo del entrenamiento.....	32
Figura 8. Expresión de FosB/DFosB en el núcleo accumbens.....	33
Figura 9. Expresión de FosB/DFosB en la corteza orbitofrontal. ....	34

**Lista de abreviaturas**

<b>ABL</b>	Amígdala Basolateral
<b>AC</b>	Amígdala Central
<b>ACP</b>	Aproximación Condicionada Pavloviana
<b>Cdk5</b>	Quinasa dependiente de ciclina cinasa-5
<b>COF</b>	Corteza Orbitrofontal
<b>DFosB</b>	Delta FosB
<b>EC</b>	Estímulo Condicionado
<b>EI</b>	Estímulo Incondicionado
<b>FosB/DFosB</b>	FosB/Delta FosB
<b>NAc</b>	Núcleo Accumbens
<b>RsAChn</b>	Receptores Colinérgicos Nicotínicos

## Marco teórico

### Nicotina

La nicotina es el principal componente adictivo de los productos derivados del tabaco. Además, se ha descrito que es la sustancia que provoca los efectos farmacológicos asociados al uso desmedido de esos productos (Dani y De Biasi, 2001). La nicotina inicia su acción farmacológica en el cerebro uniéndose a los receptores colinérgicos nicotínicos (RsAChn) que se encuentran distribuidos a lo largo del sistema nervioso central y periférico (Picciotto et al., 2002; Gotti et al., 2009; Wills y Kenny, 2021). La mayoría de los RsAChn en el cerebro están ubicados presinápticamente y su activación aumenta la liberación de neurotransmisores (Wonnacott, 1997; Alkondon et al., 1999; McGehee et al., 1995). Por ejemplo, se ha reportado que la estimulación de los RsAChn ubicados en las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral aumentan las ráfagas de descarga de estas células contribuyendo al incremento de los niveles de dopamina, un efecto que ha sido reportado tras la administración de nicotina (Zhang et al., 2009; Balfour, 2015) y ha mostrado ser necesario para el procesamiento de la información relacionada con la recompensa (Schultz, 2007). Especialmente, las subunidades  $\alpha 4\beta 2$  y  $\alpha 7$  de los RsAChn han mostrado estar involucradas en este proceso. A pesar de que ambas subunidades exhiben una gran afinidad por la nicotina, presentan tasas de desensibilización diferentes, lo que facilita la liberación de dopamina a largo plazo (Faure et al., 2014; Wills y Kenny, 2021).

Los efectos del tratamiento crónico de nicotina han sido evaluados utilizando varios regímenes de administración entre los que se encuentran la administración oral, autoadministración intravenosa, exposición al humo de cigarrillo e infusión subcutánea. Esta última es realizada por medio de la implantación de bombas osmóticas. Las bombas osmóticas funcionan debido a una diferencia en la presión osmótica entre el compartimiento dentro de la bomba (capa osmótica) y el ambiente del tejido en el que la bomba es implantado. La alta osmolaridad de la capa osmótica hace que el líquido del ambiente fluya hacia la bomba, a medida que este entra en la capa osmótica, comprime el depósito flexible y desplaza la nicotina de la bomba a una velocidad predeterminada y

controlada (Theeuwes, 1976). La administración de nicotina vía bomba osmótica es un modelo bien establecido para estudiar los efectos de la nicotina crónica (Besheer y Bevins, 2003; Malin et al., 1992; Matta et al., 2007). Además, permite solucionar problemas asociados con otras formas de administración como equipos costosos, estrés por parte de los sujetos y efectos condicionados de la droga inducidos por inyecciones repetidas (Brynildsen et al., 2016). Sin embargo, se ha planteado que la infusión constante de la droga podría afectar los procesos de desensibilización, resensibilización (Matta et al., 2007) y regulación al alza de los RsAChn (Rowell y Li, 1997), así como los efectos sobre la transmisión dopaminérgica en el núcleo accumbens (Balfour, 2015).

### **Automoldeamiento**

El automoldeamiento es una tarea de condicionamiento pavloviano en la que una clave (estímulo condicionado, EC) es emparejada de manera repetida con la presentación de un estímulo apetitivo (estímulo incondicionado, EI) y como resultado, el EC elicitaba una respuesta condicionada (Flagel et al., 2007). Esta respuesta condicionada está caracterizada por una orientación inicial a la clave, aproximación y posterior interacción con esta (Brown y Jenkins, 1968; Hearst y Jenkins, 1974), aunque ninguna respuesta o comportamiento sean necesarios para la presentación del estímulo incondicionado (Flagel et al., 2007). Este efecto fue descrito por primera vez por Brown y Jenkins (1968), quienes expusieron palomas a emparejamientos de luz (EC) y comida (EI). Tras varias repeticiones EC-EI las palomas desarrollaron una respuesta condicionada hacia el EC en la que se acercaban y picoteaban la luz, aun cuando esta conducta no era necesaria para recibir el alimento.

El primer reporte de un comportamiento similar en ratas fue presentado por Peterson y colaboradores (1972), quienes emparejaron de manera repetida la presentación de una palanca (EC) y la presentación de comida o de estimulación cerebral (EI). A partir de esto, observaron que el grupo que recibió comida tras la presentación de la palanca presentaba una respuesta condicionada caracterizada por lamer, morder y/o presionar la palanca. El grupo que recibió estimulación cerebral también se aproximó a la palanca, pero sus respuestas casi nunca involucraban contacto oral con la palanca, por el contrario, estos sujetos olían, tocaban o exploraban la palanca cuando estaba presente. Estos autores

concluyeron que la forma de la respuesta causada por la presentación del EC dependía de la naturaleza del estímulo apetitivo asociado a este. Utilizando un paradigma similar, Boakes (1977) observó que tras el emparejamiento entre una palanca (EC) y comida (EI) un grupo de animales se acercaba e interactuaba con la palanca (*sign tracking*), mientras que otro grupo se acercaba al comedero, lugar en el que era entregada la comida, denominando esta conducta como *goal tracking*.

Estas respuestas de interacción muestran que el EC es capaz de evocar estados motivacionales y emocionales (Berridge, 2000; Cardinal et al., 2002a). Se ha planteado que esto ocurre porque el EC es atribuido con las propiedades de incentivo del EI y así, el EC adquiere saliencia de incentivo (Berridge, 2000). La interpretación moderna de la teoría de saliencia de incentivo se basa en los trabajos de Bolles, Bindra y Toates. Bolles (1972), escribió una teoría alternativa a la de reducción de impulsos para explicar fenómenos como el comportamiento estereotípico disruptivo (*misbehavior*), el automoldeamiento y la polidipsia. Este autor resaltó la importancia de las relaciones entre estímulos, argumentando que los animales hacían asociaciones entre una clave (EC) y un evento biológicamente relevante (EI). Bolles argumentó que tras asociaciones EC-EI, el EC elicitaba una expectativa hacia el EI y esta expectativa es lo que estarían aprendiendo los animales en estos fenómenos.

Posteriormente, Bindra adoptó la teoría de Bolles cuestionando que la expectativa fuera el único factor que desencadenara los comportamientos observados en la tarea de automoldeamiento. Bindra (1974, 1978) sugirió que el EC no solo causa una expectativa hacia el EI, sino que también evoca un estado central de motivación que inicialmente era causado por el EI, haciendo que el animal perciba el EC como el EI. Dependiendo de las características del EC el animal podría llegar a ejecutar comportamientos consumatorios que pueden ser similares a los elicitados por el EI. Adicionalmente, este autor menciona que estos estímulos incondicionados o con valor hedónico pueden modificar el comportamiento a través de su capacidad para reforzar o castigar el comportamiento y a través de su acción como estímulos de incentivo que inducen estados motivacionales específicos.

A partir de esto, Bindra (1978) describe 3 diferencias entre el comportamiento reforzado y la motivación de incentivo. En primer lugar, la hipótesis del comportamiento reforzado asume que la modificación de la conducta producida ante una situación/estímulo particular depende de la contigüidad entre lo que el animal estaba haciendo en esa situación y las condiciones organísmicas al momento de la presentación de algún estímulo hedónico (contingencia respuesta–reforzamiento). En comparación, hipótesis de motivación de incentivo asume que la modificación del comportamiento depende de la contigüidad entre lo que el animal estaba percibiendo ante una situación/estímulo particular y las condiciones organísmicas al momento de la presentación del estímulo hedónico (contingencia estímulo–incentivo).

En segundo lugar, hipótesis del comportamiento reforzado atribuye el aprendizaje al fortalecimiento de una conexión neuronal entre la representación central del estímulo y la representación central de la respuesta (aprendizaje estímulo-respuesta), mientras que la hipótesis de motivación de incentivo atribuye el aprendizaje al fortalecimiento de una conexión neuronal entre la representación central del estímulo que estaba siendo percibido y la representación central del estímulo hedónico (aprendizaje estímulo-estímulo).

En tercer lugar, La hipótesis de comportamiento reforzado postula que la respuesta producida en un ensayo depende de la percepción de una situación/estímulo particular. Esta situación/estímulo fortalece su conexión con una respuesta particular (la que está siendo reforzada), dando paso a esa respuesta y no a otras que podrían surgir. Por otro lado, la hipótesis de motivación de incentivo postula que la percepción de un estímulo particular genera la percepción del estímulo hedónico, generando el mismo estado central de motivación y es esto lo que determina la respuesta. Finalmente, Toates (1986) completa la teoría de saliencia de incentivo retomando el trabajo de Bolles y Bindra proponiendo que el estado fisiológico de un individuo puede modificar el valor de incentivo tanto del EC como del EI.

En contraste, la teoría moderna de incentivo define la saliencia de incentivo como las propiedades perceptuales y motivacionales de un estímulo que hacen que este atraiga la atención y sea deseado (Berridge y Robinson, 1998). Un estímulo con saliencia de incentivo tiene tres propiedades: 1) es atractivo y llama la atención, llevando a los

individuos a acercarse a él. 2) Es en sí mismo deseable, lo que implica que puede ser usado para reforzar nuevas acciones. 3) Su presencia puede elicitar estados motivacionales capaces de instigar el comportamiento de búsqueda y es capaz de vigorizar otros comportamientos (Cardinal et al., 2002a; Berridge, 2000).

En el entrenamiento de automoldeamiento se pueden observar dos fenotipos distintos de sujetos: (a) *sign trackers*, animales caracterizados como rastreadores de la clave que interactúan con el EC cuando se presenta, y (b) *goal trackers*, animales caracterizados como rastreadores de la meta que se orientan hacia el EC, pero se aproximan al lugar en el que se entrega la recompensa (Hearst y Jenkins, 1974; Boakes, 1977). Aunque tanto para los *sign trackers* como para los *goal trackers* el EC adquiere un valor predictivo sobre el EI, solo en los *sign trackers* el EC adquiere propiedades de saliencia de incentivo (Flagel et al., 2011b; Robinson et al., 2014).

Estas diferencias entre *goal trackers* y *sign trackers* podrían ser clave a la hora de entender la vulnerabilidad a la adicción, pues se ha planteado que las drogas y las claves asociadas a estas pueden adquirir un valor motivacional poco adaptativo que lleve al deseo por la droga y aumente la probabilidad de recaída, en especial en presencia de las claves (Tomie, 2018). Por ejemplo, Flagel et al. (2010) observaron que, tras emparejar la presentación de una palanca con la administración de cocaína por medio de una inyección intravenosa, los *sign trackers* presentaban un mayor número de palanqueos y menor latencia de aproximación a la palanca, en comparación con los *goal trackers*. Resultados similares muestran que los *sign trackers* tienen una mayor probabilidad de acercarse a una clave emparejada con una inyección intravenosa de cocaína o de remifentanilo y trabajan más para acceder a la clave previamente emparejada con la droga en un procedimiento de condicionamiento de segundo orden (Yager y Robinson, 2013, Yager et al., 2015).

### **Circuito cerebral del automoldeamiento**

En el estudio del automoldeamiento se han propuesto varias regiones cerebrales como responsables de la adquisición y la expresión de las respuestas condicionadas hacia el EC, aunque parece que el papel de estas áreas puede diferir dependiendo de si el animal es *goal tracker* o *sign tracker* y por tanto de la respuesta condicionada que se ejecute. Una de

estas diferencias claves parece estar relacionada con el sistema dopaminérgico. Flagel y colaboradores (2007) observaron que al inicio del entrenamiento en automoldeamiento los *sign trackers* tenían una mayor expresión de ARNm para receptores dopaminérgicos D1 en el núcleo accumbens, en comparación con los *goal trackers*. Por el contrario, en etapas más avanzadas del entrenamiento los *goal trackers* presentaron niveles más altos de ARNm para el transportador de dopamina, tirosina hidroxilasa y receptores dopaminérgicos D2 en comparación con los *sign trackers*, sugiriendo que el desarrollo de la respuesta de *sign* o *goal tracking* provoca adaptaciones diferenciales en el sistema dopaminérgico. Adicionalmente, se han registrado aumentos en la liberación de dopamina evocada por la presentación de una clave en los sujetos clasificados como *sign trackers*, pero no en los *goal trackers* (Flagel et al., 2011b). En este sentido, se ha mostrado que la adquisición de *sign tracking* depende de la transmisión dopaminérgica del área *core* del núcleo accumbens (Flagel et al., 2011b; Fraser y Janak, 2017), así como del adecuado funcionamiento de los receptores dopaminérgicos D1 (Clark et al., 2013, Macpherson e Hikida, 2018).

Aunque ha sido ampliamente resaltado el papel del núcleo accumbens en la adquisición de respuestas condicionadas (Day et al., 2007), otras investigaciones han mostrado que esta área es clave también para la expresión de estas respuestas. Por ejemplo, Parkinson et al. (1999) observaron una disminución en el comportamiento previamente adquirido de aproximación condicionada al EC, tras lesionar a los sujetos en el núcleo accumbens. Resultados similares fueron encontrados por Cardinal y colaboradores (2002b), quienes mostraron que una lesión selectiva de la región *core* del núcleo accumbens produjo un decremento en la aproximación al EC.

Otra estructura que ha sido investigada en el paradigma de automoldeamiento es la corteza orbitofrontal. Esta estructura ha mostrado ser necesaria para las asociaciones pavlovianas estímulo-respuesta, incluyendo la respuesta de aproximación condicionada, aunque se resalta su papel principalmente en la expresión de estas respuestas una vez han sido aprendidas. Chudasama y Robbins (2003) mostraron que lesiones en la corteza orbitofrontal dificultan la adquisición de la respuesta de aproximación hacia el EC. Contrario a esto, Gallagher y colaboradores (1999) reportaron que lesionar esta área no afectó la adquisición de la respuesta condicionada de acercamiento hacia una luz

emparejada con comida, pero si causó déficits en el ajuste de la respuesta condicionada después de que el EI fue devaluado. Resultados similares fueron encontrados por Chang (2014), quien utilizó un procedimiento de automoldeamiento con dos palancas, una que predecía la entrega de comida (EC+) y otra que no predecía la ausencia de comida (EC-). Chang no observó dificultades en la adquisición de la respuesta de *sign tracking* hacia el EC+, pero si reportó que los sujetos lesionados presentaban problemas a la hora de ajustar su comportamiento después de haber sido sometidos a un procedimiento de aprendizaje reverso en el que se cambió la contingencia de las palancas. Más recientemente, Stringfield y colaboradores (2017) observaron que la inactivación de la corteza orbitofrontal después de la adquisición del automoldeamiento disminuyó el comportamiento de *sign tracking*.

De manera complementaria, ha sido de particular interés conocer el papel de la amígdala en el área del aprendizaje asociativo y la atribución de saliencia de incentivo. Esta estructura puede ser dividida en dos subregiones, la amígdala central y la amígdala basolateral. La información respecto a la amígdala central en este paradigma no es concluyente. Por un lado, se ha reportado que lesionar esta estructura impide la adquisición, pero no la expresión de la respuesta condicionada de aproximación hacia un estímulo visual (Parkinson et al., 2000; Cardinal et al., 2002b). No obstante, Hall y colaboradores (2001) no observaron efectos de lesión en la adquisición de la respuesta condicionada de entrada al comedero. En este sentido, Chang y colaboradores (2012a) y Naeem y White (2016) mostraron que lesiones en esta estructura no causaron efectos sobre la respuesta condicionada de palanqueo.

En cuanto a la amígdala basolateral, se ha reportado que esta estructura no es necesaria para la adquisición de respuestas condicionadas en un paradigma de automoldeamiento (Hatfield et al., 1996; Parkinson et al., 2000; Hall et al., 2001; Blundell et al., 2003). No obstante, parece estar involucrada en la expresión de estas respuestas. En este sentido, Chang y colaboradores (2012b) reportaron que la lesión de esta estructura produce un déficit en el *sign tracking* después de que la conducta es adquirida. De manera complementaria, se ha observado que la exposición a una clave previamente asociada con un estímulo apetitivo de tipo alimenticio produjo aumentos en la expresión de la proteína

Fos en esta estructura en los *sign trackers* en comparación con los *goal trackers* (Yager y Robinson, 2015).

### **Acciones de la nicotina sobre el refuerzo y el valor de incentivo**

Se ha planteado que la nicotina tiene un papel de reforzador primario en sí mismo, así como de potenciador de reforzadores condicionados asociados a la droga (Caggiula et al., 2009). La investigación preclínica que utiliza modelos animales ha mostrado que la administración intravenosa de nicotina puede mantener el comportamiento de autoadministración en roedores (Corrigall y Coen, 1989; Donny et al., 1995), mostrando así que la nicotina posee propiedades reforzantes. En este sentido, también se ha observado que la administración de nicotina puede producir preferencia condicionada de lugar dependiendo de la dosis (Fudala e Iwamoto, 1986). Por otro lado, se ha reportado que la nicotina tiene la capacidad de “asignar” propiedades reforzantes a los estímulos condicionados asociados con la administración de la droga. Palmatier y colaboradores (2007) sometieron animales a un procedimiento de autoadministración, en el que meter la nariz en un hueco daba acceso a los sujetos a una infusión de nicotina o salina y a la presentación de una luz (EC). Posteriormente hicieron una prueba de condicionamiento en la que responder a una palanca daba acceso a la presentación del EC. Se observó que el grupo que había sido tratado con nicotina tuvo un mayor número de respuestas de palanqueo, mostrando que la nicotina es capaz de establecer un reforzador condicionado.

Además de esto, se ha planteado que la nicotina es capaz de aumentar el valor de incentivo de otros reforzadores. Palmatier y colaboradores (2006) observaron en una tarea de condicionamiento instrumental que los animales palanqueaban más para tener acceso a un estímulo visual, que para recibir una infusión de nicotina. De manera interesante, el número de respuestas era aún más alto para cuando la consecuencia era la presentación conjunta de ambos reforzadores (nicotina + estímulo visual), lo que sugiere que la nicotina tiene un efecto potenciador sobre otros reforzadores. Resultados similares fueron reportados por Schaefer y Michael (1986), quienes observaron que la administración de nicotina aumentó la tasa de respuesta de palanqueo para recibir estimulación intracraneal.

Más recientemente, se ha planteado que la nicotina puede potenciar la saliencia de incentivo de claves asociadas a estímulos apetitivos no relacionados con la droga (Palmatier et al., 2013). Curiosamente, la nicotina parece amplificar las propiedades de incentivo de los estímulos asociados a la recompensa cuando se administra antes del entrenamiento. Por ejemplo, Olausson y colaboradores (2003) informaron que el pretratamiento con nicotina aumentó el número de entradas al comedero durante la presentación de un estímulo condicionado que predecía la disponibilidad de agua. La administración de nicotina se ha relacionado con una mejora en la adquisición de una respuesta operante para estímulos previamente asociados con una recompensa no farmacológica (Olausson et al., 2004a), efecto que se mantuvo después de dos semanas de abstinencia de nicotina (Olausson et al., 2004b). Esta evidencia respalda la noción de que la nicotina podría mejorar las propiedades de incentivo de las señales asociadas a drogas y no drogas además de sus efectos de recompensa primarios.

Investigaciones previas han mostrado que el pretratamiento con nicotina aumentó el comportamiento de *sign tracking* hacia un EC emparejado con sacarosa (Palmatier et al., 2013). De igual forma, Versaggi y colaboradores (2016) mostraron que la administración no contingente de nicotina aumentó el número de contactos con la palanca, pero no las entradas al comedero, en un paradigma clásico de automoldeamiento en el que se emparejó una palanca (EC) con la presentación de comida (EI). En ambos experimentos la nicotina fue administrada por medio de inyecciones subcutáneas 15 minutos antes de cada sesión de entrenamiento. Resultados similares fueron obtenidos por Overby y colaboradores (2018) utilizando un método de administración activo de nicotina. Para esto, entrenaron a los sujetos experimentales en una tarea de automoldeamiento por 28 días y posteriormente los sometieron a una cirugía de implantación de cánula para llevar a cabo un procedimiento de autoadministración de nicotina o salina en la mañana y la tarea de automoldeamiento en la tarde. En los resultados se observó un aumento en la conducta de *sign tracking* de los animales del grupo nicotina, en comparación con los del grupo salina, cuatro días después de haber iniciado el procedimiento de autoadministración. Mostrando así, que el efecto potenciador de la nicotina sobre la saliencia de incentivo se generaliza a diferentes vías de administración. En conjunto, todo lo anteriormente mencionado da cuenta del efecto

potenciador de la administración no contingente de nicotina sobre la saliencia de incentivo de claves asociadas a estímulos apetitivos no relacionados con la droga.

### **Delta FosB**

Las teorías del trastorno por uso de sustancias permiten sugerir que los efectos conductuales de la nicotina como amplificador de las propiedades de incentivo de las recompensas y los estímulos asociados a las recompensas implicarían cambios a largo plazo en los circuitos cerebrales (Di Chiara et al., 1992; Robinson y Berridge, 1993). La evidencia de la expresión génica después de la exposición aguda y crónica al fármaco es fundamental para estas teorías. Estos cambios involucran varios factores de transcripción de la familia Fos, como la proteína FosB y su variante D truncada que se acumula significativamente después de la exposición repetida al fármaco (Nestler et al., 2001). La proteína FosB es un factor de transcripción codificado por el gen FOS (Morgan y Curran, 1995) que se heterodimeriza con los miembros de la familia de proteínas Jun formando el complejo de la proteína activadora 1 (AP-1), que se une a los sitios AP-1 de la secuencia del promotor, causando así la expresión o represión de genes particulares (Nestler et al., 2001). La variable DFosB, una forma truncada de FosB cuya expresión depende de la activación de los receptores dopaminérgicos de tipo D1 (Zhang et al., 2002; Muller y Unterwald, 2005), es altamente estable y se acumula de manera significativa con la exposición repetida a drogas de abuso (Chen et al., 1997; Kelz et al., 1999; Kelz y Nestler, 2000; Ehrlich et al., 2002; Marttila et al., 2006). Según se ha reportado, las isoformas de DFosB que se acumulan tras la exposición crónica a drogas muestran una masa molecular de 35 – 37 kDa (Nestler et al., 2001). Estas isoformas son altamente estables y presentan una vida media más larga que la del FosB (9.5 horas), aunque la vida media de estas varía de acuerdo con su peso molecular. Por ejemplo, la proteína de 35 kDa tiene una vida media de 28 horas, mientras que la de 37 kDa tiene una vida media de 208 horas (Chen et al., 1997).

Esas características son consistentes con la propuesta de que las variaciones en la expresión de DFosB podrían mediar alteraciones a largo plazo en la morfología neuronal, la estructura sináptica y los comportamientos relacionados con el consumo repetido de drogas

(Nestler et al., 2001). Algunos genes diana de DFosB incluyen la subunidad del receptor AMPA GluR2, el péptido opioide dinorfina, el factor de transcripción nuclear factor- $\kappa$ B y la proteína quinasa dependiente de ciclina cinasa-5 (Cdk5) (Nestler, 2008; Ruffle, 2014), lo que sugiere que DFosB tiene un papel fundamental en los mecanismos de recompensa de fármacos al mejorar o reprimir la expresión de otros genes.

El núcleo accumbens ha sido un área de interés para la investigación sobre los efectos de la nicotina en la expresión de los factores de transcripción pertenecientes a la familia Fos. Un informe temprano de Pich y colaboradores (1997) demostró que la autoadministración repetida de nicotina producía un aumento en un antígeno relacionado con Fos de 35 kD (kilodaltons, peso molecular asociado al DFosB), así como aumentos en la unión de AP-1 en la corteza prefrontal y NAc. Posteriormente, Soderstrom et al. (2007) reportaron que la administración repetida de nicotina produjo una mejora en la expresión de la forma de vida prolongada de FosB en el NAc que duró hasta 37 días después de la última inyección. No obstante, los cambios en la expresión de este factor de transcripción relacionados con la administración de nicotina en otras áreas del cerebro han sido menos explorados.

## **Justificación**

El papel potenciador de la nicotina sobre la adquisición de saliencia de incentivo de claves asociadas a estímulos apetitivos de tipo alimenticio ha sido ampliamente estudiado (Olausson et al., 2003, Palmatier et al, 2013; Versaggi et al., 2016; Overby et al., 2018; Stringfield et al, 2019). Sin embargo, este efecto no ha sido del todo comprendido, dado que no es claro cómo la nicotina podría afectar estos procesos en una subpoblación específica de animales como los *sign trackers*, quienes de por sí ya atribuyen saliencia de incentivo al EC (Flagel et al., 2011b). Esta población de sujetos parece ser más vulnerable a la adicción, pues se ha planteado que las drogas y las claves asociadas a estas pueden adquirir un valor motivacional poco adaptativa que lleve al deseo por la droga y aumente la probabilidad de recaída, en especial en presencia de las claves (Tomie, 2018). El estudio de estas variables podría contribuir a comprender los mecanismos cerebrales asociados con el fenómeno de la adicción.

Adicionalmente, aunque se ha establecido que la nicotina facilita procesos de plasticidad neural importantes para el aprendizaje y la memoria (Fujii et al., 1999) y se ha descrito un circuito involucrado en la atribución de saliencia de incentivo (Flagel et al, 2011a), no es del todo claro qué estructuras están siendo parte de este proceso de potenciación de la saliencia de incentivo, ni el mecanismo por medio del cual la nicotina estaría ejerciendo estos cambios.

Esta investigación se enmarca en uno de los problemas de salud pública más importantes de la actualidad. La adicción al tabaco es uno de los mayores problemas de salud prevenibles a nivel mundial, especialmente en los países en vía de desarrollo (Pichon-Riviere et al., 2020). El presente estudio acerca de cómo la nicotina modifica la asignación de incentivo de las claves asociadas a un estímulo no asociado con la droga en *sign trackers*, podría contribuir a entender el papel de la nicotina en el establecimiento de relaciones asociativas entre otras drogas y claves ambientales. Por ejemplo, se ha planeado que la nicotina es una droga de entrada que facilita el consumo de marihuana y cocaína (Kandel y Kandel, 2014). Al respecto, se ha mostrado que el tratamiento previo con

nicotina potencia el efecto de sensibilización locomotriz causado por la cocaína, además de aumentar la preferencia condicionada de lugar por un compartimiento asociado con cocaína (Levine et al., 2011). De igual manera, se ha reportado que el tratamiento crónico con nicotina produce incrementos en la autoadministración de drogas como la metanfetamina, el alcohol y la cocaína (Dao et al., 2011). Así, es posible que los resultados del presente estudio puedan contribuir a la comprensión del circuito cerebral involucrado en el fenómeno de la nicotina como droga de entrada.

## Hipótesis

Considerando que la exposición crónica a la nicotina ha mostrado incrementar la saliencia de incentivo de claves asociadas a estímulos apetitivos de tipo alimenticio y a que todos los sujetos utilizados son *sign trackers*, se espera que el tratamiento crónico incremente la saliencia de incentivo hacia el estímulo condicionado, evidenciada por incrementos en la conducta de palanqueo (*sign tracking*) y un mayor sesgo hacia la palanca. Adicionalmente, aunque no es claro el efecto de la nicotina sobre las respuestas de *goal tracking* (Palmatier et al., 2013; Versaggi et al., 2016; Stringfield et al., 2017, 2019; Overby et al., 2018), se espera que el tratamiento con nicotina disminuya estas respuestas, evidenciado en la respuesta de entradas a comedero.

Por otro lado, teniendo en cuenta que tanto la exposición crónica a la nicotina, como la saliencia de incentivo producen cambios plásticos en diferentes regiones del cerebro (Pich et al., 1997; Marttila et al., 2006; Flagel et al., 2011a; Yager y Robinson, 2015), se espera encontrar una mayor expresión de la proteína FosB/DFosB en el grupo tratado con salina que fue expuesto a la tarea y en el grupo que recibió únicamente nicotina, en comparación con el grupo control. Además, se espera que la acción conjunta del tratamiento y la tarea incremente aún más los niveles de expresión de esta proteína, principalmente en estructuras que están ampliamente implicadas en el proceso de asignación de incentivo como el núcleo accumbens y la corteza orbitofrontal.

## Objetivos

### General

Determinar el efecto de la administración crónica no contingente de nicotina en la asignación de saliencia de incentivo de una clave asociada con un estímulo apetitivo de tipo alimenticio en animales clasificados como *sign trackers* y conocer las áreas cerebrales involucradas en dicho proceso.

### Específicos

- Evaluar el efecto de la administración crónica de nicotina en la adquisición de la tarea de automoldeamiento.
- Evaluar el efecto de la administración crónica en la expresión de la proteína FosB/DFosB en distintas áreas del cerebro.
- Evaluar el efecto del entrenamiento en automoldeamiento en la expresión de la proteína FosB/DFosB en distintas áreas del cerebro.
- Evaluar el efecto conjunto de la administración crónica y el entrenamiento en automoldeamiento en la expresión de la proteína FosB/DFosB en distintas áreas del cerebro.

## Métodos

### Sujetos

94 ratas macho de la cepa Wistar de entre once y doce semanas de edad fueron suministradas por el Instituto Nacional de Salud en Bogotá D.C. Los sujetos fueron alojados individualmente en cajas de polietileno (40.5 x 23.5 x 19.5, largo x ancho x alto) con encamado de viruta de madera cambiado periódicamente (cada dos días), y se mantuvieron bajo condiciones controladas de humedad ( $40 \pm 10\%$ ), temperatura ( $21 \pm 3^\circ\text{C}$ ), luz bajo un ciclo luz:oscuridad de 12:12h (inicio 7:00am) y agua *ad libitum*.

Durante su permanencia en el laboratorio los animales fueron sometidos a un protocolo de privación alimenticia. Previo al inicio del protocolo, se estableció una línea base utilizando como referencia los pesos de dos días donde los sujetos tuvieron libre acceso a agua y comida. Posteriormente, se llevó a cabo la fase de preparación en la que los animales era alimentados una vez al día y las porciones de comida se disminuyeron de manera progresiva hasta llegar a 10 gr. Finalmente, se inició el protocolo de privación en el que se calculó el 85% del peso obtenido en la línea base para establecer la cantidad de alimento (gramos) a suministrar diariamente. La entrega del alimento se hizo al menos 20 minutos después del final de cada sesión experimental.

### Diseño

Para este estudio fue propuesto un diseño experimental en el que se evaluaron los efectos comportamentales de la administración crónica de nicotina en la adquisición de una tarea de automoldeamiento (Figura1). Para esto, se implementó un diseño experimental en el que todos los animales fueron entrenados en la tarea de automoldeamiento (AM) y del cual se derivaron los grupos: Sal/AM: animales que recibieron tratamiento crónico con solución salina (n=26); Nic/AM: animales que recibieron tratamiento crónico con nicotina (n=29). Un grupo adicional fue incluido como control con el fin de evaluar el impacto de la implantación de la bomba en la adquisición de la tarea de automoldeamiento; Control/AM: animales que no tuvieron implantación de bomba, pero sí fueron entrenados en la tarea

(n=6). Las variables dependientes analizadas para la tarea de automoldeamiento fueron: número de entradas a comedero, número de palanqueos, sesgo de respuesta y episodios de congelamiento.



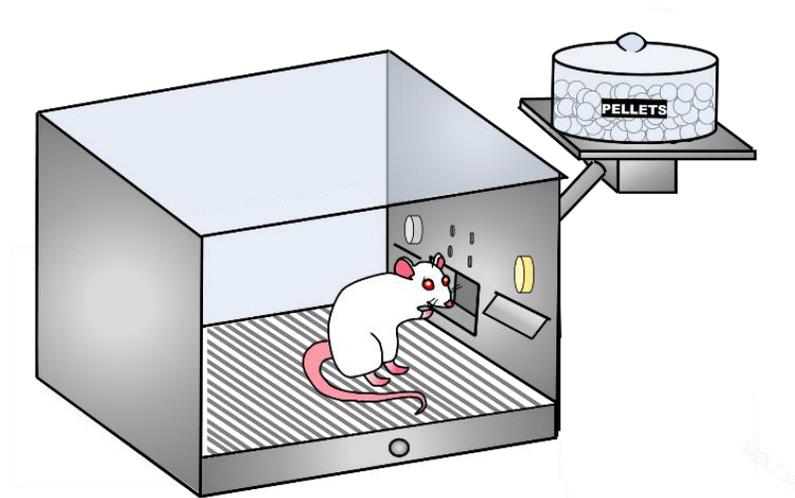
**Figura 1. Diseño experimental.** Esquema experimental. Se señalan los días transcurridos desde el inicio del experimento comenzando con el registro de línea base (LB) y el periodo de preparación para la privación, que es transversal a la cirugía (Cx) y el periodo de recuperación (Rec). También se señala el inicio de la tarea de automoldeamiento que concuerda con el inicio del protocolo de privación. En el día 25 se llevó a cabo la última sesión experimental y se tomaron las muestras de tejido cerebral.

Con el objetivo de relacionar los efectos observados en el comportamiento tras la administración crónica de nicotina con la actividad transcripcional en regiones específicas del cerebro, se cuantificó la expresión de la proteína FosB/DeltaFosB (FosB/DFosB) utilizando un diseño experimental de dos factores, tratamiento farmacológico y entrenamiento en la tarea de automoldeamiento. Para esto, se incluyó un subgrupo de animales que fueron seleccionados de manera aleatoria de los grupos Control/AM (n=4), Sal/AM (n=6) y Nic/AM (n=6). Dos grupos adicionales fueron incluidos como control para evaluar el efecto del tratamiento farmacológico en la expresión de FosB/DFosB: Sal: animales que recibieron tratamiento crónico con solución salina pero no fueron sometidos a la tarea de automoldeamiento (n=4); Nic: animales que recibieron tratamiento crónico con nicotina, pero no fueron sometidos a la tarea de automoldeamiento (n=4). Un último grupo control fue incluido con el objetivo de cuantificar la expresión de FosB/DFosB en sujetos sin manipulación alguna: Control: animales que no tuvieron implantación de bomba ni fueron sometidos a la tarea de automoldeamiento (n=4).

## Instrumentos

### Caja operante

Los sujetos fueron entrenados en dos cajas de condicionamiento operante (32 cm x 25 x 25 cm, largo x alto x ancho), conformadas por una rejilla de acero ubicada sobre una bandeja, un dispensador automático circular de *pellets* de comida de 45-mg (Bio-Serv #F0021, Flemington, NJ), un generador de estímulo de sonido, dos palancas retráctil de presión estándar para rata, un comedero y un generador de luz ambiente (Figura 2); el comedero fue ubicado en la pared derecha de la caja operante a 2 cm de la rejilla y las palancas estaban ubicadas 1 cm a la derecha o a la izquierda del comedero y 7 cm arriba del suelo. Cada palanca media 4.8 cm de ancho y requería de una fuerza de aproximadamente 0.2 N para ser operadas.



**Figura 1. Caja operante.** Vista frontal de la caja operante; se representa la disposición de los elementos que configuran la caja operante y con los que el sujeto puede interactuar durante la sesión experimental.

Las cajas fueron programadas con el software MED que permitía la aparición de la palanca en la caja operante y la liberación de los pellets, además de registrar los datos de frecuencia de presión de la palanca y número de entradas al comedero durante el tiempo en el que la palanca estuvo disponible en la caja operante. Cada sesión experimental fue grabada con el software *Video Fear Conditioning System* (MED Associates Inc., 2017) por

medio de una cámara de video ubicada en la cara interna de la puerta exterior izquierda de la caja operante; el software además registró la duración de los episodios de inmovilidad.

## **Procedimiento**

### **Tratamiento farmacológico**

Los animales recibieron nicotina de forma continua durante todo el experimento por medio de mini-bombas osmóticas (Modelo 2ML4, tasa de bombeo de 2.5  $\mu$ l por hora y 28 días de duración; ALZET, Cupertino, CA). Cada mini-bomba osmótica fue llenada con solución salina o tartrato de hidrógeno de nicotina 3.6 mg/kg/día (dosis reportada como base libre). La dosis fue seleccionada para modelar el estado de dependencia a la nicotina observado en fumadores regulares y fumadores excesivos (Murrin et al., 1987; Kolokotroni et al., 2012).

### **Implantación de mini-bombas osmóticas**

Los animales de los grupos experimentales Veh, Nic, Veh/AM y Nic fueron anestesiados con Ketamina (50 mg/kg) y Xilacina (4 mg/kg). Una vez anestesiados, se realizó una incisión dorsal (2 cm) en la piel a través de la cual se implantó la mini-bomba osmótica en el espacio caudal de manera paralela a la espina. Posteriormente, la incisión fue suturada. Se utilizó Lidocaína (1 ml) como anestésico local, Meloxicam (5 mg/kg) por vía subcutánea como analgésico y solución salina por la misma vía como hidratante. Los animales permanecieron en recuperación en sus cajas de alojamiento por un periodo de cinco días antes de iniciar el entrenamiento comportamental.

### **Automoldeamiento**

Cinco días después de haber realizado el implante de la mini-bomba se inició el entrenamiento de automoldeamiento, el cual consistía en una sesión diaria de emparejamientos palanca - comida por 12 días consecutivos. Antes de cada sesión los animales eran llevados en sus cajas de alojamiento desde el bioterio hasta la cabina experimental, que estaba iluminada por un bombillo de luz roja. Allí, los sujetos eran

ingresados en la caja operante donde se quedaban a oscuras hasta que el experimentador programaba la sesión experimental que estaba compuesta por 10 ensayos con un intervalo variable entre ensayos de 90 s en promedio (rango de 60 a 120 s). El inicio de la sesión era señalizado con el encendido de la luz ambiente de la caja operante y después de 90 s ocurría el primer ensayo. Cada ensayo empezaba con la aparición de la palanca por un periodo de 10 s, una vez pasado este tiempo la palanca era retraída e inmediatamente se liberaban 5 *pellets* de comida. La liberación de los *pellets* era automática y, por tanto, no era contingente con la conducta del animal. Noventa segundos después de haber terminado el décimo ensayo la luz ambiente de la caja operante se apagaba dando fin a la sesión experimental. Finalmente, los sujetos eran devueltos a sus cajas de alojamiento y transportados nuevamente al bioterio.

### **Preparación del tejido**

Noventa minutos después de la última sesión de automoldeamiento, los sujetos fueron profundamente anestesiados con una inyección intraperitoneal de uretano (1.25 g/kg) y fueron perfundidos de manera transcardiaca inmediatamente con 100 ml de PBS 0.01 M, seguidos de 100 mL de solución de paraformaldehído (4 g/mL) preparada en PBS 0.01M. Al completar la perfusión los cerebros de los animales fueron extraídos y almacenados bajo refrigeración. Los cerebros fueron fijados en paraformaldehído (4 g/mL) durante 72 h, posteriormente fueron sumergidos en una solución crioprotectora de sacarosa (25 g/mL) preparada en PBS 0.01 M durante 72 h y finalmente, se congelaron por inmersión en isopentano a -70 °C. Los cerebros fueron seccionados coronalmente en rodajas de 30 µm, con un criostato Leica CM1850. Las rodajas de tejido cerebral se almacenaron a -20°C en solución anticongelante para su posterior procesamiento por medio de un ensayo de inmunohistoquímica.

### **Inmunohistoquímica**

Para realizar el ensayo se escogieron cuatro cortes por sujeto, correspondientes a las coordenadas anteroposteriores: 4.20, 3.24, 1.80, y -2.40 mm respecto a bregma, según la descripción anatómica de Paxinos y Watson (2007). Las secciones se procesaron en

flotación libre utilizando un método de peroxidasa biotinilada con avidina. El primer día, las rodajas de cerebro se incubaron en una solución de peróxido de hidrógeno al 1% y etanol al 3% durante 20 minutos para inhibir la peroxidasa endógena y se lavaron con PBS 0.01M + 0.05% Triton X- 100 (PBS-T). Adicionalmente, las uniones inespecíficas fueron bloqueadas incubando las rodajas por 1 h en una solución de PBS-T, suero normal de caballo al 2,5% y gelatina al 2%. La marcación de proteínas se hizo con el anticuerpo primario conejo-anti-FosB (AB 184938) en una dilución de 1:20000 durante una noche a temperatura ambiente.

El segundo día, el anticuerpo primario se lavó con PBS-T y las secciones se incubaron durante 2 h en anticuerpo secundario biotinilado caballo-anti-conejo (Vector Labs - BA-1100) en una dilución de 1:500. Posteriormente, los tejidos se lavaron con PBS y se incubaron con solución ABC por 2 h (Vectastain PK-6100). La actividad de peroxidasa se reveló mediante el uso de cromógeno de diaminobencidina intensificado con cloruro de níquel (Vector SK-4100). Finalmente, las rodajas fueron montadas en portaobjetos recubiertos de gel y cubiertas con un cubreobjetos.

### **Cuantificación de la proteína DeltaFosB/FosB**

Las láminas se observaron utilizando un microscopio de transmisión de luz Zeiss Axiostar Plus con cámara digital Zeiss (AxioCam ERc5s); se ubicó la región cerebral de interés y se tomó una foto por cada hemisferio utilizando un lente de aumento de 20x para las estructuras escogidas. Para la corteza orbitofrontal, las fotografías fueron tomadas de la corteza orbital medial (bregma 4.2 mm), de la corteza lateral orbital y de la corteza insular ventral (bregma 3.2 mm); la cuantificación se hizo promediando el número de células marcadas en todas regiones para cada sujeto. Para el núcleo accumbens las fotografías fueron tomadas en la coordenada 1.8 respecto a bregma; la cuantificación en el núcleo accumbens se hizo promediando el número de células marcadas en las regiones *core* y *shell* para cada sujeto. Para la amígdala basolateral y la amígdala central, las fotografías fueron tomadas en la coordenada -2.4 respecto a bregma.

Los puntos representativos seleccionados para cada área fueron similares en todas las muestras y se utilizaron los mismos parámetros para todos los sujetos. La cuantificación

de las células inmunopositivas para DeltaFosB/FosB se realizó utilizando las herramientas “*Threshold*” y “*Analyze Particles*” del programa ImageJ.

### **Análisis de datos**

Inicialmente, los datos fueron inspeccionados utilizando estadística descriptiva con el objetivo observar la distribución de los sujetos en el índice de aproximación condicionada pavloviana (ACP). Para esto, se observó la distribución de los animales en las variables: (a) sesgo de respuesta: proporción entre el número de presiones de palanca y el número de entradas a comedero, en relación con el número total de respuestas (palanqueos – entradas al comedero) / (palanqueos + entradas al comedero); (b) diferencia de probabilidad: probabilidad de presionar la palanca o de entrar al comedero durante cada ensayo, definida como el número de ensayos donde hubo al menos una presión de palanca o entrada al comedero, dividido entre el total de ensayos por sesión. La medida fue tomada restando la probabilidad de presión de la palanca de la probabilidad de entrar al comedero ( $p| \text{presión palanca} - p| \text{entrar al comedero}$ ) ( $p| = \text{probabilidad}$ ).

Con el fin de clasificar los animales según su fenotipo, se utilizó una modificación del índice de aproximación condicionada pavloviana (ACP) (Yager y Robinson, 2015). El índice de ACP se calculó con el puntaje obtenido en el último bloque utilizando la fórmula:  $[(\text{sesgo de respuesta} + \text{diferencia de probabilidad}) / 2]$ . Los puntajes de 0.3 a 1.0 fueron clasificados como *sign trackers*, mientras que los puntajes de -0.3 a -1.0 fueron clasificados como *goal trackers* y los puntajes de -0.3 a 0.3 fueron clasificados como intermedios. Debido al bajo número de animales clasificados como *goal trackers* e intermedios, se utilizaron únicamente los *sign trackers* para el análisis comportamental y la cuantificación de FosB/DeltaFosB. Adicionalmente, con el fin de establecer si la clasificación de los sujetos difería de acuerdo con el tratamiento al que fueron expuestos se utilizó una prueba de independencia de chi-cuadrado y el estadístico de razón de momios.

Para los análisis comportamentales se tuvieron en cuenta las siguientes variables: (a) palanqueo: número de presiones de palanca (promedio por ensayo); (b) número de entradas al comedero: número de veces que el sujeto mete la cabeza en el comedero e interrumpe el paso de un láser (promedio por ensayo); (c) sesgo de respuesta:

proporción entre el número de presiones de palanca y el número de entradas a comedero, en relación con el número total de respuestas (palanqueos – entradas al comedero) / (palanqueos + entradas al comedero) (promedio por ensayo); (d) episodios de inmovilidad: número de veces en las que el sujeto permaneció estático por un periodo de mínimo 1 segundo (promedio por ensayo).

Los análisis comportamentales se hicieron utilizando dos análisis no paramétricos complementarios, un ANOVA repetido de dos vías por rangos no paramétrico, debido a que el conjunto de datos no cumple con los supuestos de normalidad. Este análisis fue seguido de pruebas *post-hoc* por el método de Bonferroni. Cuando el ANOVA no mostró diferencias entre grupos se llevaron a cabo comparaciones planeadas corregidas.

Los análisis de la cuantificación de células inmunopositivas para FosB/DeltaFosB se hicieron utilizando un análisis de varianza de un solo factor, con el fin de evaluar los efectos de la nicotina y la tarea comportamental en la expresión de la proteína de interés en las estructuras escogidas analizando las diferencias entre los grupos Control, Control/AS, Sal/AM, Nic/AM, Sal. Este análisis fue seguido de pruebas *post-hoc* por el método HSD de Tukey. En los análisis en los que no se cumplió con alguno de los supuestos estadísticos se utilizó un ANOVA de Welch. Los supuestos de normalidad fueron evaluados con la prueba Shapiro-Wilk y la homocedasticidad con la prueba de igualdad de Levene. En todos los casos, los datos se presentan como medias  $\pm$  SEM y el nivel de significancia se estableció en  $\alpha = 0.05$ . Los datos fueron analizados utilizando el software R (librerías: rstatics, WRS, WRS2) y SPSS.

### **Consideraciones éticas**

Los procedimientos experimentales que se siguieron en este proyecto, así como las condiciones de alojamiento y el manejo de residuos biológicos y químicos, se realizaron atendiendo a las normativas nacionales pertinentes: a) Resolución No 008430 de 1993, proferida por el Ministerio de Salud de la República de Colombia; b) Ley 1090 de 2006, especialmente por la disposición general N°10 y el capítulo VII de la investigación científica, la propiedad intelectual y las publicaciones. De acuerdo con esto se veló por el bienestar de los sujetos experimentales, utilizando el menor número de animales posible y

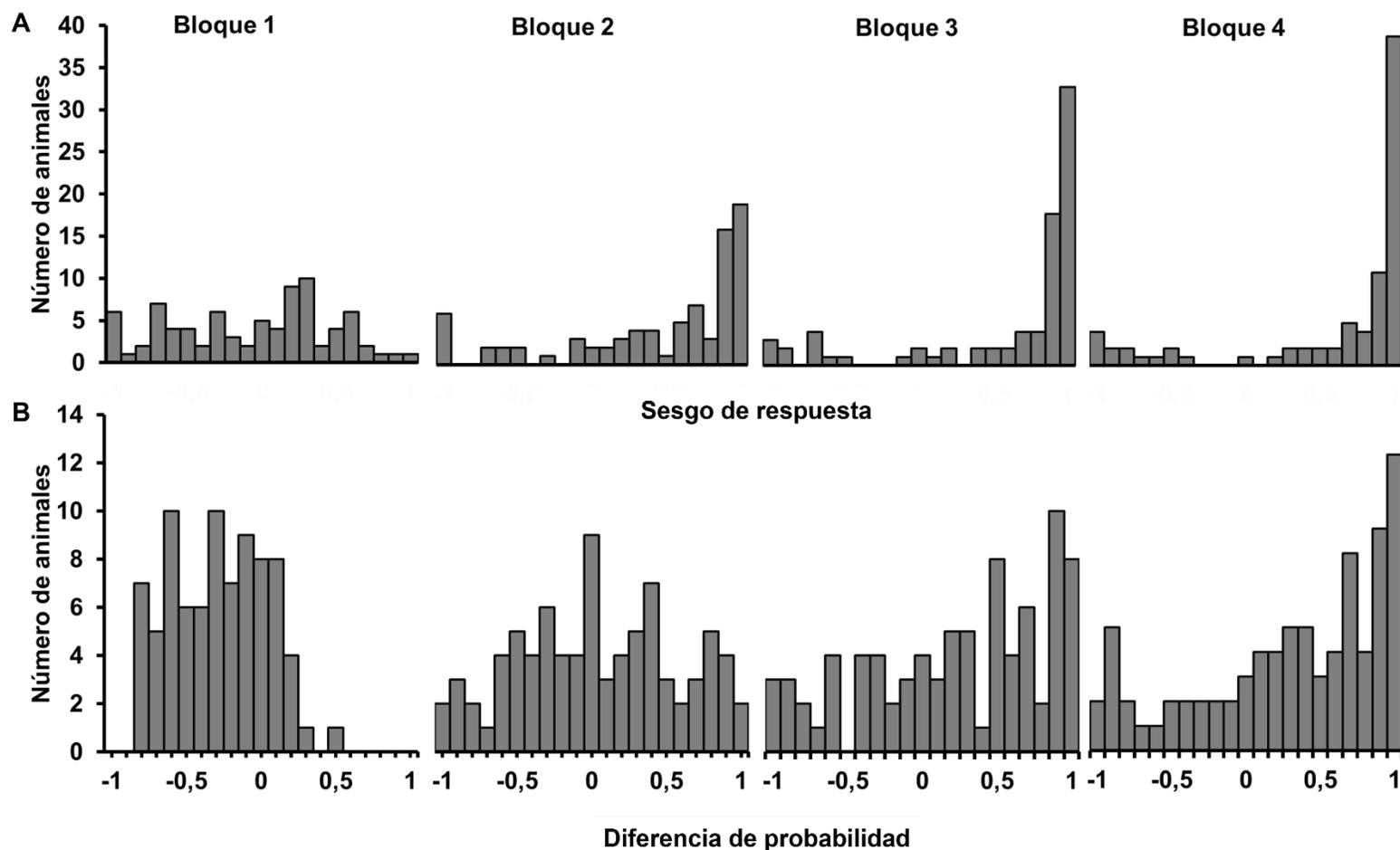
minimizando el dolor de las cirugías con anestésicos y calmantes, y dándoles todos los cuidados posteriores; c) Ley 84 del 27 de diciembre de 1989, expedida por el Congreso Nacional de la República de Colombia. De igual forma, se consideraron los procedimientos para el manejo y cuidado de animales de laboratorio recomendados por la normativa de la Unión Europea (8616091EU) y los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos de América (National Research Council, 1996). Con respecto a la aplicación de las normas anteriormente citadas, cabe hacer las siguientes aclaraciones: 1) Todos los procedimientos experimentales fueron sometidos a la consideración De igual manera, todas las manipulaciones relacionadas con el experimento fueron aprobadas por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Fundación Universitaria Konrad Lorenz, conformado según lo estipulado en el artículo 26 de la Ley 84 de 1989. 2) Se garantizó que todo el personal encargado del cuidado y manejo de los animales de experimentación tuviera conocimiento y experiencia en los procedimientos. 3) Se garantizó la seguridad de los investigadores mediante el uso de protocolos y elementos de protección a la hora de manipular los residuos contaminados. 4) Para impedir la contaminación ambiental con elementos potencialmente tóxicos, los residuos químicos y los materiales desechables utilizados, se siguió un protocolo de eliminación de residuos que permitía que estos fueran depositados en los contenedores adecuados. 5) Los cadáveres de los animales utilizados en esta investigación fueron incinerados en el horno de incineración Eco Capital según lo dispuesto por el Sistema de Gestión Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia.

## Resultados

### **El entrenamiento en la tarea de automoldeamiento produjo una proporción mayor de *sign trackers***

En el presente estudio se hizo una inspección de los datos con el objetivo de observar la distribución de los sujetos en el índice de aproximación condicionada pavloviana (ACP) y poder clasificarlos según su fenotipo. Para esto, las medidas de sesgo de respuesta y probabilidad de respuesta fueron colapsadas en cuatro bloques cada uno compuesto por tres sesiones experimentales (Figura 3). La Figura 3A muestra la distribución de la variable sesgo de respuesta. Para esta variable el sesgo hacia la izquierda (puntajes negativos) indica mayor preferencia por el comedero, mientras el sesgo a la derecha (puntajes positivos) indica mayor preferencia por la palanca. En general, se observa una progresión a lo largo de los bloques, mostrando un sesgo cada vez más marcado hacia la derecha. En el Bloque 1 se observa que los sujetos están distribuidos de manera similar, sin sesgo aparente hacía la palanca o el comedero. En el Bloque 2 se observa un aumento en el sesgo hacia la derecha, que crece en el Bloque 3 donde se observa una distribución con sesgo hacia los puntajes positivos más extremos. Al final de la adquisición en el Bloque 4 se puede observar que la mayoría de los sujetos tienen un sesgo hacia la derecha, mostrando que el 82% de los animales tiene una tendencia a hacer seguimiento de la palanca y a ser clasificados como *sign trackers*. Del mismo modo, se puede observar que el 48% de los animales alcanzó un puntaje de 1, que indica un sesgo completo hacia la palanca.

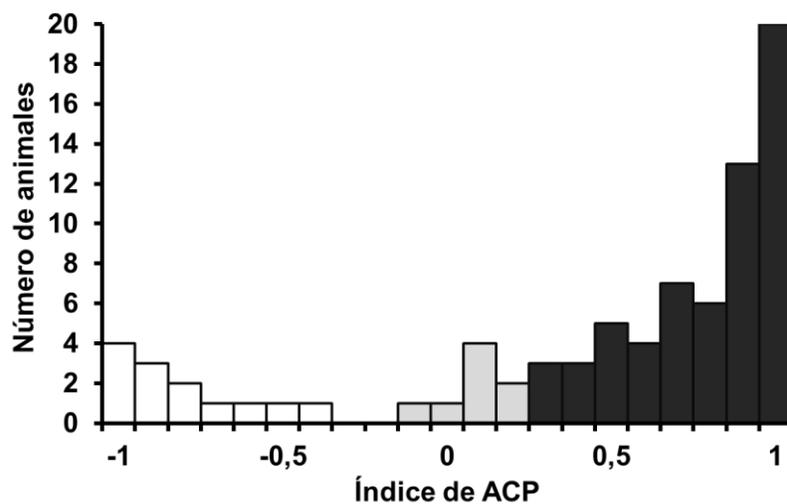
La Figura 3B muestra la distribución de la variable probabilidad de respuesta, para esta variable el sesgo hacia la izquierda (puntajes negativos) indica mayor probabilidad de interactuar con el comedero, mientras que el sesgo a la derecha (puntajes positivos) indica mayor probabilidad de interactuar con la palanca. En el Bloque 1 se observa una distribución sesgada hacia los puntajes negativos, mostrando que en las primeras sesiones de entrenamiento gran parte de los sujetos tenía una mayor probabilidad de interactuar principalmente con el comedero. En el Bloque 2 se observa una disminución en el sesgo



**Figura 2. Distribución de las variables del índice ACP durante el entrenamiento.** A. Sesgo de respuesta. Valores positivos indican mayor sesgo hacia la palanca y valores negativos indican mayor sesgo hacia el comedero B. Diferencia de probabilidad. Valores positivos indican mayor probabilidad de interactuar con la palanca y valores negativos indican mayor probabilidad de interactuar con el comedero.

hacia los números negativos y un aumento en el sesgo de los números positivos. A partir de Bloque 3 se observa un cambio en el sesgo de la distribución donde la mayoría de los sujetos tiene puntajes positivos. Finalmente, en el Bloque 4 se puede observar que hacia el final de la adquisición la mayoría de los sujetos tiene puntajes positivos, mostrando que el 63% de los animales tiene una mayor probabilidad de interactuar con la palanca y ser clasificados como *sign trackers*.

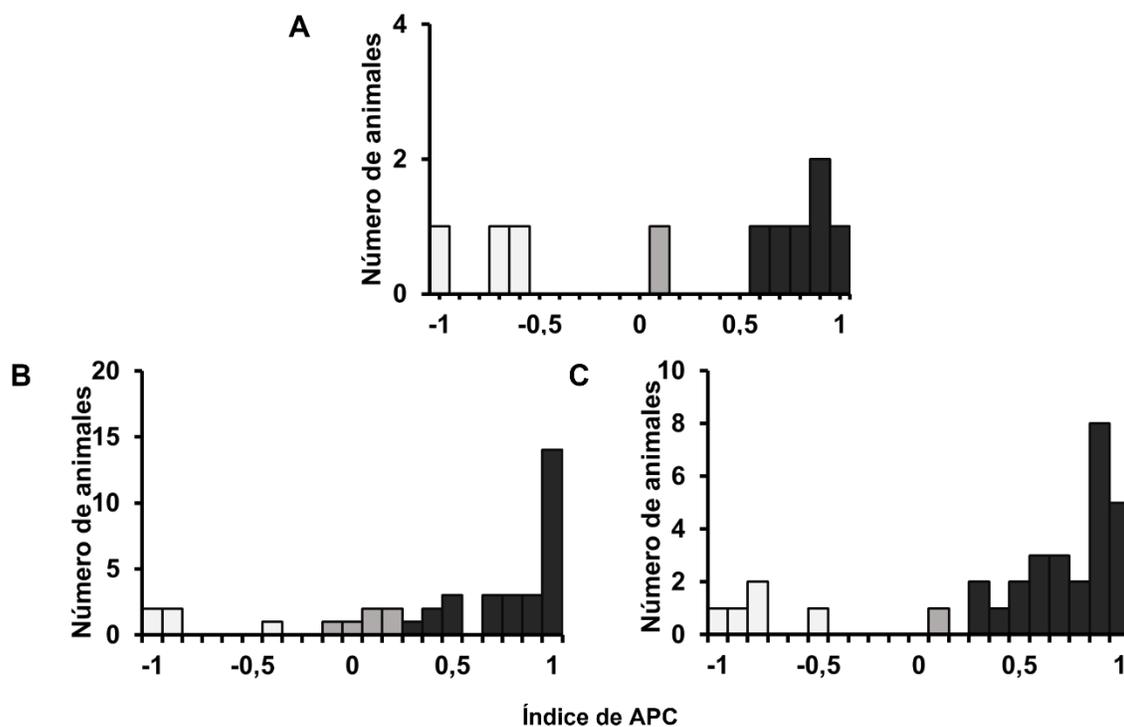
Considerando los resultados mencionados anteriormente en las variables sesgo de respuesta y probabilidad de respuesta, es en el Bloque 4 donde se evidencian más claramente las subpoblaciones de sujetos que podrían ser potencialmente clasificados según su fenotipo, por lo que se utilizó el promedio de las medidas de sesgo de respuesta y probabilidad de respuesta en este bloque para obtener el puntaje de ACP a partir del cual se clasificó a los animales como *sign trackers*, *goal trackers* o intermedios (Figura 4). En esta variable el sesgo hacia la izquierda (puntajes negativos) indica que ante la presentación de la clave los sujetos se sienten más atraídos por el comedero (*goal trackers*), mientras que el sesgo a la derecha (puntajes positivos) indica que los sujetos ante la presentación de la clave se sienten más atraídos por la palanca (*sign trackers*). La distribución de los 82 animales para el puntaje de ACP evidenció 13 animales (16%) con puntajes entre -1 y -0.3



**Figura 3. Distribución del índice de ACP en el bloque 4.** Número de animales con un puntaje de APC determinado. Los valores varían de 1 a -1. Las barras blancas representan los *goal trackers*, las barras grises representan a los intermedios y las barras negras representan a los *sign trackers*.

clasificados como *goal trackers*, 8 animales (10%) con puntajes entre -0.2 y 0.2 clasificados como intermedios y 61 animales (74%) con puntajes entre 0.3 y 1 clasificados como *sign trackers*.

Con el objetivo de determinar si dicha proporción variaba de acuerdo con el tratamiento se analizó la distribución de los sujetos de cada grupo en el Bloque 4 para el puntaje de ACP (Figura 5). A partir de esto se observó que de los 10 animales del grupo Control/AM 3 (30%) fueron clasificados como *goal trackers*, 1 (10%) como intermedio y 6 (60%) como *sign trackers* (Figura 5A). Del mismo modo, de los 32 animales del grupo Sal/AM 5 (16%) fueron clasificados como *goal trackers*, 1 (3%) como intermedio y 26 (81%) como *sign trackers* (Figura 5B). Finalmente, de los 40 animales del grupo Nic/AM 5 (13%) fueron clasificados como *goal trackers*, 6 (15%) como intermedios y 29 (72%) como *sign trackers* (Figura 5C). Con el objetivo de observar si el fenotipo difería de acuerdo con



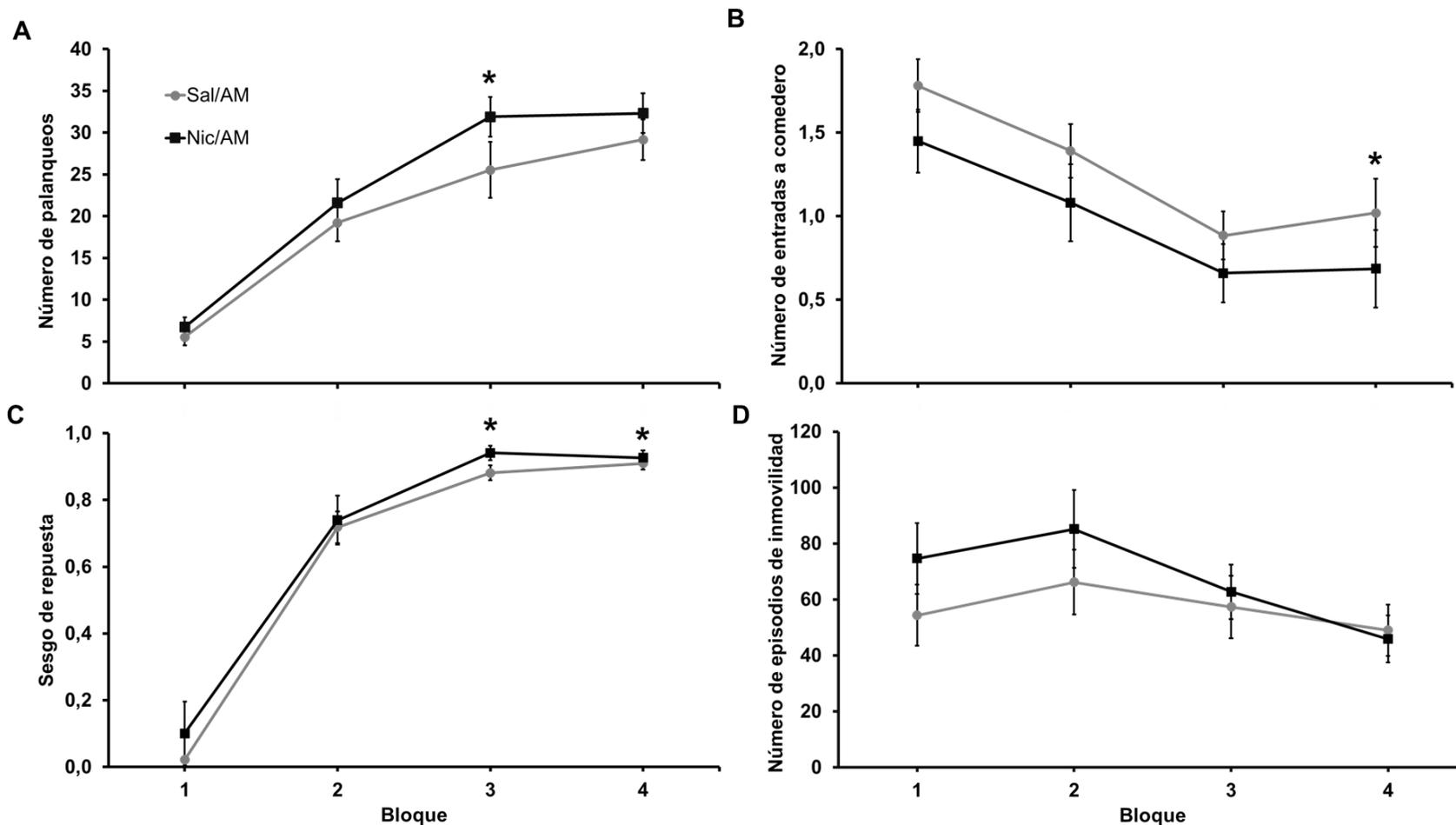
**Figura 4. Distribución del índice de ACP por grupo en el bloque 4.** Número de animales con un puntaje de ACP determinado para los grupos: A. Control/AM B. Sal/AM C. Nic/AM. Los valores varían de 1 a -1. Las barras blancas representan los *goal trackers*, las barras grises representan a los intermedios y las barras negras representan a los *sign trackers*.

el tratamiento al que fueron sometidos los sujetos se realizó una prueba de independencia de chi-cuadrado. Los resultados mostraron que no hay relación entre el fenotipo y el tratamiento,  $X^2 (2, N = 82) = 2.79, p > 0.05$ . Un análisis adicional utilizando el estadístico de razón de momios mostró que la proporción de sujetos clasificados como *sign trackers* (OR = 0.824, 95% IC = 0.305 – 2.224,  $p > 0.05$ ), *goal trackers* (OR = 0.607, 95% IC = 0.181 – 2.042,  $p > 0.05$ ) e intermedios (OR = 3.529, 95% IC = 0.668 – 18.643,  $p > 0.05$ ) no difirió según el tratamiento de los sujetos (nicotina o salina) (Anexo 1).

### **La nicotina crónica facilita la adquisición de la tarea de automoldeamiento**

Para el análisis de los datos, los grupos Control/AM y Sal/AM fueron unificados en el grupo denominado Sal/AM ( $n = 32$ ), debido a que no se observaron diferencias significativas en ambos grupos tras ser comparados mediante una prueba T (Anexo 1). Los grupos fueron unificados tanto para los análisis comportamentales, como para los ensayos de inmunohistoquímica.

En el presente estudio se evaluaron los efectos de la administración crónica de nicotina en la adquisición de la tarea de automoldeamiento. Para ello, se analizaron las medidas de número de palanqueos, número de entradas a comedero y sesgo de repuesta a lo largo de todo el entrenamiento en los animales previamente clasificados como *sign trackers*. Las medidas comportamentales obtenidas de las 12 sesiones de entrenamiento fueron colapsadas en 4 bloques compuestos de 3 sesiones cada uno (Figura 6). A partir de esto se observó que ambos grupos desarrollaron respuestas condicionadas de aproximación hacia la palanca (*sign tracking*), aunque esta respuesta se vio fortalecida temporalmente en el grupo tratado con nicotina (Figura 6A). Un ANOVA mixto de dos vías no paramétrico mostró un efecto significativo del bloque ( $F (3/177) = 152.17, p < 0.05$ ) y una interacción significativa entre bloque y tratamiento ( $F (3/177) = 2.88, p < 0.05$ ), sin embargo, no hubo efecto significativo del tratamiento ( $F (1/59) = 0.84, p > 0.05$ ). Comparaciones *post-hoc* mostraron que los animales del grupo Nic/AM presentaron un mayor número de contactos con la palanca (*sign tracking*) en comparación con el grupo Sal/AM en el Bloque 3 ( $p < 0.05$ ). No se observaron diferencias en el número de palanqueos entre ambos grupos en otros bloques ( $p > 0.05$ ).



**Figura 5. Adquisición de la tarea de automoldeamiento.** Puntajes promedio durante la adquisición de la tarea de automoldeamiento: A. Número de palanqueos B. Número de entradas a comedero C. Sesgo de respuesta. Los círculos grises representan los animales tratados con salina (Sal/AM n = 32) y los cuadrados negros representan a los animales tratados con nicotina (Nic/AM n = 29). \*  $P < 0.05$  denota diferencias significativas entre los grupos Sal/AM y Nic/AM en el bloque correspondiente.

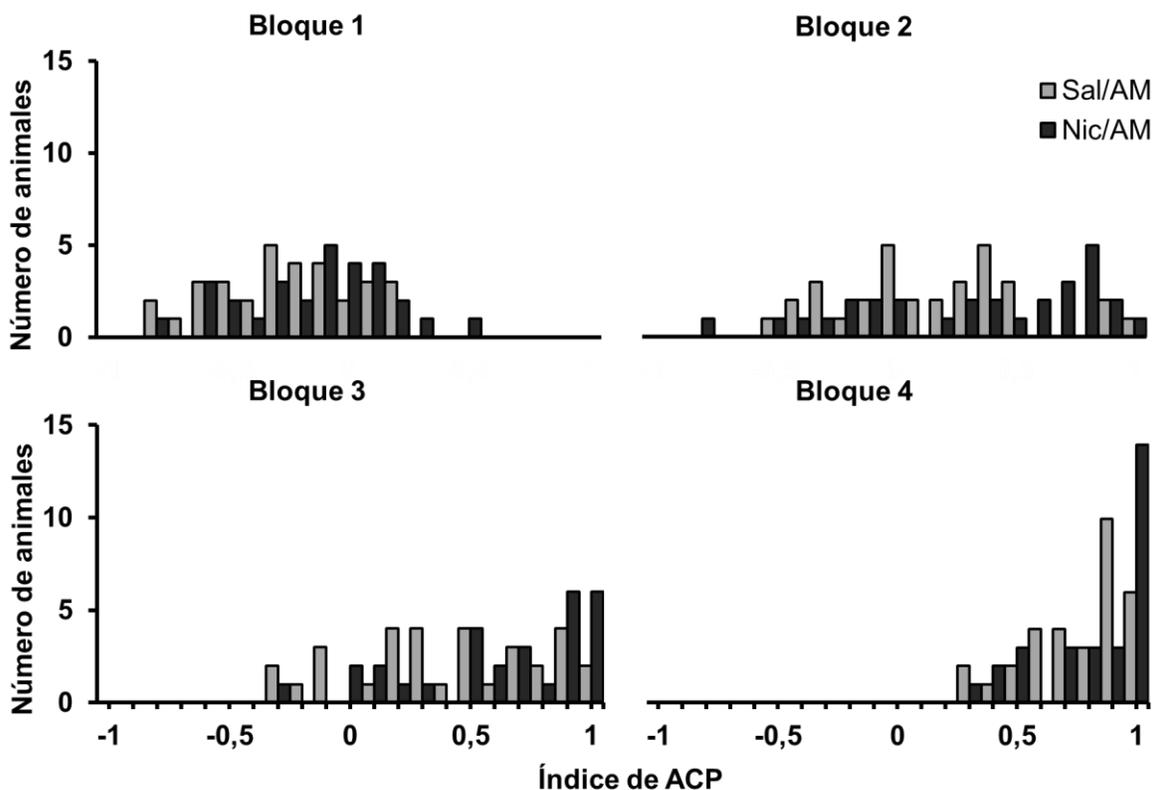
Por otro lado, tanto el grupo Nic/AM como el grupo Sal/AM mostraron un decremento general en el número de entradas a comedero (*goal tracking*) (Figura 6B). Un ANOVA mixto de dos vías no paramétrico mostró un efecto significativo del bloque ( $F(3/177) = 36.38, p < 0.05$ ), pero no un efecto significativo del tratamiento ( $F(1/59) = 3.67, p > 0.05$ ) o de la interacción entre bloque y tratamiento ( $F(3/177) = 0.77, p > 0.05$ ). Comparaciones planeadas mostraron que los animales del grupo Sal/AM incrementaron el número de entradas a comedero en comparación con el grupo Nic/AM durante el último bloque ( $Z(14) = 0.23, p < 0.05$ ). No se observaron diferencias en esta medida en otros bloques ( $p > 0.05$ ).

En cuanto a la medida de sesgo de respuesta se observó que ambos grupos desarrollaron un sesgo hacia la palanca, pero no hacia el comedero, sin embargo, este efecto se vio fortalecido en el grupo Nic/AM (Figura 6C). Un ANOVA mixto de dos vías no paramétrico mostró un efecto significativo del bloque ( $F(3/177) = 172.58, p < 0.05$ ), pero no un efecto significativo del tratamiento ( $F(1/59) = 3.92, p > 0.05$ ) o de la interacción entre bloque y tratamiento ( $F(3/177) = 1.91, p > 0.05$ ). Comparaciones planeadas mostraron que los animales del grupo Nic/AM exhibieron niveles más altos de sesgo positivo en los bloques 3 ( $Z(14) = -0.056, p < 0.05$ ) y 4 ( $Z(14) = -0.022, p < 0.05$ ), en comparación con el grupo Sal/AS. No se observaron diferencias en esta medida en otros bloques ( $p > 0.05$ ).

Finalmente, en cuanto a la medida de inmovilidad que se utilizó como un indicador de los posibles efectos locomotores de la nicotina. No se observaron diferencias significativas en el número de episodios entre los grupos Sal/AM y Nic/AM (Figura 6D). Un ANOVA mixto de dos vías no paramétrico mostró un efecto significativo del bloque ( $F(3/177) = 10.33, p < 0.05$ ) y de la interacción entre bloque y tratamiento ( $F(3/177) = 3.28, p < 0.05$ ), pero no efecto del del tratamiento ( $F(1/59) = 0.16, p > 0.05$ ). Comparaciones *post-hoc* no muestran diferencias entre ambos grupos en ninguno de los bloques ( $p > 0.05$ ).

Por otro lado, debido a que se observó un efecto facilitador de la nicotina en la adquisición de la tarea de automoldeamiento, se tomó la decisión de ver la distribución de los grupos Sal/AM y Nic/AM en el índice de ACP a lo largo de los bloques. A partir de esto se observó que los sujetos expuestos de manera crónica a la nicotina alcanzaron un

sesgo hacia los puntajes positivos antes que los sujetos del grupo salina (Figura 7). En esta figura se muestra la distribución de los sujetos en el puntaje de ACP; para esta variable el sesgo hacia la izquierda o a los puntajes negativos indica mayor atracción por el comedero (*goal tracking*), mientras que el sesgo a la derecha o a los puntajes positivos indica mayor atracción por la palanca (*sign tracking*). En general, se observa una progresión a lo largo de los bloques hacia los puntajes positivos en ambos grupos. En el Bloque 3 se observa que el grupo Nic/AM tiene una distribución con un sesgo más marcado hacia la derecha, en comparación con el grupo Sal/AM. En este bloque el 79% de los sujetos del grupo Nic/AM está ubicado entre los puntajes 0.3 y 1, en comparación con el grupo Sal/AM donde solo el 66% de los sujetos está ubicado en estos puntajes. Aunque como se mencionó anteriormente esta proporción no parece diferir según el tratamiento.

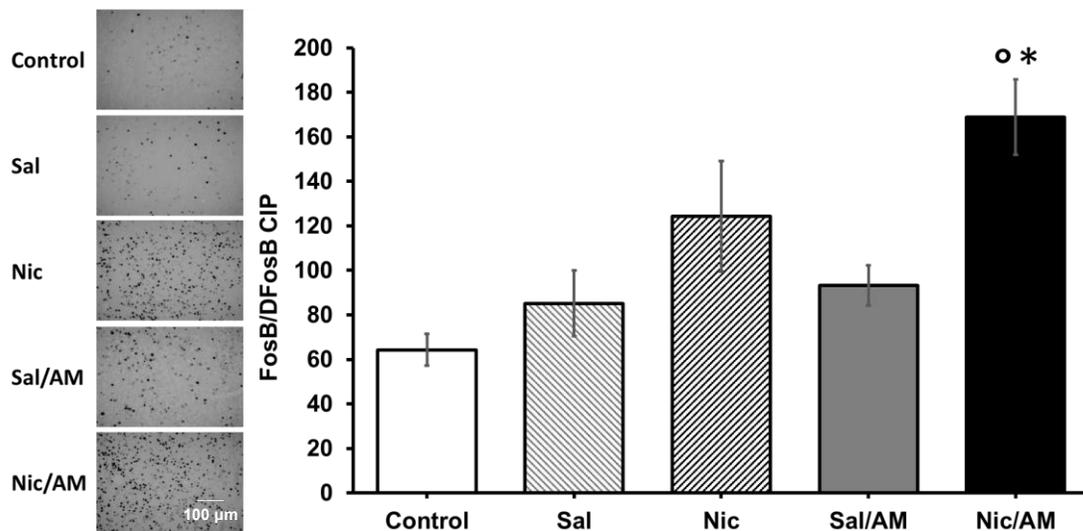


**Figura 6. Distribución del índice de ACP a lo largo del entrenamiento.** Número de animales con un puntaje de APC determinado. Los valores varían de 1 a -1. Las barras grises corresponden al grupo SAL/AM y las barras negras al grupo Nic/AM.

### La nicotina crónica aumentó la expresión de FosB/DFosB en el núcleo accumbens y la corteza orbitofrontal

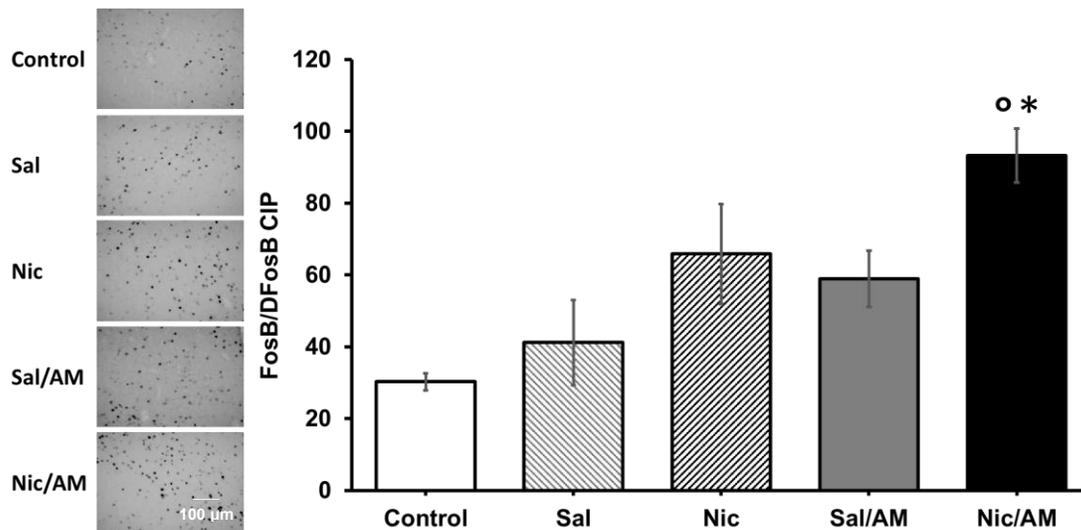
En el presente estudio se evaluaron los efectos de la administración crónica de nicotina en la expresión de la proteína FosB/DeltaFosB, en regiones asociadas con el establecimiento de valor de incentivo de claves asociadas a estímulos apetitivos. Los resultados de la cuantificación de las células inmunopositivas muestra que el tratamiento con nicotina durante el entrenamiento comportamental en general aumentó los niveles de expresión de la proteína FosB/DeltaFosB en áreas corticolímbicas.

En los resultados se observó que la exposición crónica a la nicotina aumentó la expresión del factor de transcripción FosB/DeltaFosB en el núcleo accumbens (Figura 8). Un ANOVA de una vía mostró diferencias significativas entre grupos ( $F(4, 22) = 7.981, p < 0.05$ ). Comparaciones post hoc mostraron un mayor número de células inmunopositivas para FosB/DeltaFosB en el grupo Nic/AM, en comparación con los grupos Sal/AM ( $p < 0.05$ ) y Control ( $p < 0.05$ ) en esta estructura.



**Figura 7.** Expresión de FosB/DFosB en el núcleo accumbens. Control (n = 4), Sal (n = 4), Nic (n = 3), Sal/AM (n = 10) y Nic/AM (n = 6). (\*) Indica diferencias significativas respecto al grupo Sal/AM ( $p < 0.05$ ). (°) Indica diferencias significativas respecto al grupo Control ( $p < 0.05$ ).

De manera similar, se observó que el tratamiento crónico con nicotina aumentó la expresión del factor de transcripción FosB/DeltaFosB en la corteza orbitofrontal (Figura 9). Un ANOVA de una vía mostró diferencias significativas entre grupos ( $F(4, 21) = 6.652$   $p < 0.05$ ). Comparaciones post hoc mostraron un mayor número de células inmunopositivas para FosB/DeltaFosB en el grupo Nic/AM, en comparación con los grupos Sal/AM ( $p < 0.05$ ) y Control ( $p < 0.05$ ).



**Figura 8.** Expresión de FosB/DFosB en la corteza orbitofrontal. Control (n = 4), Sal (n = 4), Nic (n = 4), Sal/AM (n = 8) y Nic/AM (n = 6). (\*) Indica diferencias significativas respecto al grupo Sal/AM ( $p < 0.05$ ). (°) Indica diferencias significativas respecto al grupo Control ( $p < 0.05$ ).

En contraste, no se observaron diferencias en la expresión del factor de transcripción FosB/DeltaFosB entre grupos ( $p > 0.05$ ) en la amígdala central (Figura suplementaria 1), ni en la amígdala basolateral (Figura suplementaria 2).

## Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la administración crónica de nicotina tiene un efecto potenciador temporal sobre las respuestas de palanqueo (*sign tracking*) y en el sesgo de respuesta hacia la palanca. Este efecto parece no estar relacionado con la inducción de hiperactividad generalizada, ya que no se encontraron diferencias entre los grupos en los episodios de inmovilidad. De manera complementaria, este tratamiento se relacionó con un número reducido de entradas al comedero (*goal tracking*) durante el entrenamiento. Finalmente, se observó que los efectos de la administración prolongada de nicotina en el comportamiento de los animales a lo largo del entrenamiento están relacionados con aumentos en la expresión de la proteína FosB/DFosB en áreas corticolímbicas como el núcleo accumbens y la corteza orbitofrontal.

### **Incremento en la proporción de *sign trackers* causados por el entrenamiento en automoldeamiento**

Al analizar la distribución de los sujetos en el índice de aproximación condicionada pavloviana (APC) se observó que el 74% de los animales fue clasificado como *sign trackers*, el 16% como *goal trackers* y el 10% como intermedios, mostrando una mayor proporción de sujetos clasificados como *sign trackers*. De manera importante se observó que esta proporción no se vio afectada por el tratamiento con nicotina. Estos resultados difieren de estudios previos como el de Meyer y colaboradores (2012) quienes utilizaron el índice de APC para clasificar 1878 ratas y encontraron que el 35% de los animales eran *sign trackers*, el 30% eran *goal trackers* y el 35% eran intermedios. Por su parte, Yager y Robinson (2015) encontraron algo similar con una muestra de 200 ratas donde el 30% de los sujetos fueron clasificados como *sign trackers*, el 32% como *goal trackers* y el 35% eran intermedios. Finalmente, con una muestra más pequeña Serrano-Barroso y colaboradores (2019) encontraron en un grupo de 25 ratas que el 32% de los animales eran *sign trackers*, el 20% eran *goal trackers* y el 48% eran intermedios. Como se puede observar en estos estudios los grupos tienen un nivel considerable de variación individual

entre los sujetos, contrario a lo que se observó en la muestra utilizada donde la mayoría de los sujetos fueron clasificados como *sign trackers*. Debido a que esta diferencia parece no ser explicada por el tratamiento, es posible que haya sido causada por factores metodológicos como el protocolo de privación al cual fueron sometidos los sujetos experimentales, ya que en los estudios anteriormente mencionados los animales tuvieron libre acceso a agua y comida.

Previamente se ha descrito que la privación alimenticia puede incrementar el valor de incentivo del EC, produciendo incrementos en las respuestas de *sign tracking* y disminución en las respuestas de *goal tracking*. Se ha propuesto que los estados fisiológicos como el hambre pueden incrementar el valor hedónico de estímulos apetitivos de tipo alimenticio y la saliencia de incentivo de las claves asociadas a estos (Berridge, 2000). Por ejemplo, Sparber y colaboradores (1991) encontraron aumentos proporcionales en la tasa de adquisición de la tarea de automoldeamiento producido por el grado de privación alimenticia. De igual manera, Naeem (2016) observó que los animales privados de alimento presentaban niveles más altos de *sign tracking*, caracterizados por un mayor número de palanqueos y una latencia menor hacia la palanca. Serrano-Barroso y colaboradores (2019) mostraron un cambio en el índice de ACP de animales con 9 semanas de edad previamente clasificados como *goal trackers*. Los resultados muestran que después comenzar la fase de privación alimenticia hubo un incremento en el número de palanqueos y una disminución en el número de entradas a comedero, mostrando que los sujetos se movieron hacia una estrategia de *sign trackers*, sugiriendo así que la expresión de los fenotipos puede ser modulada por factores motivacionales que modifican la saliencia del EC.

### **La nicotina crónica aumenta el *sign tracking* y reduce el *goal tracking* durante el entrenamiento en automoldeamiento**

En el presente estudio se observó que el tratamiento crónico con nicotina incrementó el *sign tracking* y el sesgo de respuesta y disminuyó el *goal tracking*. Este resultado apoya la idea de que la nicotina es una droga que puede modular el establecimiento de las relaciones asociativas EC-EI (Olausson et al., 2003; Palmatier et al. 2013; Bevins y Palmatier 2004). Este papel modulador de la nicotina podría facilitar no

solo la adquisición de la relación EC-EI, sino también afectar el valor de incentivo del EC. Esta teoría es consistente con investigaciones previas que muestran un efecto potenciador de la nicotina en el valor de incentivo de las claves asociadas a un estímulo apetitivo no relacionado con la droga (Palmatier et al., 2013, Versaggi et al., 2016; Stringfield et al., 2017; 2019; Overby et al., 2018). Este efecto se observa con mayor claridad en el presente estudio, dado que los sujetos analizados fueron aquellos clasificados como *sign trackers*, en los cuales la tendencia a preferir la interacción con el estímulo condicionado se vio estimulada por la acción de la nicotina, un efecto que se acompaña con una reducción sostenida en la conducta de *goal-tracking*, en especial en las últimas tres sesiones del entrenamiento.

Si bien se ha reportado que la nicotina tiene la capacidad de aumentar los comportamientos de *sign tracking*, el efecto de esta droga sobre la respuesta de *goal tracking* es complejo, ya que los resultados publicados van desde la ausencia de efecto hasta un efecto potenciador en estas respuestas (Palmatier et al., 2013; Versaggi et al., 2016; Stringfield et al., 2017; 2019; Overby et al., 2018). En contraste con los estudios anteriormente mencionados, en la presente investigación se observó una disminución en el número de entradas a comedero de todos los animales, patrón que fue potenciado por la administración crónica de nicotina. Estos resultados podrían estar relacionados con diferencias metodológicas relativas a la elección de sujetos, la preexposición al EI y la privación alimenticia.

Una revisión de la literatura mostró que, en las investigaciones previamente citadas, el entrenamiento comportamental se llevó a cabo sin seleccionar o diferenciar explícitamente los fenotipos de los sujetos (*goal trackers* o *sign trackers*). Por ejemplo, Stringfield y colaboradores (2017) mostraron que la administración repetida de nicotina produjo diferentes efectos en los niveles de *goal tracking* en dos experimentos con el mismo entrenamiento comportamental. En los resultados se observó que el tratamiento con nicotina aumentó el *goal tracking* en el experimento 2 pero no en el experimento 1, en el que no se reportó ningún efecto. Como señalan los autores, estos resultados podrían ser resultado de la diferencia en el número de sujetos utilizado en cada experimento, lo que podría afectar la proporción *sign tracker* – *goal tracker* de los animales en el grupo,

sugiriendo que la exposición a la nicotina podría tener efectos diferenciales dependiendo de las predisposiciones individuales.

Una segunda hipótesis que podría explicar estos resultados está relacionada con diferencias metodológicas. En el presente estudio no hubo preexposición a la caja operante ni a los *pellets* de comida, a diferencia de investigaciones previas donde los sujetos fueron expuestos al contexto experimental y al EI antes de comenzar el entrenamiento en automoldeamiento (Palmatier et al. 2013; Versaggi et al., 2016; Stringfield et al., 2017; 2019). Esto sugiere que la preexposición podría estar facilitando el establecimiento de la repuesta de *goal tracking*. En este sentido, Timberlake (1986), expuso ratas albinas a dos sesiones de presentaciones no emparejadas del EI y posteriormente las entrenó en una tarea de condicionamiento clásico en la que emparejaba bolas rodantes (EC) con la presentación de la comida (EI). En los resultados se observó que la preexposición al EI retardó la adquisición de la respuesta condicionada (contacto con las bolas) e incrementó los niveles de *goal tracking* (acercamiento a la bandeja en la que era entregada la comida). Resultados similares fueron reportados por Costa y Boakes (2009) quienes expusieron a los sujetos experimentales a una sesión con 20 presentaciones no emparejadas del EI y posteriormente los entrenaron en una tarea de condicionamiento clásico en la se emparejaba una palanca (EC) con la presentación de agua azucarada (EI). En los resultados se observó que la preexposición al EI produjo dificultades en la adquisición de la respuesta de palanqueo, además de aumentar de manera marginal la tasa de entradas al comedero. Sugiriendo que la preexposición al EI causó un condicionamiento contextual que interfirió con aprendizajes subsecuentes como el de condicionamiento de palanca, produciendo así un sesgo hacia la respuesta de *goal tracking*. En el experimento aquí planteado la ausencia de esta fase de preexposición permitiría la libre adquisición de la respuesta de *sign tracking*, lo que podría explicar los efectos comportamentales observados.

Finalmente, y como ya se mencionó anteriormente, la privación alimenticia puede facilitar las respuestas de *sign tracking* y disminuir las de *goal tracking* (Sparber y colaboradores, 1991; Naeem, 2016; Serrano-Barroso et al., 2019). En el presente estudio, se sometió a todos los sujetos experimentales a un protocolo de privación alimenticia, a diferencia de estudios previos en los que los sujetos tenían libre acceso a agua y comida

(Palmatier et al. 2013; Versaggi et al., 2016; Stringfield et al., 2017; 2019). Inicialmente se podría pensar que el aumento en el *sign tracking* de los animales tratados con nicotina pudo haber sido causado por un aumento en el apetito mediado por la administración farmacológica. Al respecto, investigaciones previas han mostrado que la administración crónica de nicotina causa una disminución en inicial en la ingesta de comida (Levin et al., 1987; Dandekar et al., 2011; Nakhate et al., 2009). Estos autores reportan que este efecto es transitorio y se revirtió luego de aproximadamente una semana de exposición alcanzando, pero no superando, el nivel de los animales del grupo control. Adicionalmente, Romero y colaboradores (2018) reportaron que los efectos fortalecedores de la nicotina sobre el comportamiento reforzado por comida no pueden ser explicados únicamente por cambios en el apetito de los sujetos. Estos autores analizaron los datos de una tarea de palanqueo reforzada por comida utilizando una medida comportamental que contiene intervalos sensibles a modificaciones motivacionales como el apetito llamada tasa de ejecución (*run rate*). A partir de esto observaron que un grupo de animales sometido a un protocolo de pre-alimentación tuvo una disminución en dicha tasa a lo largo de los bloques, en comparación con el grupo tratado con nicotina que no mostró efecto alguno. Sugiriendo así, que el efecto fortalecedor de la nicotina no se puede explicar por un aumento en el apetito de los animales, ya que de ser así se esperarían un incremento en la tasa de ejecución. Los autores describen que los efectos de la nicotina podrían estar relacionados con afectaciones motoras o incrementos en el valor del reforzador o de las claves asociadas a este. En sentido y teniendo en cuenta que no se observó un efecto de la nicotina sobre la locomoción de los animales, es posible sugerir que los efectos observados en el presente estudio se deben a un efecto potenciador de la nicotina en el valor de incentivo de la palanca asociada a un EI con un valor hedónico alterado por la privación alimenticia, ya que como se mencionó anteriormente tanto el valor hedónico de los estímulos apetitivos, como la saliencia de incentivo de las claves asociadas a estos pueden incrementarse con estados fisiológicos como el hambre (Berridge, 2000).

### **La exposición crónica a la nicotina durante el automoldeamiento aumentó la expresión de la proteína FosB/DFosB en áreas corticolímbicas**

El presente estudio evaluó la hipótesis de que la exposición a la nicotina aumentaría la respuesta de *sign tracking*, y que este efecto podría estar relacionado con incrementos en la expresión de la proteína FosB/DFosB en regiones cerebrales corticolímbicas involucradas en la asignación de saliencia de incentivo. De acuerdo con la hipótesis planteada, se observaron incrementos en la expresión de la proteína FosB/DFosB en el núcleo accumbens y la corteza orbitofrontal de animales expuestos crónicamente a la nicotina durante el entrenamiento en un protocolo de automoldeamiento.

La proteína DFosB es un factor de transcripción cuya expresión depende de la activación de los receptores dopaminérgicos de tipo D1 (Zhang et al., 2002; Muller y Unterwald, 2005), es altamente estable y se acumula de manera significativa con la exposición repetida a drogas de abuso (Chen et al., 1997; Kelz et al., 1999; Kelz y Nestler, 2000; Marttila. 2006). Estas características permiten sugerir que los cambios en la expresión de DFosB podrían ser mediadores de alteraciones a largo plazo en la morfología neuronal, la estructura sináptica y el comportamiento asociados con el consumo repetido de drogas (Nestler et al., 2001).

La nicotina ha mostrado ser una droga capaz de alterar la expresión de DFosB. Por ejemplo, Pich y colaboradores (1997) mostraron que la administración repetida de nicotina produce un incremento en un antígeno de la familia Fos de 35- kD en la corteza infralímbica, la corteza cingulada anterior, el núcleo accumbens (NAc) y el caudado putamen (parte medial). Estudios más recientes confirmaron este resultado, mostrando que la administración repetida de nicotina aumenta la expresión de la proteína DFosB y los niveles de ARNm para DFosB en el NAc (Xiong et al., 2011; Alajaji et al, 2016). Por otro lado, Soderstrom y colaboradores (2007) mostraron que la administración de nicotina por un periodo de diez días produjo incrementos en la expresión de FosB en el núcleo accumbens y el giro dentado 2, 10 y 37 días después de la última inyección, sugiriendo cambios a largo plazo aún en ausencia de la droga.

Pocos estudios han relacionado directamente los cambios en la expresión de FosB/DFosB producidos por el tratamiento crónico con nicotina con alteraciones comportamentales. En este sentido, Marttila y colaboradores (2006) mostraron que un tratamiento de cinco días con nicotina produjo sensibilización comportamental e incrementos en la expresión de FosB/DFosB en el NAc después de la última inyección, sugiriendo una relación funcional entre ambos resultados. A pesar de los pocos estudios que se encuentran sobre este tema, hay información que permite hipotetizar sobre la relación entre las alteraciones comportamentales causadas por la droga y la expresión de DFosB. Algunos estudios han mostrado que la administración crónica de nicotina produce cambios morfológicos en las neuronas de la región *shell* del NAc, aumentando la longitud y la densidad de las espinas dendríticas, así como el número de ramificaciones (Brown y Kolb, 2001; McDonald et al; 2005, 2007). Estudios recientes muestran que la nicotina induce de manera selectiva esta remodelación dendrítica en una subpoblación de neuronas espinosas medianas (*medium spiny neurons*) del núcleo accumbens y que este efecto es dependiente de la activación de los receptores D1 (Ehlinger et al., 2016, 2017). Además, se ha descrito ampliamente que al igual que otras drogas de abuso la nicotina media la liberación de dopamina por medio de la activación de RsAChn de tipo  $\alpha 4\beta 2$  y  $\alpha 7$  en neuronas del área tegmental ventral, lo que trae como consecuencia la activación de los receptores D1 en el núcleo accumbens (Michalak y Budzyńska, 2019). En conjunto, es posible sugerir que la activación de los receptores dopaminérgicos D1 producida por la nicotina podría estar facilitando la expresión de DFosB y que este factor de transcripción podría estar mediando los cambios morfológicos observados en el núcleo accumbens. De esta forma, es posible que las alteraciones comportamentales observadas tras la exposición crónica a la nicotina sean el resultado de cambios plásticos en neuronas del sistema dopaminérgico mesolímbico mediados por la acumulación del factor de transcripción FosB/DFosB.

En este sentido, se ha observado que la expresión de DFosB no solo se induce por la exposición a drogas de abuso. Werme y colaboradores (2002) mostraron que en ratas Lewis, el acceso a una rueda para correr por 30 días incrementó los niveles de DFosB en el NAc, especialmente en el área *core* y que animales con sobreexpresión de DFosB en neuronas estriatales tuvieron un aumento en la conducta de correr. En el mismo sentido, se

ha establecido que ratones *knock-out* para el transportador de dopamina en los que se aumentan los niveles extracelulares de este neurotransmisor, muestran incrementos en la expresión de FosB, así como aumentos en la motivación por el estímulo apetitivo (Cagniard et al., 2006). Por su parte, Wallace y colaboradores (2008) observaron que la exposición repetida a estímulos apetitivos como el sexo o el agua azucarada aumenta la expresión de DFosB en las áreas *core* y *shell* del NAc. Además, encontraron que la sobreexpresión de DFosB en esta misma estructura aumenta el consumo de agua azucarada y promueve aspectos de la conducta sexual. Finalmente, Pitchers y colaboradores (2013) observaron en sujetos experimentados sexualmente, es decir que fueron expuestos a sesiones de apareamiento de manera repetida, una regulación al alta de DFosB y un incremento en el número de espinas dendríticas en las regiones *shell* y *core* del NAc. Además, estos autores mostraron que dichos efectos pueden ser bloqueados de manera farmacológica mediante la infusión de antagonistas para el receptor D1 en el NAc.

Hasta donde sabemos, no existen trabajos que muestren incrementos en la expresión de FosB/DFosB en respuesta a claves asociadas a un estímulo apetitivo particular. Sin embargo, en un estudio temprano Pich y colaboradores (1997) mostraron incrementos en la actividad de antígenos relacionados con Fos en áreas límbicas como el NAc *core* y *shell*, la amígdala y el caudado putamen (parte medial), en ratas entrenadas para presionar una palanca independientemente de la infusión que recibieran (salina, nicotina o cocaína), en comparación con ratas que nunca fueron entrenadas para esta tarea.

A pesar de que no ha sido planteada en la literatura previa una relación entre la expresión de FosB/DFosB y el *sign tracking* o la saliencia de incentivo, hay estudios que muestran que dicho comportamiento depende de la transmisión dopaminérgica del área *core* del núcleo accumbens (Flagel et al., 2011b; Fraser y Janak, 2017), así como del adecuado funcionamiento de los receptores dopaminérgicos D1 (Clark et al., 2013; Macpherson e Hikida, 2018). En este mismo sentido, Phillips y colaboradores (2003) mostraron una asociación entre la respuesta de aproximación condicionada al EC y la activación de las terminales dopaminérgicas en el NAc en las primeras etapas del entrenamiento. Esta evidencia permite sugerir que los incrementos en la expresión de FosB/DFosB observados en este estudio podrían ser estar asociados a la acción conjunta de

la nicotina crónica y del entrenamiento de automoldeamiento al que fueron expuestos los animales considerando que ambos están relacionados con el funcionamiento de las neuronas dopaminérgicas del NAc.

Ahora bien, evidencia previa muestra que la exposición a un estímulo apetitivo puede influenciar la respuesta hacia otro estímulo apetitivo y que este proceso de sensibilización cruzada parece estar relacionado con la expresión de DFosB en el NAc. Por ejemplo, Wallace y colaboradores (2008) observaron que animales expuestos de manera repetida a actividad sexual, tratamiento que incrementa los niveles de DFosB, bebieron más agua azucarada que animales no expuestos a dicha experiencia, mostrando que la exposición previa a un estímulo apetitivo como el sexo afectó significativamente las respuestas de aproximación hacia otro (agua azucarada). Esto sugiere que el valor percibido de los estímulos apetitivos actuales está construido sobre exposiciones a recompensas pasadas. En otro estudio, Pitchers y colaboradores (2013) mostraron que sujetos expuestos de manera repetida a una actividad sexual mostraban una preferencia por el lado emparejado con anfetamina en un procedimiento de preferencia condicionada de lugar aun con dosis bajas, sugiriendo una sensibilización cruzada entre estímulos apetitivos naturales y drogas. En este estudio se observó además que el bloqueo de los receptores D1 o de la actividad de DFosB en el núcleo accumbens durante los encuentros de apareamiento eliminaron la sensibilización hacia la anfetamina inducida por la experiencia sexual. Los autores concluyen sugiriendo que la saliencia de incentivo de ambos estímulos apetitivos depende de los mismos mecanismos neurales y mediadores moleculares.

En el presente estudio la exposición continua a la nicotina durante el entrenamiento de automoldeamiento produjo en los animales una mayor motivación para interactuar con el estímulo condicionado en comparación con los animales que recibieron solución salina durante el entrenamiento. Este efecto podría estar mediado por la activación de mecanismos plásticos relacionados con la activación del factor de transcripción FosB/DFosB. Olausson y colaboradores (2006) observaron que sujetos a los que se les indujo sobreexpresión de DFosB en el núcleo accumbens mostraban un aumento en la conducta instrumental de palanqueo reforzada por comida y las respuestas en un programa de razón progresiva. Curiosamente, este aumento también se observó en sujetos expuestos de manera repetida a

drogas de abuso como la nicotina, sugiriendo que la sobreexpresión de DFosB en esta área puede aumentar el valor motivacional de reforzadores naturales y drogas. Si bien en el estudio de Olausson se utiliza un procedimiento de condicionamiento operante en el cual la presión de la palanca da acceso al reforzador, se sabe que en este tipo de procedimientos los animales establecen relaciones pavlovianas entre el reforzador y la palanca (Rescorla y Solomon, 1967). De esta forma, el hecho de que en el presente estudio el tratamiento con nicotina haya producido incrementos específicos en la interacción de los animales con la palanca y no con el comedero, sugiere que esta droga aumentó la saliencia de incentivo de la palanca en tanto estímulo predictor de la presencia del EI y que este efecto podría estar mediado por la acción del factor de transcripción FosB/DFosB en las regiones *shell* y *core* del NAc. Así, es posible proponer que la exposición continua a la nicotina pudo haber facilitado los procesos plásticos responsables por el establecimiento de relaciones pavlovianas entre la palanca y el alimento por medio de la acción acumulativa del factor de transcripción FosB/DFosB.

Por su parte, la corteza orbitofrontal (COF) está involucrada en la codificación de información asociativa, lo que hace de esta estructura un área clave para guiar la conducta a partir de resultados específicos (Schoenbaum et al., 2011; Panayi y Killcross, 2021). Aunque se ha planteado repetidamente que esta área no está directamente involucrada en la adquisición del aprendizaje asociativo (Gallagher et al., 1999; Ostlund y Balleine, 2007; Schoenbaum et al., 2009; Chang, 2014), autores como Chudasama y Robbins (2003) mostraron que después de una lesión en la COF se produjo un déficit en la adquisición de la respuesta de aproximación al estímulo condicionado en una tarea de automoldeamiento, lo que sugiere un déficit en el establecimiento de la relación pavloviana entre EC-EI.

Recientemente se ha propuesto que la COF podría estar mediando la adquisición de la saliencia de incentivo, un proceso en el cual los estímulos predictores del refuerzo se hacen atractivos elicitando comportamientos de acercamiento hacia estos (Flagel et al., 2009). En este sentido, Flagel y colaboradores (2011a) observaron que sujetos clasificados como *sign trackers* presentaban aumentos en la expresión de ARNm para la proteína c-Fos en regiones posteriores de la COF tras la presentación de una clave asociada a un estímulo apetitivo de tipo alimenticio. Este resultado no fue observado en los animales *goal trackers*

ni en el grupo que recibió presentaciones no emparejadas del EC y el EI, lo que sugiere que la COF está involucrada en la asignación del valor de incentivo que media la conducta de los animales *sign trackers*. En este mismo sentido, Panayi y Killcross (2018) observaron que lesiones en regiones posteriores de la COF lateral realizadas antes de la adquisición del condicionamiento, provocaron un menor acercamiento hacia la palanca (*sign tracking*), pero no hacia el comedero (*goal tracking*), sugiriendo que estas lesiones dificultan la adquisición de saliencia de incentivo por parte del EC. Finalmente, Stringfield y colaboradores (2017) observaron que la inactivación de la COF disminuyó el comportamiento de *sign tracking*, sugiriendo que esta estructura no solo media la adquisición de este comportamiento, sino también su expresión.

En este experimento no se observaron incrementos en la expresión de FosB/DFosB en la corteza orbitofrontal de los animales tratados con vehículo durante el entrenamiento de la tarea de automoldeamiento, en comparación con el grupo control. Es importante recordar que en el presente experimento fueron utilizados únicamente los animales que fueron previamente clasificados como *sign trackers*, lo que permite suponer que, aunque las ratas tratadas con salina atribuyeron saliencia de incentivo a la palanca, estas lo hicieron en una menor medida en comparación con los animales tratados con nicotina, como lo muestran los resultados de palanqueo y de sesgo de respuesta. Este resultado aparentemente contradictorio con los resultados presentados por Flagel y colaboradores (2011a) puede atribuirse a las diferencias en los biomarcadores utilizados. Nestler y colaboradores (2001) muestran que la proteína c-Fos aumenta su expresión principalmente ante eventos agudos y su pico es de corta duración, mientras que el factor de transcripción DFosB tiende a acumularse con el tiempo tras la exposición a eventos crónicos. Así, es posible que la mera exposición al entrenamiento de automoldeamiento no haya sido suficiente para producir aumentos significativos en la expresión de esta proteína, mientras que la acción conjunta de la nicotina y el entrenamiento sí. Esta teoría tiene sentido a la luz de los resultados comportamentales previamente descritos donde se observa que el grupo de nicotina tiene niveles más altos de palanqueo y un mayor sesgo de respuesta hacia la palanca, lo que sugiere un aumento en la saliencia de incentivo hacia esta. Esta conclusión se apoya en los resultados descritos por Stringfield y colaboradores (2017) quienes muestran que la

nicotina aumenta el número de palanqueos (*sign tracking*), pero si se inactiva la COF dicho efecto se ve disminuido, sugiriendo que la función de esta estructura durante el *sign tracking* sería la de representar la asociación entre la clave y la consecuencia esperada y que la nicotina actuaría directa o indirectamente sobre esta estructura influenciando su funcionamiento.

La corteza orbitofrontal es una estructura que ha sido ampliamente estudiada en procesos de adicción a las drogas (Schoenbaum y Shaham, 2008). Estudios como el de Hutcherson y Everitt (2003) muestran que la COF regula la expresión de las respuestas de búsqueda de cocaína controladas por claves. Resultados similares fueron encontrados por Fuchs y colaboradores (2004) quienes entrenaron ratas Sprague Dawley en un protocolo de autoadministración, donde la infusión de cocaína estaba emparejada con una clave. Después de un proceso de extinción, se observó que la inactivación de la región lateral de la COF produjo dificultades en el restablecimiento de la búsqueda de cocaína inducida por la clave, sugiriendo que la integridad de esta estructura es necesaria para el almacenamiento y la utilización de la información sobre el significado motivacional de los estímulos emparejados con cocaína. De manera complementaria, Guillem y Ahmed (2016) y Baeg y colaboradores (2020) observaron que distintas poblaciones de células de la COF codifican de manera selectiva conductas reforzadas o claves asociadas a la entrega de cocaína. Estos resultados confirman la participación de esta estructura en procesos de aprendizaje reforzados por drogas de abuso. La literatura sobre el papel de esta estructura en el aprendizaje de asociaciones entre claves ambientales y nicotina es más escasa. Estudios con humanos han mostrado que los fumadores tienen una mayor activación de la COF ante la presentación de claves asociadas al cigarrillo (Brody et al, 2002; Claus et al., 2013). Del mismo modo, estudios con modelos animales muestran que ratas que recibieron inyecciones de nicotina en un ambiente específico por dos semanas, presentaban incrementos en los niveles de ARNm para la proteína Arc en la corteza orbitofrontal cuando eran expuestas al ambiente previamente emparejado con nicotina, sugiriendo que la exposición a claves asociadas con la nicotina resulta en cambios plásticos estructurales en esta región (Schiltz et al., 2005). Hasta donde se sabe, no hay información que relacione la inducción del factor de transcripción DFosB en la corteza orbitofrontal con la

administración de nicotina o con estímulos asociados con su presentación, aunque existen trabajos que muestran cambios en la expresión de esta proteína en la COF en respuesta al tratamiento con drogas estimulantes como la cocaína (Winstanley et al., 2007).

Finalmente, entre los resultados encontrados en el presente estudio no se observaron diferencias en ninguna de las subregiones de la amígdala en la expresión de FosB/DFosB entre los grupos. La amígdala central (AC) ha sido una estructura ampliamente estudiada en el automoldeamiento. Por ejemplo, se ha mostrado que lesionar esta estructura impide la adquisición, pero no la expresión de la respuesta condicionada de aproximación hacia un estímulo visual (Parkinson et al., 2000; Cardinal et al., 2002b). Contrario a esto, Hall y colaboradores (2001) observaron que la adquisición de la respuesta condicionada de entrada al comedero no se vio afectada tras una lesión en la AC. Estudios más recientes donde se utiliza una palanca como estímulo condicionado han mostrado resultados similares, indicando que la lesión de esta estructura no tiene efectos sobre el *sign tracking* (Chang et al., 2012a; Naeem y White, 2016). En este sentido, se ha propuesto que la amígdala central está involucrada en respuestas de orientación, pero no en respuestas condicionadas (Gallagher et al., 1990; Hatfield et al., 1996; Groshek et al., 2005). Esto podría explicar por qué el deterioro comportamental solo se observa en el estudio que utiliza un estímulo condicionado visual, donde la respuesta implica solamente la aproximación, pero no en otros estudios, donde la respuesta condicionada implica la interacción del sujeto con el EC. En conjunto, esto sugiere que esta estructura no está implicada en el *sign tracking*. Esta afirmación es soportada por otros estudios en los que no se observan diferencias en la expresión de Fos y los niveles de ARNm para c-Fos en la amígdala central de animales clasificados como *sign trackers* tras ser expuestos a una clave previamente emparejada con un estímulo apetitivo de tipo alimenticio en una tarea de automoldeamiento (Flagel et al., 2011a; Yager et al., 2015). Así, tiene sentido que al no ser una estructura clave para el *sign tracking*, no se encontraran diferencias en la expresión de FosB/DFosB en la AC.

Contrario a la amígdala central, el papel de la amígdala basolateral (ABL) en la asignación de saliencia de incentivo no es tan claro. La evidencia muestra que la ABL no es necesaria para el aprendizaje inicial de las asociaciones apetitivas. Por ejemplo, se ha

mostrado que lesionar esta estructura no afecta la adquisición de la respuesta condicionada de aproximación hacia un estímulo visual, un comedero o una palanca tras un procedimiento de automoldeamiento (Hatfield et al., 1996; Parkinson et al., 2000; Hall et al., 2001; Blundell et al., 2003). En este sentido, Chang y colaboradores (2012b) reportaron que la lesión de la ABL produce un déficit en el *sign tracking* después de que la conducta es adquirida, sugiriendo que esta estructura aumenta la saliencia de incentivo una vez esta es adquirida. Adicionalmente, Flagel y colaboradores (2011a) mostraron que tras la exposición a una clave previamente asociada con un estímulo apetitivo de tipo alimenticio no hay diferencias en los niveles de ARNm para c-Fos en esta área entre *sign trackers*, *goal trackers* y el grupo al que se le presentaron los estímulos de manera no emparejada. Sin embargo, Yager y colaboradores (2015) encontraron aumentos en la expresión de Fos en la ABL en los *sign trackers* en comparación con los *goal trackers*. Los resultados del presente estudio replican lo observado por Flagel y colaboradores al no haber encontrado diferencias en la expresión de FosB/DFosB entre los grupos.

En conjunto toda esta evidencia muestra que la ABL no está involucrada en las fases iniciales de la adquisición de saliencia. No obstante, esto no implica que la ABL no esté involucrada en absoluto en dicho proceso, pues parece que esta estructura está guiando procedimientos que siguen a la adquisición de las asociaciones apetitivas (Keefer et al., 2021). Por ejemplo, se ha observado que la ABL es necesaria para procedimientos de transferencia pavloviana-instrumental y condicionamiento de segundo orden (Hatfield et al., 1996; Corbit y Balleine, 2005; Holland, 2016), procedimientos que permiten evaluar otras propiedades de la saliencia de incentivo (Flagel et al., 2009).

Es bien sabido que las claves asociadas a drogas o estímulos apetitivos naturales como la comida pueden adquirir saliencia de incentivo generando atracción hacia estas (Robinson y Berridge, 2008). Más recientemente, se ha propuesto que la adquisición de saliencia de incentivo puede ser afectada por la administración repetida no contingente de nicotina (Palmatier et al., 2013, Versaggi et al., 2016; Stringfield et al., 2017, 2019). En el presente estudio se observaron niveles más altos de *sign tracking* y de sesgo de respuesta en el grupo que fue expuesto a nicotina durante el entrenamiento en comparación con el grupo expuesto a salina. Estos resultados coinciden con los efectos potenciadores de la

nicotina sobre la saliencia de incentivo de claves asociadas a estímulos alimenticios previamente descritos. De manera complementaria, se reportó que la acción conjunta de la nicotina y la tarea de automoldeamiento incrementó la expresión de FosB/DFosB en áreas relacionadas con la saliencia de incentivo como el núcleo accumbens y la corteza orbitofrontal. En conjunto, es posible sugerir que las alteraciones comportamentales observadas en el grupo expuesto a nicotina son el resultado de cambios plásticos en el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico y que estos cambios están siendo mediados por el factor de transcripción FosB/DfosB. Finalmente, aunque no es claro cuál de los genes objetivo de DfosB estaría involucrado en estos cambios, un posible candidato es la proteína quinasa Cdk5, pues se ha reportado que esta proteína aumenta como resultado de la sobreexpresión de DFosB y ha sido asociada con cambios plásticos a través de su acción sobre diferentes vías de señalización (Bibb, 2003). De manera complementaria, Cdk5 ha mostrado producir cambios a nivel cerebral tras la administración repetida de drogas. Algunos de los cambios reportados están relacionados la regulación de la actividad dopaminérgica (Bibb et al., 2001; Benavides et al., 2007) y aumentos en la densidad dendrítica (Norrholm et al., 2003). Esto hace de Cdk5 una proteína relevante para futuras investigaciones.

### **Consideraciones metodológicas y perspectivas futuras**

Una característica interesante del presente estudio es que la clasificación y el uso de *sign trackers* representa una ventaja frente a publicaciones previas interesadas en conocer el papel de la administración no contingente de nicotina en la atribución de saliencia de incentivo hacia claves asociadas a estímulo apetitivo de tipo alimenticios. Esto permite clarificar la idea de que la nicotina es un potenciador de la saliencia de incentivo. No obstante, esto no brinda una idea completa de los alcances de la nicotina en este paradigma. Teniendo en cuenta esto, futuras investigaciones podrían evaluar si este efecto se replica con otros fenotipos. Con base en estudios previos que muestran que manipulaciones como la privación alimenticia pueden cambiar la expresión del fenotipo de los sujetos (Sparber et al, 1991; Naeem, 2016; Serrano-Barroso et al., 2019), sería especialmente interesante evaluar si la administración crónica no contingente de nicotina puede facilitar la

adquisición de la conducta de *sign tracking*, haciendo que animales inicialmente clasificados como intermedios se vuelvan *sign trackers*. Aunque en el presente estudio se pudieron clasificar algunos animales como intermedios, el número de sujetos (n=7) era muy pequeño para determinar los efectos de la nicotina en las conductas de *sign* o *goal tracking*.

Una de las sugerencias expuestas en el presente estudio, es que el aumento en la conducta de *sign tracking* de los animales tratados con nicotina es producto de procesos plásticos mediados por la proteína quinasa Cdk5, un gen objetivo del factor de transcripción DFosB que se vio incrementado en estos sujetos en estructuras clave para la atribución de saliencia de incentivo. En este sentido sería interesante replicar los aumentos observados de la expresión de FosB/DFosB utilizando otras técnicas moleculares como *western blot* o PCR cuantitativa en tiempo real. Adicionalmente, futuras investigaciones podrían utilizar un protocolo similar al presentado en este documento y cuantificar la inducción de la proteína quinasa Cdk5 en estructuras como el núcleo accumbens y la corteza orbitofrontal. Esto con el objetivo de poner a prueba dicha hipótesis y conocer más acerca del mecanismo utilizado por la nicotina para potenciar la saliencia de incentivo.

Este estudio muestra cómo la nicotina puede afectar la respuesta de un sujeto *sign tracker* ante la presentación de una clave asociada con comida, lo que permite comprender cómo la nicotina podría estar afectando el funcionamiento de los circuitos encargados de la motivación y la asignación de saliencia de incentivo. Estos resultados podrían contribuir a entender el papel de la nicotina como droga de entrada en personas que tienen una vulnerabilidad hacia las drogas. Recientemente se han publicado estudios que muestran que la administración repetida de nicotina aumenta la respuesta de *goal tracking* en un paradigma de automoldeamiento donde se empareja una palanca (EC) con etanol (EI) (Loney et al., 2019; Angelyn et al., 2021). Sin embargo, en estas publicaciones no se tuvo en cuenta el fenotipo de los sujetos, lo que podría estar sesgando los resultados encontrados. Futuras investigaciones podrían evaluar el efecto de la nicotina en un paradigma de automoldeamiento con etanol en animales clasificados como *sign trackers* o intermedios. En este mismo sentido, sería interesante ver cómo la nicotina actúa en interacción con otras drogas de abuso como cocaína o anfetamina.

## Referencias

Alajaji, M., Lazenka, M. F., Kota, D., Wise, L. E., Younis, R. M., Carroll, F. I., Levine, A., Selley, D. E., Sim-Selley, L. J., & Damaj, M. I. (2016). Early adolescent nicotine exposure affects later-life cocaine reward in mice. *Neuropharmacology*, *105*, 308–317. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.01.032>

Alkondon, M., Pereira, E. F., Eisenberg, H. M., & Albuquerque, E. X. (1999). Choline and selective antagonists identify two subtypes of nicotinic acetylcholine receptors that modulate GABA release from CA1 interneurons in rat hippocampal slices. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, *19*(7), 2693–2705. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-07-02693.1999>

Angelyn, H., Loney, G. C., & Meyer, P. J. (2021). Nicotine Enhances Goal-Tracking in Ethanol and Food Pavlovian Conditioned Approach Paradigms. *Frontiers in neuroscience*, *15*, 561766. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.561766>

Baeg, E., Jedema, H. P., & Bradberry, C. W. (2020). Orbitofrontal cortex is selectively activated in a primate model of attentional bias to cocaine cues. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *45*(4), 675–682. <https://doi.org/10.1038/s41386-019-0499-0>

Balfour D.J.K. (2015) The Role of Mesoaccumbens Dopamine in Nicotine Dependence. en: Balfour D., Munafò M. (eds) *The Neuropharmacology of Nicotine Dependence. Current Topics in Behavioral Neurosciences*, vol 24 (pp. 55-98). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-13482-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-13482-6_3)

Benavides, D. R., Quinn, J. J., Zhong, P., Hawasli, A. H., DiLeone, R. J., Kansy, J. W., Olausson, P., Yan, Z., Taylor, J. R., & Bibb, J. A. (2007). Cdk5 modulates cocaine reward, motivation, and striatal neuron excitability. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *27*(47), 12967–12976. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4061-07.2007>

- Besheer, J., & Bevins, R. A. (2003). Impact of nicotine withdrawal on novelty reward and related behaviors. *Behavioral Neuroscience*, *117*(2), 327–340.  
<https://doi.org/10.1037/0735-7044.117.2.327>
- Berridge, K. C. (2000). Reward learning: Reinforcement, incentives, and expectations. *Psychology of Learning and Motivation*, *40*, 223–278.  
[https://doi.org/10.1016/S0079-7421\(00\)80022-5](https://doi.org/10.1016/S0079-7421(00)80022-5)
- Berridge, K. C., & Robinson, T. E. (1998). What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience?. *Brain research. Brain research reviews*, *28*(3), 309–369. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(98\)00019-8](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(98)00019-8)
- Bevins, R. A., & Palmatier, M. I. (2004). Extending the role of associative learning processes in nicotine addiction. *Behavioral and cognitive neuroscience reviews*, *3*(3), 143–158. <https://doi.org/10.1177/1534582304272005>
- Bibb, J. A., Chen, J., Taylor, J. R., Svenningsson, P., Nishi, A., Snyder, G. L., Yan, Z., Sagawa, Z. K., Ouimet, C. C., Nairn, A. C., Nestler, E. J., & Greengard, P. (2001). Effects of chronic exposure to cocaine are regulated by the neuronal protein Cdk5. *Nature*, *410*(6826), 376–380. <https://doi.org/10.1038/35066591>
- Bibb J. A. (2003). Role of Cdk5 in neuronal signaling, plasticity, and drug abuse. *Neuro-Signals*, *12*(4-5), 191–199. <https://doi.org/10.1159/000074620>
- Bindra D. (1974). A motivational view of learning, performance, and behavior modification. *Psychological review*, *81*(3), 199–213. <https://doi.org/10.1037/h0036330>
- Bindra, D. (1978). How adaptive behavior is produced: A perceptual-motivational alternative to response reinforcements. *Behavioral and Brain Sciences*, *1*(1), 41-52.  
[doi:10.1017/S0140525X00059380](https://doi.org/10.1017/S0140525X00059380)
- Blundell, P., Hall, G., & Killcross, S. (2003). Preserved sensitivity to outcome value after lesions of the basolateral amygdala. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *23*(20), 7702–7709.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-20-07702.2003>
- Boakes, R. A. (1977). *Performance on learning to associate a stimulus with positive reinforcement. Operant-pavlovian interactions*. In H. David & H. M. B. Hurwitz (Eds.), *Operant-Pavlovian interactions* (pp. 67-101). Hillsdale, NJ: Erlbaum.

- Bolles, R. C. (1972). Reinforcement, expectancy, and learning. *Psychological Review*, 79(5), 394–409. <https://doi.org/10.1037/h0033120>
- Brody, A. L., Mandelkern, M. A., London, E. D., Childress, A. R., Lee, G. S., Bota, R. G., Ho, M. L., Saxena, S., Baxter, L. R., Jr, Madsen, D., & Jarvik, M. E. (2002). Brain metabolic changes during cigarette craving. *Archives of general psychiatry*, 59(12), 1162–1172. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.59.12.1162>
- Brown, P. L., & Jenkins, H. M. (1968). AUTO-SHAPING OF THE PIGEON'S KEY-PECK 1. *Journal of the experimental analysis of behavior*, 11(1), 1-8.
- Brown, R.W., & Kolb, B. (2001). Nicotine sensitization increases dendritic length and spine density in the nucleus accumbens and cingulate cortex. *Brain Research*, 899, 94-100. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02201-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02201-6)
- Brynildsen, J. K., Najjar, J., Hsu, L. M., Vaupel, D. B., Lu, H., Ross, T. J., Yang, Y., & Stein, E. A. (2016). A novel method to induce nicotine dependence by intermittent drug delivery using osmotic minipumps. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 142, 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2015.12.010>
- Caggiula, A. R., Donny, E. C., Palmatier, M. I., Liu, X., Chaudhri, N., & Sved, A. F. (2009). The role of nicotine in smoking: a dual-reinforcement model. *Nebraska Symposium on Motivation.*, 55, 91–109. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-78748-0\\_6](https://doi.org/10.1007/978-0-387-78748-0_6)
- Cagniard, B., Balsam, P. D., Brunner, D., & Zhuang, X. (2006). Mice with chronically elevated dopamine exhibit enhanced motivation, but not learning, for a food reward. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 31(7), 1362–1370. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300966>
- Cardinal, R. N., Parkinson, J. A., Hall, J., & Everitt, B. J. (2002a). Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 26(3), 321–352. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(02\)00007-6](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(02)00007-6)
- Cardinal, R. N., Parkinson, J. A., Lachenal, G., Halkerston, K. M., Rudarakanchana, N., Hall, J., Morrison, C. H., Howes, S. R., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (2002b). Effects of selective excitotoxic lesions of the nucleus accumbens core, anterior cingulate

cortex, and central nucleus of the amygdala on autoshaping performance in rats. *Behavioral neuroscience*, 116(4), 553–567. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.116.4.553>

Chang, S. E., Wheeler, D. S., & Holland, P. C. (2012a). Effects of lesions of the amygdala central nucleus on autoshaped lever pressing. *Brain research*, 1450, 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.02.029>

Chang, S. E., Wheeler, D. S., & Holland, P. C. (2012b). Roles of nucleus accumbens and basolateral amygdala in autoshaped lever pressing. *Neurobiology of learning and memory*, 97(4), 441–451. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2012.03.008>

Chang S. E. (2014). Effects of orbitofrontal cortex lesions on autoshaped lever pressing and reversal learning. *Behavioural brain research*, 273, 52–56. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.029>

Chen, J., Kelz, M. B., Hope, B. T., Nakabeppu, Y., & Nestler, E. J. (1997). Chronic Fos-related antigens: stable variants of deltaFosB induced in brain by chronic treatments. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(13), 4933–4941. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-13-04933.1997>

Chudasama, Y., & Robbins, T. W. (2003). Dissociable contributions of the orbitofrontal and infralimbic cortex to pavlovian autoshaping and discrimination reversal learning: further evidence for the functional heterogeneity of the rodent frontal cortex. *Journal of Neuroscience*, 23(25), 8771–878. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-25-08771.2003>

Clark, J. J., Collins, A. L., Sanford, C. A., & Phillips, P. E. (2013). Dopamine encoding of Pavlovian incentive stimuli diminishes with extended training. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(8), 3526–3532. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5119-12.2013>

Claus, E. D., Blaine, S. K., Filbey, F. M., Mayer, A. R., & Hutchison, K. E. (2013). Association between nicotine dependence severity, BOLD response to smoking cues, and functional connectivity. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 38(12), 2363–2372. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.134>

- Corbit, L. H., & Balleine, B. W. (2005). Double dissociation of basolateral and central amygdala lesions on the general and outcome-specific forms of pavlovian-instrumental transfer. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(4), 962–970. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4507-04.2005>
- Corrigall, W. A., & Coen, K. M. (1989). Nicotine maintains robust self-administration in rats on a limited-access schedule. *Psychopharmacology*, 99, 473-478. <https://doi.org/10.1007/BF00589894>
- Costa, D. S., & Boakes, R. A. (2009). Context blocking in rat autoshaping: Sign-tracking versus goal-tracking. *Learning and Motivation*, 40(2), 178-185. <https://doi.org/10.1016/j.lmot.2008.11.001>
- Dandekar, M. P., Nakhate, K. T., Kokare, D. M., & Subhedar, N. K. (2011). Effect of nicotine on feeding and body weight in rats: involvement of cocaine- and amphetamine-regulated transcript peptide. *Behavioural brain research*, 219(1), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.12.007>
- Dani, J. A., & De Biasi, M. (2001). Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 70(4), 439–446. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(01\)00652-9](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(01)00652-9)
- Dao, J. M., McQuown, S. C., Loughlin, S. E., Belluzzi, J. D., & Leslie, F. M. (2011). Nicotine alters limbic function in adolescent rat by a 5-HT1A receptor mechanism. *Neuropsychopharmacology*, 36(7), 1319–1331. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.8>
- Day, J. J., Roitman, M. F., Wightman, R. M., & Carelli, R. M. (2007). Associative learning mediates dynamic shifts in dopamine signaling in the nucleus accumbens. *Nature neuroscience*, 10(8), 1020–1028. <https://doi.org/10.1038/nn1923>
- Di Chiara, G., Acquas, E., & Carboni, E. (1992). Drug motivation and abuse: a neurobiological perspective. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 654, 207–219. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb25969.x>
- Donny, E.C., Caggiula, A.R., Knopf, S. et al. Nicotine self-administration in rats. *Psychopharmacology*, 122, 390–394 (1995). <https://doi.org/10.1007/BF02246272>
- Ehlinger, D. G., Bergstrom, H. C., Burke, J. C., Fernandez, G. M., McDonald, C. G., & Smith, R. F. (2016). Adolescent nicotine-induced dendrite remodeling in the nucleus

accumbens is rapid, persistent, and D1-dopamine receptor dependent. *Brain structure & function*, 221(1), 133–145. <https://doi.org/10.1007/s00429-014-0897-3>

Ehlinger, D. G., Burke, J. C., McDonald, C. G., Smith, R. F., & Bergstrom, H. C. (2017). Nicotine-induced and D1-receptor-dependent dendritic remodeling in a subset of dorsolateral striatum medium spiny neurons. *Neuroscience*, 356, 242–254. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.05.036>

Ehrlich, M. E., Sommer, J., Canas, E., & Unterwald, E. M. (2002). Periadolescent mice show enhanced DeltaFosB upregulation in response to cocaine and amphetamine. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(21), 9155–9159. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-21-09155.2002>

Faure, P., Tolu, S., Valverde, S., & Naudé, J. (2014). Role of nicotinic acetylcholine receptors in regulating dopamine neuron activity. *Neuroscience*, 282, 86–100. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.05.040>

Flagel, S. B., Watson, S. J., Robinson, T. E., & Akil, H. (2007). Individual differences in the propensity to approach signals vs goals promote different adaptations in the dopamine system of rats. *Psychopharmacology*, 191(3), 599–607. <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0535-8>

Flagel, S. B., Akil, H., & Robinson, T. E. (2009). Individual differences in the attribution of incentive salience to reward-related cues: Implications for addiction. *Neuropharmacology*, 56, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.06.027>

Flagel, S. B., Robinson, T. E., Clark, J. J., Clinton, S. M., Watson, S. J., Seeman, P., Phillips, P. E., & Akil, H. (2010). An animal model of genetic vulnerability to behavioral disinhibition and responsiveness to reward-related cues: implications for addiction. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(2), 388–400. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.142>

Flagel, S. B., Cameron, C. M., Pickup, K. N., Watson, S. J., Akil, H., & Robinson, T. E. (2011a). A food predictive cue must be attributed with incentive salience for it to induce c-fos mRNA expression in cortico-striatal-thalamic brain regions. *Neuroscience*, 196, 80–96. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.09.004>

Flagel, S. B., Clark, J. J., Robinson, T. E., Mayo, L., Czuj, A., Willuhn, I., Akers, C. A., Clinton, S. M., Phillips, P. E., & Akil, H. (2011b). A selective role for dopamine in stimulus-reward learning. *Nature*, *469*(7328), 53–57. <https://doi.org/10.1038/nature09588>

Fraser, K. M., & Janak, P. H. (2017). Long-lasting contribution of dopamine in the nucleus accumbens core, but not dorsal lateral striatum, to sign-tracking. *The European journal of neuroscience*, *46*(4), 2047–2055. <https://doi.org/10.1111/ejn.13642>

Fuchs, R. A., Evans, K. A., Parker, M. P., & See, R. E. (2004). Differential involvement of orbitofrontal cortex subregions in conditioned cue-induced and cocaine-primed reinstatement of cocaine seeking in rats. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, *24*(29), 6600–6610. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1924-04.2004>

Fudala, P. J., & Iwamoto, E. T. (1986). Further studies on nicotine-induced conditioned place preference in the rat. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, *25*, 1041–1049. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(86\)90083-3](https://doi.org/10.1016/0091-3057(86)90083-3)

Fujii, S., Ji, Z., Morita, N., & Sumikawa, K. (1999). Acute and chronic nicotine exposure differentially facilitate the induction of LTP. *Brain Research*, *846*(1), 137–143. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)01982-4](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)01982-4)

Gallagher, M., Graham, P. W., & Holland, P. C. (1990). The amygdala central nucleus and appetitive Pavlovian conditioning: lesions impair one class of conditioned behavior. *Journal of Neuroscience*, *10*(6), 1906–1911.

Gallagher, M., McMahan, R. W., & Schoenbaum, G. (1999). Orbitofrontal cortex and representation of incentive value in associative learning. *Journal of Neuroscience*, *19*(15), 6610–6614. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-15-06610.1999>

Gotti, C., Clementi, F., Fornari, A., Gaimarri, A., Guiducci, S., Manfredi, I., Moretti, M., Pedrazzi, P., Pucci, L., & Zoli, M. (2009). Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochemical Pharmacology*, *78*(7), 703–711. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.05.024>

Groshek, F., Kerfoot, E., McKenna, V., Polackwich, A. S., Gallagher, M., & Holland, P. C. (2005). Amygdala Central Nucleus Function Is Necessary for Learning, but

Not Expression, of Conditioned Auditory Orienting. *Behavioral Neuroscience*, 119(1), 202–212. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.119.1.202>

Guillem, K., & Ahmed, S. H. (2016). Proportion of cocaine-coding neurons in the orbitofrontal cortex determines individual drug preferences. *bioRxiv*, 050872. <https://doi.org/10.1101/050872>

Hall, J., Parkinson, J. A., Connor, T. M., Dickinson, A., & Everitt, B. J. (2001). Involvement of the central nucleus of the amygdala and nucleus accumbens core in mediating Pavlovian influences on instrumental behaviour. *The European journal of neuroscience*, 13(10), 1984–1992. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01577.x>

Hart G., Balleine B. (2017) *Medial Striatum*. In: Vonk J., Shackelford T. (eds) *Encyclopedia of Animal Cognition and Behavior*. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6\\_1288-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-47829-6_1288-1)

Hatfield, T., Han, J. S., Conley, M., Gallagher, M., & Holland, P. (1996). Neurotoxic lesions of basolateral, but not central, amygdala interfere with Pavlovian second-order conditioning and reinforcer devaluation effects. *Journal of Neuroscience*, 16(16), 5256-5265.

Hearst, E., & Jenkins, H. M. (1974). Sign-tracking: The stimulus-reinforcer relation and directed action. *Austin: Psychonomic Society*.

Holland P. C. (2016). Enhancing second-order conditioning with lesions of the basolateral amygdala. *Behavioral neuroscience*, 130(2), 176–181. <https://doi.org/10.1037/bne0000129>

Hutcheson, D. M., & Everitt, B. J. (2003). The effects of selective orbitofrontal cortex lesions on the acquisition and performance of cue-controlled cocaine seeking in rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1003, 410–411. <https://doi.org/10.1196/annals.1300.038>

Kandel, E. R., & Kandel, D. B. (2014). Shattuck Lecture. A molecular basis for nicotine as a gateway drug. *The New England journal of medicine*, 371(10), 932–943. <https://doi.org/10.1056/NEJMsa1405092>

Keefer, S. E., Gyawali, U., & Calu, D. J. (2021). Choose your path: Divergent basolateral amygdala efferents differentially mediate incentive motivation, flexibility and

decision-making. *Behavioural Brain Research*, 409, 113306.

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113306>

Kelz, M. B., Chen, J., Carlezon, W. A., Jr, Whisler, K., Gilden, L., Beckmann, A. M., Steffen, C., Zhang, Y. J., Marotti, L., Self, D. W., Tkatch, T., Baranauskas, G., Surmeier, D. J., Neve, R. L., Duman, R. S., Picciotto, M. R., & Nestler, E. J. (1999). Expression of the transcription factor deltaFosB in the brain controls sensitivity to cocaine. *Nature*, 401(6750), 272–276. <https://doi.org/10.1038/45790>

Kelz, M. B., & Nestler, E. J. (2000). deltaFosB: a molecular switch underlying long-term neural plasticity. *Current opinion in neurology*, 13(6), 715–720.

<https://doi.org/10.1097/00019052-200012000-00017>

Kolokotroni, K. Z., Rodgers, R. J., & Harrison, A. A. (2012). Effects of chronic nicotine, nicotine withdrawal and subsequent nicotine challenges on behavioural inhibition in rats. *Psychopharmacology*, 219, 453–468. <https://doi.org/10.1007/s00213-011-2558-z>

Levin, E. D., Morgan, M. M., Galvez, C., & Ellison, G. D. (1987). Chronic nicotine and withdrawal effects on body weight and food and water consumption in female rats. *Physiology & behavior*, 39(4), 441–444. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(87\)90370-2](https://doi.org/10.1016/0031-9384(87)90370-2)

Levine, A., Huang, Y., Drisaldi, B., Griffin, E. A., Jr, Pollak, D. D., Xu, S., Yin, D., Schaffran, C., Kandel, D. B., & Kandel, E. R. (2011). Molecular mechanism for a gateway drug: epigenetic changes initiated by nicotine prime gene expression by cocaine. *Science translational medicine*, 3(107), 107ra109. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003062>

Loney, G. C., Angelyn, H., Cleary, L. M., & Meyer, P. J. (2019). Nicotine Produces a High-Approach, Low-Avoidance Phenotype in Response to Alcohol-Associated Cues in Male Rats. *Alcoholism, clinical and experimental research*, 43(6), 1284–1295.

<https://doi.org/10.1111/acer.14043>

Macpherson, T., & Hikida, T. (2018). Nucleus Accumbens Dopamine D1-Receptor-Expressing Neurons Control the Acquisition of Sign-Tracking to Conditioned Cues in Mice. *Frontiers in neuroscience*, 12, 418. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00418>

Malin, D. H., Lake, J. R., Newlin-Maultsby, P., Roberts, L. K., Lanier, J. G., Carter, V. A., Cunningham, J. S., & Wilson, O. B. (1992). Rodent model of nicotine abstinence

syndrome. *Pharmacology, Biochemistry Behavior*, 43(3), 779–784.

[https://doi.org/10.1016/0091-3057\(92\)90408-8](https://doi.org/10.1016/0091-3057(92)90408-8)

Marttila, K., Raattamaa, H., & Ahtee, L. (2006). Effects of chronic nicotine administration and its withdrawal on striatal FosB/DeltaFosB and c-Fos expression in rats and mice. *Neuropharmacology*, 51(1), 44–51.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.02.014>

Matta, S. G., Balfour, D. J., Benowitz, N. L., Boyd, R. T., Buccafusco, J. J., Caggiula, A. R., Craig, C. R., Collins, A. C., Damaj, M. I., Donny, E. C., Gardiner, P. S., Grady, S. R., Heberlein, U., Leonard, S. S., Levin, E. D., Lukas, R. J., Markou, A., Marks, M. J., McCallum, S. E., Parameswaran, N., ... Zirger, J. M. (2007). Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. *Psychopharmacology*, 190(3), 269–319.

<https://doi.org/10.1007/s00213-006-0441-0>

McDonald, C. G., Dailey, V. K., Bergstrom, H. C., Wheeler, T. L., Eppolito, A. K., Smith, L. N., & Smith, R. F. (2005). Periadolescent nicotine administration produces enduring changes in dendritic morphology of medium spiny neurons from nucleus accumbens. *Neuroscience letters*, 385(2), 163–167.

<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2005.05.041>

McDonald, C. G., Eppolito, A. K., Brielmaier, J. M., Smith, L. N., Bergstrom, H. C., Lawhead, M. R., & Smith, R. F. (2007). Evidence for elevated nicotine-induced structural plasticity in nucleus accumbens of adolescent rats. *Brain research*, 1151, 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.03.019>

McGehee, D. S., Heath, M. J., Gelber, S., Devay, P., & Role, L. W. (1995). Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science*, 269(5231), 1692–1696. <https://doi.org/10.1126/science.7569895>

Meyer, P. J., Lovic, V., Saunders, B. T., Yager, L. M., Flagel, S. B., Morrow, J. D., & Robinson, T. E. (2012). Quantifying individual variation in the propensity to attribute incentive salience to reward cues. *PloS one*, 7(6), e38987.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038987>

Michalak, A., & Budzyńska, B. (2019). *Nicotine and Dopamine DAI Receptor Pharmacology*. In: Preedy, V. R. (Ed.). *Neuroscience of Nicotine: Mechanisms and Treatment*. Academic Press.

Morgan, J. I., & Curran, T. (1995). Immediate-early genes: ten years on. *Trends in Neurosciences*, 18(2), 66–67.

Muller, D. L., & Unterwald, E. M. (2005). D1 dopamine receptors modulate deltaFosB induction in rat striatum after intermittent morphine administration. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 314(1), 148–154.  
<https://doi.org/10.1124/jpet.105.083410>

Murrin, L. C., Ferrer, J. R., Wanyun, Z., & Haley, N. J. (1987). Nicotine administration to rats: methodological considerations. *Life Sciences*, 40, 1699-1708.  
[https://doi.org/10.1016/0024-3205\(87\)90020-8](https://doi.org/10.1016/0024-3205(87)90020-8)

Naeem, M., & White, N. M. (2016). Parallel learning in an autoshaping paradigm. *Behavioral neuroscience*, 130(4), 376–392. <https://doi.org/10.1037/bne0000154>

Naeem, M. (2016). *Learning processes in autoshaping and conditioned cue preference*. [PhD Thesis, McGill University] (Canada). Recuperado de: <https://www.bac-lac.gc.ca/eng/services/theses/Pages/item.aspx?idNumber=973735010>

Nakhate, K. T., Dandekar, M. P., Kokare, D. M., & Subhedar, N. K. (2009). Involvement of neuropeptide Y Y(1) receptors in the acute, chronic and withdrawal effects of nicotine on feeding and body weight in rats. *European journal of pharmacology*, 609(1-3), 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.03.008>

Nestler, E. J., Barrot, M., & Self, D. W. (2001). DeltaFosB: a sustained molecular switch for addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), 11042–11046. <https://doi.org/10.1073/pnas.191352698>

Nestler E. J. (2008). Review. Transcriptional mechanisms of addiction: role of DeltaFosB. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 363(1507), 3245–3255. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0067>

Norrholm, S. D., Bibb, J. A., Nestler, E. J., Ouimet, C. C., Taylor, J. R., & Greengard, P. (2003). Cocaine-induced proliferation of dendritic spines in nucleus

accumbens is dependent on the activity of cyclin-dependent kinase-5. *Neuroscience*, 116(1), 19–22. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00560-2](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00560-2)

Olausson, P., Jentsch, J. D., & Taylor, J. R. (2003). Repeated nicotine exposure enhances reward-related learning in the rat. *Neuropsychopharmacology*, 28, 1264-1271. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300173>

Olausson, P., Jentsch, J. D., & Taylor, J. R. (2004a). Nicotine enhances responding with conditioned reinforcement. *Psychopharmacology*, 171, 173-178. <https://doi.org/10.1007/s00213-003-1575-y>

Olausson, P., Jentsch, J. D., & Taylor, J. R. (2004b). Repeated nicotine exposure enhances responding with conditioned reinforcement. *Psychopharmacology*, 173, 98-104. <https://doi.org/10.1007/s00213-003-1702-9>

Olausson, P., Jentsch, J. D., Tronson, N., Neve, R. L., Nestler, E. J., & Taylor, J. R. (2006).  $\Delta$ FosB in the nucleus accumbens regulates food-reinforced instrumental behavior and motivation. *Journal of Neuroscience*, 26(36), 9196-9204. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1124-06.2006>

Ostlund, S. B., & Balleine, B. W. (2007). Orbitofrontal cortex mediates outcome encoding in Pavlovian but not instrumental conditioning. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(18), 4819–4825. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5443-06.2007>

Overby, P. F., Daniels, C. W., Del Franco, A., Goenaga, J., Powell, G. L., Gipson, C. D., & Sanabria, F. (2018). Effects of nicotine self-administration on incentive salience in male Sprague Dawley rats. *Psychopharmacology*, 235(4), 1121–1130. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-4829-4>

Palmatier, M. I., Evans-Martin, F. F., Hoffman, A., Caggiula, A. R., Chaudhri, N., Donny, E. C., Liu, X., Booth, S., Gharib, M., Craven, L., & Sved, A. F. (2006). Dissociating the primary reinforcing and reinforcement-enhancing effects of nicotine using a rat self-administration paradigm with concurrently available drug and environmental reinforcers. *Psychopharmacology*, 184, 391-400. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-0183-4>

Palmatier, M. I., Liu, X., Matteson, G. L., Donny, E. C., Caggiula, A. R., & Sved, A. F. (2007). Conditioned reinforcement in rats established with self-administered nicotine and enhanced by noncontingent nicotine. *Psychopharmacology*, *195*(2), 235-243.

<https://doi.org/10.1007/s00213-007-0897-6>

Palmatier, M. I., Marks, K. R., Jones, S. A., Freeman, K. S., Wissman, K. M., & Sheppard, A. B. (2013). The effect of nicotine on sign-tracking and goal-tracking in a Pavlovian conditioned approach paradigm in rats. *Psychopharmacology*, *226*, 247-259.

<https://doi.org/10.1007/s00213-012-2892-9>

Panayi, M. C., & Killcross, S. (2018). Functional heterogeneity within the rodent lateral orbitofrontal cortex dissociates outcome devaluation and reversal learning deficits. *eLife*, *7*, e37357. <https://doi.org/10.7554/eLife.37357>

Panayi, M. C., & Killcross, S. (2021). The role of the rodent lateral orbitofrontal cortex in simple Pavlovian cue-outcome learning depends on training experience. *Cerebral Cortex Communications*, *2*(1), tgab010. <https://doi.org/10.1093/texcom/tgab010>

Parkinson, J. A., Olmstead, M. C., Burns, L. H., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (1999). Dissociation in effects of lesions of the nucleus accumbens core and shell on appetitive pavlovian approach behavior and the potentiation of conditioned reinforcement and locomotor activity by D-amphetamine. *Neuroscience*, *19*(6), 2401–2411.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-06-02401.1999>

Parkinson, J. A., Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (2000). Dissociable roles of the central and basolateral amygdala in appetitive emotional learning. *The European journal of neuroscience*, *12*(1), 405–413. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2000.00960.x>

Paxinos, G. and Watson, C. (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 6th Edition, Academic Press, San Diego.

Peterson, G. B., Ackil, J. E., Frommer, G. P., & Hearst, E. S. (1972). Conditioned approach and contact behavior toward signals for food or brain-stimulation reinforcement. *Science*, *177*(4053), 1009–1011. <https://doi.org/10.1126/science.177.4053.1009>

Phillips, G. D., Setzu, E., Vugler, A., & Hitchcott, P. K. (2003). Immunohistochemical assessment of mesotelencephalic dopamine activity during the

acquisition and expression of Pavlovian versus instrumental behaviours. *Neuroscience*, 117(3), 755-767. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00799-6](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00799-6)

Picciotto, M. R., Brunzell, D. H., & Caldarone, B. J. (2002). Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression. *Neuroreport*, 13(9), 1097–1106. <https://doi.org/10.1097/00001756-200207020-00006>

Pich, E. M., Pagliusi, S. R., Tessari, M., Talabot-Ayer, D., van Huijsduijnen, R. H., & Chiamulera, C. (1997). Common neural substrates for the addictive properties of nicotine and cocaine. *Science*, 275(5296), 83-86. <https://doi.org/10.1126/science.275.5296.83>

Pitchers, K. K., Vialou, V., Nestler, E. J., Laviolette, S. R., Lehman, M. N., & Coolen, L. M. (2013). Natural and drug rewards act on common neural plasticity mechanisms with  $\Delta$ FosB as a key mediator. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 33(8), 3434–3442. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4881-12.2013>

Pichon-Riviere, A., Alcaraz, A., Palacios, A., Rodríguez, B., Reynales-Shigematsu, L. M., Pinto, M., Castillo-Riquelme, M., Peña, E., Osorio, D. I., Huayanay, L., Loza, C., de Miera-Juárez, B. S., Gallegos-Rivero, V., De La Puente, C., Navia-Bueno, M. P., Caporale, J., Roberti, J., Virgilio, A., Augustovski, F., & Bardach, A. (2020). The health and economic burden of smoking in 12 Latin American countries and the potential effect of increasing tobacco taxes: an economic modelling study. *The Lancet Global Health*, 8(10), e1282-e1294. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(20\)30311-9](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(20)30311-9)

Rescorla, R. A., & Solomon, R. L. (1967). Two-process learning theory: Relationships between Pavlovian conditioning and instrumental learning. *Psychological Review*, 74(3), 151–182. <https://doi.org/10.1037/h0024475>

Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain research. Brain research reviews*, 18(3), 247–291. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(93\)90013-p](https://doi.org/10.1016/0165-0173(93)90013-p)

Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (2008). Review. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 363(1507), 3137–3146. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0093>

Robinson, T. E., Yager, L. M., Cogan, E. S., & Saunders, B. T. (2014). On the motivational properties of reward cues: Individual differences. *Neuropharmacology*, *76*, 450–459. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.05.040>

Rowell, P. P., & Li, M. (1997). Dose-response relationship for nicotine-induced up-regulation of rat brain nicotinic receptors. *Journal of Neurochemistry*, *68*(5), 1982–1989. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.68051982.x>

Ruffle J. K. (2014). Molecular neurobiology of addiction: what's all the (Δ)FosB about?. *The American journal of drug and alcohol abuse*, *40*(6), 428–437. <https://doi.org/10.3109/00952990.2014.933840>

Schaefer, G. J., & Michael, R. P. (1986). Task-specific effects of nicotine in rats. Intracranial self-stimulation and locomotor activity. *Neuropharmacology*, *25*(2), 125–131. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(86\)90033-x](https://doi.org/10.1016/0028-3908(86)90033-x)

Schiltz, C. A., Kelley, A. E., & Landry, C. F. (2005). Contextual cues associated with nicotine administration increase arc mRNA expression in corticolimbic areas of the rat brain. *The European journal of neuroscience*, *21*(6), 1703–1711. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04001.x>

Schoenbaum, G., & Shaham, Y. (2008). The role of orbitofrontal cortex in drug addiction: a review of preclinical studies. *Biological psychiatry*, *63*(3), 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.06.003>

Schoenbaum, G., Roesch, M. R., Stalnaker, T. A., & Takahashi, Y. K. (2009). A new perspective on the role of the orbitofrontal cortex in adaptive behaviour. *Nature reviews. Neuroscience*, *10*(12), 885–892. <https://doi.org/10.1038/nrn2753>

Schoenbaum, G., Takahashi, Y., Liu, T. L., & McDannald, M. A. (2011). Does the orbitofrontal cortex signal value?. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1239*, 87–99. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06210.x>

Serrano-Barroso, A., Vargas, J. P., Diaz, E., O'Donnell, P., & López, J. C. (2019). Sign and goal tracker rats process differently the incentive salience of a conditioned stimulus. *PloS one*, *14*(9), e0223109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223109>

Schultz, W. (2007). Multiple dopamine functions at different time courses. *Annual Review of Neuroscience*, 30, 259–288.

<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.061604.135722>

Soderstrom, K., Qin, W., Williams, H., Taylor, D. A., & McMillen, B. A. (2007). Nicotine increases FosB expression within a subset of reward- and memory-related brain regions during both peri- and post-adolescence. *Psychopharmacology*, 191(4), 891–897.

<https://doi.org/10.1007/s00213-007-0744-9>

Sparber, S. B., Bollweg, G. L., & Messing, R. B. (1991). Food deprivation enhances both autoshaping and autoshaping impairment by a latent inhibition procedure. *Behavioural Processes*, 23(1), 59–74. [https://doi.org/10.1016/0376-6357\(91\)90106-A](https://doi.org/10.1016/0376-6357(91)90106-A)

Stringfield, S. J., Palmatier, M. I., Boettiger, C. A., & Robinson, D. L. (2017). Orbitofrontal participation in sign- and goal-tracking conditioned responses: Effects of nicotine. *Neuropharmacology*, 116, 208–223.

<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.12.020>

Stringfield, S. J., Madayag, A. C., Boettiger, C. A., & Robinson, D. L. (2019). Sex differences in nicotine-enhanced Pavlovian conditioned approach in rats. *Biology of sex differences*, 10(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s13293-019-0244-8>

Theeuwes, F., & Yum, S. I. (1976). Principles of the design and operation of generic osmotic pumps for the delivery of semisolid or liquid drug formulations. *Annals of biomedical engineering*, 4(4), 343-353.

Timberlake, W. (1986). Unpredicted food produces a mode of behavior that affects rats' subsequent reactions to a conditioned stimulus: A behavior-system approach to “context blocking”. *Animal Learning & Behavior*, 14(3), 276-286.

<https://doi.org/10.3758/BF03200068>

Toates, F. (1986). *Motivational systems*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Tomie, A. (2018). Chapter 1: Introduction: The Role of Sign-Tracking in Drug Addiction. En Tomie, A. & Morrow, J. (Eds). *Sign-Tracking and Drug Addiction*. Maize Books. <http://dx.doi.org/10.3998/mpub.10215070>

Versaggi, C. L., King, C. P., & Meyer, P. J. (2016). The tendency to sign-track predicts cue-induced reinstatement during nicotine self-administration, and is enhanced by nicotine but not ethanol. *Psychopharmacology*, 233(15-16), 2985–2997.

<https://doi.org/10.1007/s00213-016-4341-7>

Wallace, D. L., Vialou, V., Rios, L., Carle-Florence, T. L., Chakravarty, S., Kumar, A., Graham, D. L., Green, T. A., Kirk, A., Iñiguez, S. D., Perrotti, L. I., Barrot, M., DiLeone, R. J., Nestler, E. J., & Bolaños-Guzmán, C. A. (2008). The influence of DeltaFosB in the nucleus accumbens on natural reward-related behavior. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(41), 10272–10277.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1531-08.2008>

Werme, M., Messer, C., Olson, L., Gilden, L., Thorén, P., Nestler, E. J., & Brené, S. (2002).  $\Delta$ FosB regulates wheel running. *Journal of Neuroscience*, 22(18), 8133–8138.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-18-08133.2002>

Winstanley, C. A., LaPlant, Q., Theobald, D. E., Green, T. A., Bachtell, R. K., Perrotti, L. I., DiLeone, R. J., Russo, S. J., Garth, W. J., Self, D. W., & Nestler, E. J. (2007). DeltaFosB induction in orbitofrontal cortex mediates tolerance to cocaine-induced cognitive dysfunction. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(39), 10497–10507. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2566-07.2007>

Wills, L., & Kenny, P. J. (2021). Addiction-related neuroadaptations following chronic nicotine exposure. *Journal of neurochemistry*, 157(5), 1652–1673.

<https://doi.org/10.1111/jnc.15356>

Wonnacott, S. (1997). Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends in Neurosciences*, 20(2), 92–98. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(96\)10073-4](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(96)10073-4)

Xiong, M., Li, J., Ye, J. H., & Zhang, C. (2011). Upregulation of DeltaFosB by propofol in rat nucleus accumbens. *Anesthesia and analgesia*, 113(2), 259–264.

<https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e318222af17>

Yager, L. M., & Robinson, T. E. (2013). A classically conditioned cocaine cue acquires greater control over motivated behavior in rats prone to attribute incentive salience to a food cue. *Psychopharmacology*, 226(2), 217–228. <https://doi.org/10.1007/s00213-012-2890-y>

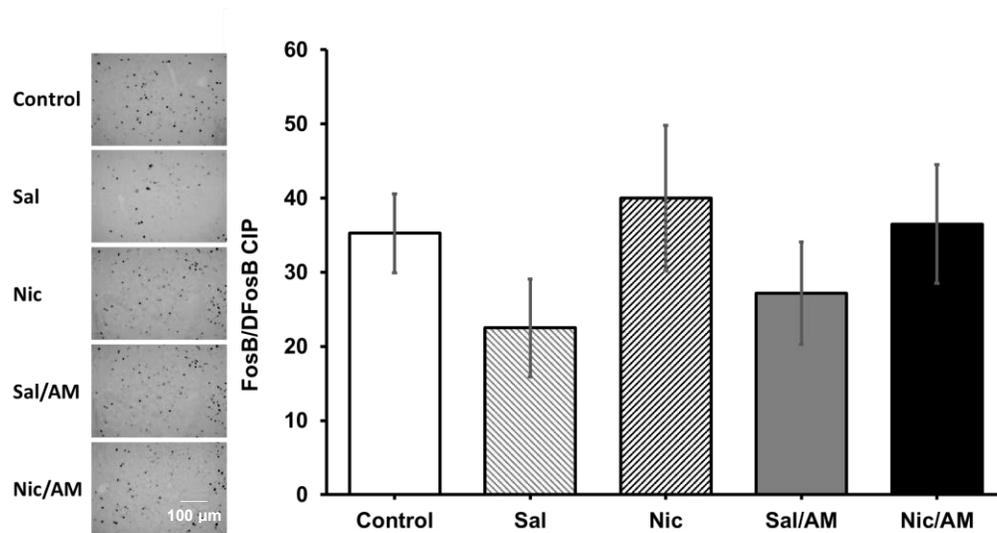
Yager, L. M., & Robinson, T. E. (2015). Individual variation in the motivational properties of a nicotine cue: Sign-trackers vs. Goal-trackers. *Psychopharmacology*, 232(17), 3149–3160. <https://doi.org/10.1007/s00213-015-3962-6>

Yager, L. M., Pitchers, K. K., Flagel, S. B., & Robinson, T. E. (2015). Individual variation in the motivational and neurobiological effects of an opioid cue. *Neuropsychopharmacology*, 40(5), 1269-1277. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.314>

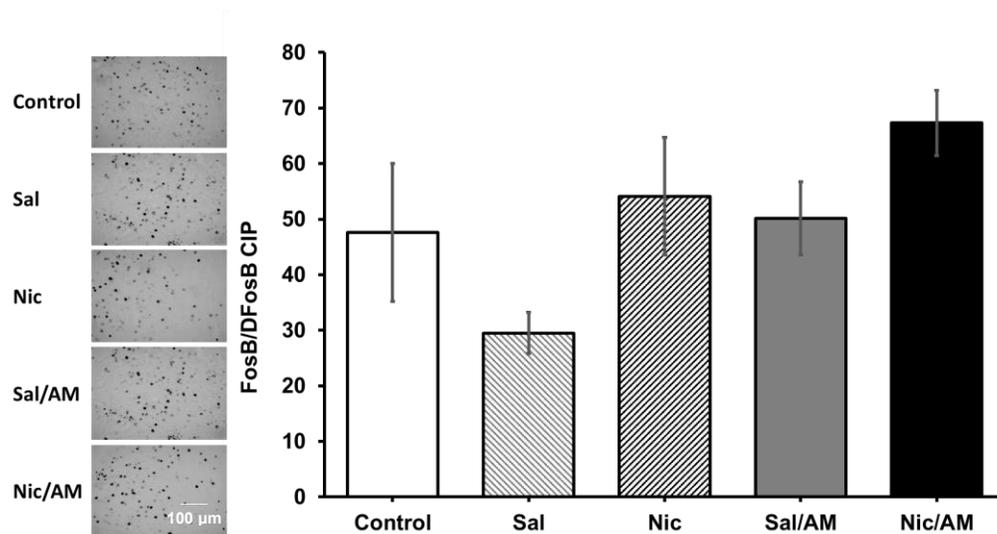
Zhang, D., Zhang, L., Lou, D. W., Nakabeppu, Y., Zhang, J., & Xu, M. (2002). The dopamine D1 receptor is a critical mediator for cocaine-induced gene expression. *Journal of neurochemistry*, 82(6), 1453–1464. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01089.x>

Zhang, T., Zhang, L., Liang, Y., Siapas, A. G., Zhou, F. M., & Dani, J. A. (2009). Dopamine signaling differences in the nucleus accumbens and dorsal striatum exploited by nicotine. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(13), 4035–4043. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0261-09.2009>

## Figuras suplementarias



**Figura suplementaria 1.** Expresión de FosB/DFosB en la amígdala central. Control (n = 4), Sal (n = 4), Nic (n = 4), Sal/AM (n = 8) y Nic/AM (n = 6).



**Figura suplementaria 2.** Expresión de FosB/DFosB en la amígdala basolateral. Control (n = 4), Sal (n = 4), Nic (n = 4), Sal/AM (n = 9) y Nic/AM (n = 6).

## Anexos

### Anexo 1. Independencia del fenotipo observado según el tratamiento

#### Chi-cuadrado

#### CROSSTABS

/TABLES=tratamiento BY fenotipo  
/FORMAT=AVALUE TABLES  
/STATISTICS=CHISQ RISK  
/CELLS=COUNT EXPECTED  
/COUNT ROUND CELL.

#### Tablas cruzadas

#### tratamiento\*fenotipo tabulación cruzada

			fenotipo			Total
			sign	inter	goal	
tratamiento	salina	Recuento	32	2	8	42
		Recuento esperado	31.2	4.1	6.7	42.0
	nicotina	Recuento	29	6	5	40
		Recuento esperado	29.8	3.9	6.3	40.0
Total		Recuento	61	8	13	82
		Recuento esperado	61.0	8.0	13.0	82.0

#### Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (2 caras)
Chi-cuadrado de Pearson	2.793 <sup>a</sup>	2	.247
Razón de verosimilitud	2.890	2	.236
Asociación lineal por lineal	.030	1	.864
N de casos válidos	82		

a. 2 casillas (33,3%) han esperado un recuento menor que 5. El recuento mínimo esperado es 3,90.

## Razón de momios

### Sign trackers

```

DATASET ACTIVATE Conjunto_de_datos1.
DATASET CLOSE Conjunto_de_datos0.
WEIGHT BY VAR00005.
CROSSTABS
  /TABLES=Tto BY Sign_tr
  /FORMAT=AVALUE TABLES
  /STATISTICS=RISK
  /CELLS=COUNT EXPECTED COLUMN
  /COUNT ROUND CELL.

```

### Tablas cruzadas

#### Tto\*Sign\_tr tabulación cruzada

			Sign_tr		Total
			Si	No	
Tto	Nic	Recuento	29	11	40
		Recuento esperado	29,8	10,2	40,0
		% dentro de Sign_tr	47,5%	52,4%	48,8%
	Sal	Recuento	32	10	42
		Recuento esperado	31,2	10,8	42,0
		% dentro de Sign_tr	52,5%	47,6%	51,2%
Total		Recuento	61	21	82
		Recuento esperado	61,0	21,0	82,0
		% dentro de Sign_tr	100,0%	100,0%	100,0%

### Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza de 95 %	
		Inferior	Superior
Odds ratio para Tto (Nic / Sal)	,824	,305	2,224
Para cohorte Sign_tr = Si	,952	,737	1,228
Para cohorte Sign_tr = No	1,155	,552	2,418
N de casos válidos	82		

## Goal trackers

### CROSSTABS

```
/TABLES=Tto BY Goal_tr
/FORMAT=AVALUE TABLES
/STATISTICS=RISK
/CELLS=COUNT EXPECTED COLUMN
/COUNT ROUND CELL.
```

## Tablas cruzadas

### Tto\*Goal\_tr tabulación cruzada

			Goal_tr		Total
			Si	No	
Tto	Nic	Recuento	5	35	40
		Recuento esperado	6,3	33,7	40,0
		% dentro de Goal_tr	38,5%	50,7%	48,8%
	Sal	Recuento	8	34	42
		Recuento esperado	6,7	35,3	42,0
		% dentro de Goal_tr	61,5%	49,3%	51,2%
Total	Recuento		13	69	82
	Recuento esperado		13,0	69,0	82,0
	% dentro de Goal_tr		100,0%	100,0%	100,0%

## Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza de 95 %	
		Inferior	Superior
Odds ratio para Tto (Nic / Sal)	,607	,181	2,042
Para cohorte Goal_tr = Si	,656	,234	1,838
Para cohorte Goal_tr = No	1,081	,896	1,304
N de casos válidos	82		

## Intermedios

### CROSSTABS

```
/TABLES=Tto BY Intermedio
```

```

/FORMAT=AVALUE TABLES
/STATISTICS=RISK
/CELLS=COUNT EXPECTED COLUMN
/COUNT ROUND CELL.

```

### Tablas cruzadas

#### Tto\*Intermedio tabulación cruzada

			Intermedio		Total
			Si	No	
Tto	Nic	Recuento	6	34	40
		Recuento esperado	3,9	36,1	40,0
		% dentro de Intermedio	75,0%	45,9%	48,8%
	Sal	Recuento	2	40	42
		Recuento esperado	4,1	37,9	42,0
		% dentro de Intermedio	25,0%	54,1%	51,2%
Total	Recuento		8	74	82
	Recuento esperado		8,0	74,0	82,0
	% dentro de Intermedio		100,0%	100,0%	100,0%

#### Estimación de riesgo

	Valor	Intervalo de confianza de 95 %	
		Inferior	Superior
Odds ratio para Tto (Nic / Sal)	3,529	,668	18,643
Para cohorte Intermedio = Si	3,150	,675	14,702
Para cohorte Intermedio = No	,893	,771	1,034
N de casos válidos	82		

### Anexo 2. Pruebas T entre los grupos Control/AM y Sal/AM para las medidas comportamentales

```

DATASET ACTIVATE Conjunto_de_datos2.
DATASET CLOSE Conjunto_de_datos1.

```

EXAMINE VARIABLES=Pal\_BL1 Pal\_BL2 Pal\_BL3 Pal\_BL4 Com\_BL1 Com\_BL2  
 Com\_BL3 Com\_BL4 Sesgo\_BL1 Sesgo\_BL2 Sesgo\_BL3 Sesgo\_BL4 Inm\_BL1 Inm\_BL2  
 Inm\_BL3 Inm\_BL4 BY Grupos  
 /PLOT BOXPLOT NPLOT  
 /COMPARE GROUPS  
 /STATISTICS DESCRIPTIVES  
 /CINTERVAL 95  
 /MISSING LISTWISE  
 /NOTOTAL.

## Explorar

### Pruebas de normalidad

	Grupos	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Pal_BL1	Sal/AM	,175	26	,040	,894	26	,012
	Control/AM	,357	6	,016	,769	6	,030
Pal_BL2	Sal/AM	,182	26	,027	,926	26	,063
	Control/AM	,293	6	,119	,866	6	,211
Pal_BL3	Sal/AM	,202	26	,008	,774	26	,000
	Control/AM	,226	6	,200*	,920	6	,503
Pal_BL4	Sal/AM	,154	26	,113	,953	26	,276
	Control/AM	,169	6	,200*	,962	6	,832
Com_BL1	Sal/AM	,172	26	,045	,928	26	,070
	Control/AM	,250	6	,200*	,843	6	,139
Com_BL2	Sal/AM	,164	26	,071	,927	26	,066
	Control/AM	,264	6	,200*	,891	6	,325
Com_BL3	Sal/AM	,133	26	,200*	,944	26	,168
	Control/AM	,269	6	,200*	,847	6	,148
Com_BL4	Sal/AM	,192	26	,014	,789	26	,000
	Control/AM	,267	6	,200*	,767	6	,029

Sesgo_B	Sal/AM	,116	26	,200*	,968	26	,570
L1	Control/AM	,349	6	,022	,796	6	,054
Sesgo_B	Sal/AM	,226	26	,001	,871	26	,004
L2	Control/AM	,245	6	,200*	,830	6	,107
Sesgo_B	Sal/AM	,241	26	,000	,794	26	,000
L3	Control/AM	,268	6	,200*	,895	6	,344
Sesgo_B	Sal/AM	,245	26	,000	,773	26	,000
L4	Control/AM	,235	6	,200*	,813	6	,076
Inm_BL1	Sal/AM	,332	26	,000	,702	26	,000
	Control/AM	,392	6	,004	,710	6	,008
Inm_BL2	Sal/AM	,236	26	,001	,804	26	,000
	Control/AM	,302	6	,093	,812	6	,075
Inm_BL3	Sal/AM	,283	26	,000	,737	26	,000
	Control/AM	,275	6	,174	,812	6	,076
Inm_BL4	Sal/AM	,292	26	,000	,730	26	,000
	Control/AM	,250	6	,200*	,832	6	,112

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

T-TEST GROUPS=Grupos(1 3)

/MISSING=ANALYSIS

/VARIABLES=Pal\_BL2 Pal\_BL4 Com\_BL1 Com\_BL2 Com\_BL3 Sesgo\_BL1

Pres\_BL1 Pres\_BL2 Pres\_BL3 Pres\_BL4

/CRITERIA=CI(.95).

## Prueba T

### Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
Pal_ Se BL2 asumen varianzas iguales No se asumen varianzas iguales	3,814	,060	-,050	30	,960	-,29231	5,81860	-12,17548	11,59086
			-,0679	11,859	,948	-,29231	4,35649	-9,79679	9,21218
Pal_ Se BL4 asumen varianzas iguales No se asumen varianzas iguales	,044	,835	,696	30	,492	4,37692	6,29227	-8,47361	17,22745
			,686	7,388	,513	4,37692	6,37612	-10,54122	19,29506



No se asumen varianzas iguales			- ,269	7,442	,795	-,06331	,23549	- ,61352	,48690
---	--	--	-----------	-------	------	---------	--------	-------------	--------

## NPAR TEST

/M-W= Pal\_BL1 Pal\_BL3 Com\_BL4 Sesgo\_BL2 Sesgo\_BL3 Sesgo\_BL4 Inm\_BL1  
Inm\_BL2 Inm\_BL3 Inm\_BL4 BY Grupos(1 3)

/MISSING ANALYSIS.

**Prueba de Mann-Whitney****Estadísticos de prueba<sup>a</sup>**

	Pal_BL 1	Pal_BL 3	Com_B L4	Sesgo_B L2	Sesgo_B L3	Sesgo_B L4
U de Mann-Whitney	67,000	62,500	75,500	74,000	76,000	71,000
W de Wilcoxon	418,000	413,500	96,500	425,000	97,000	92,000
Z	-,532	-,748	-,121	-,193	-,097	-,338
Sig. asintótica (bilateral)	,595	,454	,904	,847	,923	,735
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	,621 <sup>b</sup>	,464 <sup>b</sup>	,906 <sup>b</sup>	,869 <sup>b</sup>	,944 <sup>b</sup>	,760 <sup>b</sup>

a. Variable de agrupación: Grupos

b. No corregido para empates.

**Estadísticos de prueba<sup>a</sup>**

	Inm_BL 1	Inm_BL 2	Inm_BL 3	Inm_BL 4
U de Mann-Whitney	63,500	74,000	71,500	78,000
W de Wilcoxon	84,500	425,000	92,500	99,000
Z	-,700	-,193	-,314	,000

Sig. asintótica (bilateral)	,484	,847	,754	1,000
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	,494 <sup>b</sup>	,869 <sup>b</sup>	,760 <sup>b</sup>	1,000 <sup>b</sup>

a. Variable de agrupación: Grupos

b. No corregido para empates.

### Anexo 3. Pruebas T entre los grupos Control/AM y Sal/AM para los resultados del ensayo de inmunohistoquímica

#### Núcleo accumbens

```
EXAMINE VARIABLES=NAc BY Grupos_NAc
/PLOT BOXPLOT NPLOT
/COMPARE GROUPS
/STATISTICS DESCRIPTIVES
/CINTERVAL 95
/MISSING LISTWISE
/NOTOTAL.
```

#### Pruebas de normalidad

	Grupos_NA	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
FosB_NAc	Sal/AM	,202	6	,200*	,914	6	,461
	Control/AM	,273	4	.	,825	4	,156

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

```
T-TEST GROUPS=Grupos_NAc(1 3)
/MISSING=ANALYSIS
/VARIABLES=NAc
/CRITERIA=CI(.95).
```

#### Prueba T

**Estadísticas de grupo**

	Grupos_NAc	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
FosB_NAc	Sal/AM	6	97,7083	28,57071	11,66394
	Control/A	4	86,5625	31,02444	15,51222

**Prueba de muestras independientes**

	Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias							
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		
								Inferior	Superior	
FosB_NAc	Se asumen varianzas iguales	,006	,942	,585	8	,575	11,14583	19,05170	-32,78747	55,07914
	No se asumen varianzas iguales			,574	6,168	,586	11,14583	19,40815	-36,03199	58,32366

**Corteza orbitofrontal**

EXAMINE VARIABLES=FosB\_COF BY Grupos\_COF



									Inferior	Superior
FosB	Se	4,8	,070	,251	6	,810	4,37778	17,46148	-38,34893	47,10449
_COF	asumen varianzas iguales									
	No se			,204	2,484	,854	4,37778	21,41058	-72,50178	81,25734
	asumen varianzas iguales									

### Amígdala central

EXAMINE VARIABLES=FosB\_AC BY Grupos\_AC  
/PLOT BOXPLOT NPLOT  
/COMPARE GROUPS  
/STATISTICS DESCRIPTIVES  
/CINTERVAL 95  
/MISSING LISTWISE  
/NOTOTAL.

### Pruebas de normalidad

	Grupos_A C	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
FosB_AC	Sal/AM	,261	5	,200*	,877	5	,297
	Control/AM	,377	3	.	,770	3	,044

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

### NPAR TEST

/M-W= FosB\_AC BY Grupos\_AC(1 3)  
/MISSING ANALYSIS.

### Prueba de Mann-Whitney

#### Estadísticos de prueba<sup>a</sup>

	FosB_AC
U de Mann-Whitney	6,000
W de Wilcoxon	12,000
Z	-,447
Sig. asintótica (bilateral)	,655
Significación exacta [2*(sig. unilateral)]	,786 <sup>b</sup>

a. Variable de agrupación: Grupos\_AC

b. No corregido para empates.

#### Amígdala basolateral

```
EXAMINE VARIABLES=FosB_ABL BY Grupos_ABL
/PLOT BOXPLOT NPLOT
/COMPARE GROUPS
/STATISTICS DESCRIPTIVES
/CINTERVAL 95
/MISSING LISTWISE
/NOTOTAL.
```

#### Pruebas de normalidad

	Grupos_A	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk				
		Estadístic	o	gl	Sig.	Estadístic	o	gl	Sig.
FosB_AB L	Sal/AM	,231	5		,200*	,877	5		,295
	Control/A	,352	4		.	,854	4		,239
	M								

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

T-TEST GROUPS=Grupos\_ABL(1 3)

/MISSING=ANALYSIS  
/VARIABLES=FosB\_ABL  
/CRITERIA=CI(.95).

**Prueba T**

**Estadísticas de grupo**

	Grupos_ABL	N	Media	Desviación estándar	Media de error estándar
FosB_ABL	Sal/AM	5	51,0000	12,00000	5,36656
	Control/AM	4	49,5000	28,87329	14,43664

**Prueba de muestras independientes**

	Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias							
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		
								Inferior	Superior	
FosB_ABL	Se asumen varianzas iguales	2,163	,185	,107	7	,918	1,50000	14,06439	-31,75700	34,75700

No se asumen varianzas iguales			,097	3,832	,927	1,50000	15,4018 4	- 42,014 24	45,0142 4
---	--	--	------	-------	------	---------	--------------	-------------------	--------------

#### Anexo 4. Pruebas comportamentales

DATASET NAME Conjunto\_de\_datos1 WINDOW=FRONT.  
 EXAMINE VARIABLES=Pal\_BL1 Pal\_BL2 Pal\_BL3 Pal\_BL4 Com\_BL1 Com\_BL2  
 Com\_BL3 Com\_BL4 Sesgo\_BL1 Sesgo\_BL2 Sesgo\_BL3 Sesgo\_BL4 Inm\_BL1 Inm\_BL2  
 Inm\_BL3 Inm\_BL4 BY Grupos  
 /PLOT BOXPLOT NPLOT  
 /COMPARE GROUPS  
 /STATISTICS DESCRIPTIVES  
 /CINTERVAL 95  
 /MISSING LISTWISE  
 /NOTOTAL.

#### Pruebas de normalidad

	Grupos	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Pal_BL1	Sal/AM	,160	32	,036	,842	32	,000
	Nic/A M	,186	29	,012	,885	29	,004
Pal_BL2	Sal/AM	,123	32	,200*	,952	32	,162
	Nic/A M	,123	29	,200*	,935	29	,073
Pal_BL3	Sal/AM	,161	32	,034	,801	32	,000
	Nic/A M	,123	29	,200*	,928	29	,048
Pal_BL4	Sal/AM	,136	32	,139	,959	32	,258
	Nic/A M	,117	29	,200*	,979	29	,807

Com_BL1	Sal/AM	,168	32	,022	,925	32	,028
	Nic/A						
	M	,077	29	,200*	,943	29	,118
Com_BL2	Sal/AM	,149	32	,069	,943	32	,089
	Nic/A						
	M	,212	29	,002	,825	29	,000
Com_BL3	Sal/AM	,149	32	,070	,844	32	,000
	Nic/A						
	M	,242	29	,000	,731	29	,000
Com_BL4	Sal/AM	,200	32	,002	,788	32	,000
	Nic/A						
	M	,293	29	,000	,597	29	,000
Sesgo_BL1	Sal/AM	,140	32	,112	,950	32	,144
	Nic/A						
	M	,113	29	,200*	,971	29	,600
Sesgo_BL2	Sal/AM	,212	32	,001	,864	32	,001
	Nic/A						
	M	,255	29	,000	,704	29	,000
Sesgo_BL3	Sal/AM	,239	32	,000	,821	32	,000
	Nic/A						
	M	,300	29	,000	,567	29	,000
Sesgo_BL4	Sal/AM	,241	32	,000	,798	32	,000
	Nic/A						
	M	,313	29	,000	,680	29	,000
Inm_BL1	Sal/AM	,331	32	,000	,700	32	,000
	Nic/A						
	M	,210	29	,002	,862	29	,001
Inm_BL2	Sal/AM	,255	32	,000	,793	32	,000

	Nic/A M	,181	29	,016	,892	29	,006
Inm_BL3	Sal/AM	,266	32	,000	,747	32	,000
	Nic/A M	,170	29	,031	,885	29	,004
Inm_BL4	Sal/AM	,275	32	,000	,741	32	,000
	Nic/A M	,188	29	,010	,849	29	,001

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

### Número de palanqueos

#### Anova 2x2 no paramétrico por rangos, Wilcoxon

\$test.A	[1] 1.83842
\$p.value.A	[1] 0.1803961
\$test.B	[1] 92.85651
\$p.value.B	[1] 0
\$test.AB	[1] 1.245792
\$p.value.AB	[1] 0.2904309

\$avg.ranks

[,1] [,2] [,3] [,4]

[1,] 44.56250 116.1094 137.9844 160.9062

[2,] 61.76562 115.7500 166.3438 175.5156

\$rel.effects

[,1] [,2] [,3] [,4]

[1,] 0.1805840 0.4738089 0.5634606 0.6574027

[2,] 0.2510886 0.4723361 0.6796875 0.7172772

#### Post hoc, Bloque

.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj.signif	
1	Palanqueo	PalB1	PalB2	61	61	1.0	<0.0001	<0.0001	****

2	Palanqueo	PalB1	PalB3	61	61	5.0	<0.0001	<0.0001	****
3	Palanqueo	PalB1	PalB4	61	61	0.0	<0.0001	<0.0001	****
4	Palanqueo	PalB2	PalB3	61	61	302.5	<0.0001	<0.0001	****
5	Palanqueo	PalB2	PalB4	61	61	198.5	<0.0001	<0.0001	****
6	Palanqueo	PalB3	PalB4	61	61	661.5	0.062	0.38	ns

### Post hoc, Tratamiento

	Grupo	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj. signif
1	Sal/AM	Palanqueo	PalB1	PalB2	32	32	1.0	<0.0001	<0.0001	****
2	Sal/AM	Palanqueo	PalB1	PalB3	32	32	5.0	<0.0001	<0.0001	****
3	Sal/AM	Palanqueo	PalB1	PalB4	32	32	0.0	<0.0001	<0.0001	****
4	Sal/AM	Palanqueo	PalB2	PalB3	32	32	108.0	0.003	0.016	*
5	Sal/AM	Palanqueo	PalB2	PalB4	32	32	66.5	0.00023	0.001	**
6	Sal/AM	Palanqueo	PalB3	PalB4	32	32	134.5	0.027	0.161	ns
7	Nic/AM	Palanqueo	PalB1	PalB2	29	29	0.0	<0.0001	<0.0001	****
8	Nic/AM	Palanqueo	PalB1	PalB3	29	29	0.0	<0.0001	<0.0001	****
9	Nic/AM	Palanqueo	PalB1	PalB4	29	29	0.0	<0.0001	<0.0001	****
10	Nic/AM	Palanqueo	PalB2	PalB3	29	29	50.0	0.0003	0.002	**
11	Nic/AM	Palanqueo	PalB2	PalB4	29	29	40.0	<0.0001	0.00019	***
12	Nic/AM	Palanqueo	PalB3	PalB4	29	29	202.0	0.749	1.	ns

### Post hoc, Comparaciones múltiples, Bloque x Tratamiento

	Bloque	estimate	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj. signif
1	PalB1	-0.4000 504	Palanqueo	Sal/AM	Nic/AM	32	29	431.5	0.644	0.644	ns
2	PalB2	-16.974. 090	Palanqueo	Sal/AM	Nic/AM	32	29	427.0	0.598	0.598	ns
3	PalB3	-83.999. 357	Palanqueo	Sal/AM	Nic/AM	32	29	297.5	0.016	0.016	*
4	PalB4	-40.740. 001	Palanqueo	Sal/AM	Nic/AM	32	29	397.0	0.337	0.337	ns

### Número de entradas a comedero

### Anova 2x2 no paramétrico por rangos, Wilcoxon

\$test.A	[1] 5.522468
\$p.value.A	[1] 0.02262565

\$test.B	[1] 30.20754
\$p.value.B	[1] 3.663736e-15
\$test.AB	[1] 0.6843637
\$p.value.AB	[1] 0.5197349

\$avg.ranks

[,1] [,2] [,3] [,4]  
 [1,] 172.9844 149.0156 111.23438 114.89062  
 [2,] 148.8594 108.6875 86.46875 76.76562

\$rel.effects

[,1] [,2] [,3] [,4]  
 [1,] 0.7069032 0.6086706 0.4538294 0.468814  
 [2,] 0.6080302 0.4433914 0.3523309 0.312564

### Comparaciones planeadas

	Bloque	estimate	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj. signif
1	ComB1	0.2667197	Comedero	Sal/AM	Nic/AM	32	29	544.0	0.251	0.251	ns
2	ComB2	0.4333636	Comedero	Sal/AM	Nic/AM	32	29	594.0	0.061	0.061	ns
3	ComB3	0.3036970	Comedero	Sal/AM	Nic/AM	32	29	592.5	0.064	0.064	ns
4	ComB4	0.2333618	Comedero	Sal/AM	Nic/AM	32	29	624.5	0.02	0.02	*

### Sesgo de respuesta

#### Anova 2x2 no paramétrico por rangos, Wilcoxon

\$test.A	[1] 5.201225
\$p.value.A	[1] 0.02657996
\$test.B	[1] 116.938
\$p.value.B	[1] 0
\$test.AB	[1] 0.3571236
\$p.value.AB	[1] 0.7352334

\$avg.ranks

[,1] [,2] [,3] [,4]  
 [1,] 38.20312 108.9219 143.2656 152.2812  
 [2,] 54.98438 128.1562 171.6719 180.3594

\$rel.effects

[,1] [,2] [,3] [,4]  
 [1,] 0.1545210 0.4443519 0.5851050 0.6220543  
 [2,] 0.2232966 0.5231814 0.7015241 0.7371286

**Comparaciones planeadas**

	Bloque	estimate	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj. signif
1	SRB1	- 0.05131264	Sesgo	Sal/AM	Nic/AM	32	29	426.5	0.593	0.593	ns
2	SRB2	- 0.07212913	Sesgo	Sal/AM	Nic/AM	32	29	342.5	0.08	0.08	ns
3	SRB3	- 0.05661105	Sesgo	Sal/AM	Nic/AM	32	29	266.5	0.004	0.004	**
4	SRB4	- 0.02233879	Sesgo	Sal/AM	Nic/AM	32	29	308.0	0.024	0.024	*

**Inmovilidad**

**Anova 2x2 no paramétrico por rangos, Wilcoxon**

\$test.A	[1] 1.185088
\$p.value.A	[1] 0.2808712
\$test.B	[1] 9.21148
\$p.value.B	[1] 2.243091e-05
\$test.AB	[1] 3.107051
\$p.value.AB	[1] 0.03411831

\$avg.ranks

[,1] [,2] [,3] [,4]  
 [1,] 109.9062 129.0312 116.4219 110.9219  
 [2,] 137.3594 153.0000 137.7031 110.8750

\$rel.effects

[,1] [,2] [,3] [,4]  
 [1,] 0.4483863 0.5267674 0.4750897 0.4525487

[2,] 0.5608991 0.6250000 0.5623079 0.4523566

**.Post hoc, Bloque x Tratamiento**

	Bloque	estimate	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	p.adj	p.adj.signif
1	INB1	-10.999. 999	Inmovi lidad	Sal/AM	Nic/AM	32	29	375.5	0.2	0.2	ns
2	INB2	-14.333. 288	Inmovi lidad	Sal/AM	Nic/AM	32	29	382.5	0.24	0.24	ns
3	INB3	-6.999. 943	Inmovi lidad	Sal/AM	Nic/AM	32	29	412.0	0.46	0.46	ns
4	INB4	2.666. 613	Inmovi lidad	Sal/AM	Nic/AM	32	29	488.0	0.73	0.73	ns

**Anexo 5. Ensayos de inmunohistoquímica**

**Núcleo accumbens**

```
EXAMINE VARIABLES=FosB_NAc BY Grupos_NAc
/PLOT BOXPLOT NPLOT
/COMPARE GROUPS
/STATISTICS DESCRIPTIVES
/CINTERVAL 95
/MISSING LISTWISE
/NOTOTAL.
```

**Resumen de procesamiento de casos**

		Casos					
		Válido		Perdidos		Total	
Grupos_N		N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
Ac							
FosB_N	Control	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
Ac	Sal	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
	Nic	3	100,0%	0	0,0%	3	100,0%
	Sal/AM	10	100,0%	0	0,0%	10	100,0%
	Nic/AM	6	100,0%	0	0,0%	6	100,0%

**Pruebas de normalidad**

	Grupos_N	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Ac	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
FosB_N	Control	,306	4	.	,917	4	,521
Ac	Sal	,263	4	.	,861	4	,265
	Nic	,210	3	.	,991	3	,819
	Sal/AM	,201	10	,200*	,843	10	,048
	Nic/AM	,196	6	,200*	,957	6	,794

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

ONEWAY FosB\_NAc BY Grupos\_NAc  
/STATISTICS HOMOGENEITY  
/MISSING ANALYSIS  
/POSTHOC=TUKEY ALPHA(0.05).

**Unidireccional**

**Prueba de homogeneidad de varianzas**

FosB\_NAc

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
1,283	4	22	,307

**ANOVA**

FosB\_NAc

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	34918,013	4	8729,503	7,981	,000
Dentro de grupos	24062,672	22	1093,758		

Total	58980,685	26			
-------	-----------	----	--	--	--

### Pruebas post hoc

#### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: FosB\_NAc

HSD Tukey

(I) Grupos_N Ac	(J) Grupos_N Ac	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Control	Sal	-20,93750	23,38544	,896	-90,3216	48,4466
	Nic	-60,08333	25,25916	,159	-135,0268	14,8601
	Sal/AM	-29,00000	19,56566	,584	-87,0509	29,0509
	Nic/AM	-104,58333*	21,34789	,001	-167,9221	-41,2446
Sal	Control	20,93750	23,38544	,896	-48,4466	90,3216
	Nic	-39,14583	25,25916	,543	-114,0893	35,7976
	Sal/AM	-8,06250	19,56566	,994	-66,1134	49,9884
	Nic/AM	-83,64583*	21,34789	,006	-146,9846	-20,3071
Nic	Control	60,08333	25,25916	,159	-14,8601	135,0268
	Sal	39,14583	25,25916	,543	-35,7976	114,0893
	Sal/AM	31,08333	21,77066	,617	-33,5098	95,6764
	Nic/AM	-44,50000	23,38544	,345	-113,8841	24,8841
Sal/AM	Control	29,00000	19,56566	,584	-29,0509	87,0509
	Sal	8,06250	19,56566	,994	-49,9884	66,1134
	Nic	-31,08333	21,77066	,617	-95,6764	33,5098
	Nic/AM	-75,58333*	17,07831	,002	-126,2543	-24,9123
Nic/AM	Control	104,58333*	21,34789	,001	41,2446	167,9221

Sal	83,64583*	21,34789	,006	20,3071	146,9846
Nic	44,50000	23,38544	,345	-24,8841	113,8841
Sal/AM	75,58333*	17,07831	,002	24,9123	126,2543

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

### Corteza orbitofrontal

```
EXAMINE VARIABLES=FosB_COF BY Grupos_COF
/PLOT BOXPLOT NPLOT
/COMPARE GROUPS
/STATISTICS DESCRIPTIVES
/CINTERVAL 95
/MISSING LISTWISE
/NOTOTAL.
```

### Resumen de procesamiento de casos

		Casos					
		Válido		Perdidos		Total	
	Grupos_C OF	N	Porcentaj e	N	Porcentaj e	N	Porcentaje
		FosB_CO	Control	4	100,0%	0	0,0%
F	Sal	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
	Nic	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
	Sal/AM	8	100,0%	0	0,0%	8	100,0%
	Nic/AM	6	100,0%	0	0,0%	6	100,0%

### Pruebas de normalidad

		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístic o	gl	Sig.	Estadístic o	gl	Sig.
FosB_CO	Control	,286	4	.	,872	4	,305

F	Sal	,132	4	.	,999	4	,999
	Nic	,297	4	.	,797	4	,097
	Sal/AM	,199	8	,200*	,928	8	,495
	Nic/AM	,156	6	,200*	,936	6	,629

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

ONEWAY FosB\_COF BY Grupos\_COF  
/STATISTICS HOMOGENEITY  
/MISSING ANALYSIS  
/POSTHOC=TUKEY ALPHA(0.05).

### Unidireccional

#### Prueba de homogeneidad de varianzas

FosB\_COF

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
2,480	4	21	,075

### ANOVA

FosB\_COF

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	11732,381	4	2933,095	6,652	,001
Dentro de grupos	9260,051	21	440,955		
Total	20992,432	25			

### Pruebas post hoc

#### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: FosB\_COF

## HSD Tukey

(I) Grupos_C OF	(J) Grupos_C OF	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Control	Sal	-10,91667	14,84848	,946	-55,1508	33,3175
	Nic	-35,58333	14,84848	,155	-79,8175	8,6508
	Sal/AM	-28,70833	12,85916	,207	-67,0163	9,5996
	Nic/AM	-63,02778*	13,55475	,001	-103,4079	-22,6477
Sal	Control	10,91667	14,84848	,946	-33,3175	55,1508
	Nic	-24,66667	14,84848	,477	-68,9008	19,5675
	Sal/AM	-17,79167	12,85916	,644	-56,0996	20,5163
	Nic/AM	-52,11111*	13,55475	,007	-92,4912	-11,7310
Nic	Control	35,58333	14,84848	,155	-8,6508	79,8175
	Sal	24,66667	14,84848	,477	-19,5675	68,9008
	Sal/AM	6,87500	12,85916	,983	-31,4329	45,1829
	Nic/AM	-27,44444	13,55475	,289	-67,8245	12,9357
Sal/AM	Control	28,70833	12,85916	,207	-9,5996	67,0163
	Sal	17,79167	12,85916	,644	-20,5163	56,0996
	Nic	-6,87500	12,85916	,983	-45,1829	31,4329
	Nic/AM	-34,31944*	11,34072	,045	-68,1039	-,5350
Nic/AM	Control	63,02778*	13,55475	,001	22,6477	103,4079
	Sal	52,11111*	13,55475	,007	11,7310	92,4912
	Nic	27,44444	13,55475	,289	-12,9357	67,8245
	Sal/AM	34,31944*	11,34072	,045	-,5350	68,1039

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

### Amígdala central

```
EXAMINE VARIABLES=FosB_AC BY Grupos_AC
/PLOT BOXPLOT NPLOT
/COMPARE GROUPS
/STATISTICS DESCRIPTIVES
/CINTERVAL 95
/MISSING LISTWISE
/NOTOTAL.
```

#### Resumen de procesamiento de casos

	Grupos_A C	Casos					
		Válido		Perdidos		Total	
		N	Porcentaj e	N	Porcentaj e	N	Porcentaj e
FosB_AC	Control	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
	Sal	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
	Nic	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
	Sal/AM	8	100,0%	0	0,0%	8	100,0%
	Nic/AM	6	100,0%	0	0,0%	6	100,0%

#### Pruebas de normalidad

	Grupos_A C	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístic o	gl	Sig.	Estadístic o	gl	Sig.
FosB_AC	Control	,281	4	.	,868	4	,291
	Sal	,287	4	.	,846	4	,215
	Nic	,240	4	.	,936	4	,632
	Sal/AM	,278	8	,070	,727	8	,004
	Nic/AM	,354	6	,018	,737	6	,015

a. Corrección de significación de Lilliefors

ONEWAY FosB\_AC BY Grupos\_AC  
/STATISTICS HOMOGENEITY WELCH  
/MISSING ANALYSIS  
/POSTHOC=GH ALPHA(0.05).

**Unidireccional**

**Prueba de homogeneidad de varianzas**

FosB\_AC

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
,169	4	21	,952

**ANOVA**

FosB\_AC

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	965,252	4	241,313	,766	,559
Dentro de grupos	6617,719	21	315,129		
Total	7582,971	25			

**Pruebas sólidas de igualdad de medias**

FosB\_AC

	Estadístico <sup>a</sup>	df1	df2	Sig.
Welch	,800	4	9,322	,554

a. F distribuida de forma asintótica

**Comparaciones planeadas**

	estimate	.y.	group1	group2	n1	n2	Statistic	p	method	p.adj	p.adj .signif
1	-8.000	AC	Control	Nic	4	4	6.0	0.69	Wilcoxon	1.	ns

2	12.750	AC	Control	Sal	4	4	12.0	0.34	Wilcoxon	1.	ns
3	11.250	AC	Control	Sal/AM	4	8	24.0	0.21	Wilcoxon	1.	ns
4	2.644	AC	Control	Nic/AM	4	6	14.5	0.67	Wilcoxon	1.	ns
5	8.750	AC	Nic/AM	Sal/AM	6	8	36.0	0.14	Wilcoxon	0.85	ns
6	12.250	AC	Nic	Nic/AM	4	6	15.0	0.61	Wilcoxon	1.	ns

### Amígdala basolateral

DATASET NAME Conjunto\_de\_datos1 WINDOW=FRONT.  
 EXAMINE VARIABLES=FosB\_ABL BY Grupos\_ABL  
 /PLOT BOXPLOT NPLOT  
 /COMPARE GROUPS  
 /STATISTICS DESCRIPTIVES  
 /CINTERVAL 95  
 /MISSING LISTWISE  
 /NOTOTAL.

### Resumen de procesamiento de casos

		Casos					
		Válido		Perdidos		Total	
	Grupos_ABL	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
FosB_ABL	Control	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
	Sal	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
	Nic	4	100,0%	0	0,0%	4	100,0%
	Sal/AM	9	100,0%	0	0,0%	9	100,0%
	Nic/AM	6	100,0%	0	0,0%	6	100,0%

### Pruebas de normalidad

		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Grupos_ABL	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
FosB_ABL	Control	,356	4	.	,847	4	,215
	Sal	,371	4	.	,785	4	,078
	Nic	,259	4	.	,954	4	,744
	Sal/AM	,182	9	,200*	,936	9	,544

Nic/AM	,292	6	,120	,914	6	,461
--------	------	---	------	------	---	------

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

ONEWAY FosB\_ABL BY Grupos\_ABL  
/STATISTICS HOMOGENEITY  
/MISSING ANALYSIS  
/POSTHOC=TUKEY ALPHA(0.05).

### Unidireccional

#### Prueba de homogeneidad de varianzas

FosB\_ABL

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
,905	4	22	,478

### ANOVA

FosB\_ABL

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3532,000	4	883,000	2,583	,065
Dentro de grupos	7522,000	22	341,909		
Total	11054,000	26			

T-TEST GROUPS=Grupos\_ABL(4 5)

/MISSING=ANALYSIS

/VARIABLES=FosB\_ABL

/CRITERIA=CI(.95).

### Comparaciones planeadas

	estimate	.y.	group1	group2	n1	n2	statistic	p	method	p.adj	p.adj. signif
1	-6.750	ABL	Control	Nic	4	4	-0.4106810	0.696	T-test	1.	ns
2	18.000	AB	Control	Sal	4	4	13.766.62	0.25	T-test	1.	ns

		L					1				
3	-2.583	AB L	Control	Sal/AM	4	9	- 0.182425 5	0.86 3	T-test	1.	ns
4	-19.75	AB L	Control	Nic/AM	4	6	- 14.239.28 2	0.22 2	T-test	1.	ns
5	17.166	AB L	Nic/AM	Sal/AM	6	9	19.505.61 7	0.07 3	T-test	0.44	ns
6	-13.000	AB L	Nic	Nic/AM	4	6	- 10.719.78 9	0.33 4	T-test	1.	ns