



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

“ESTUDIO DEL EFECTO ANTIDEPRESIVO Y ADICTIVO DE LA NICOTINA”

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

PATRICIA VIEYRA REYES

DIRECTOR DE TESIS: DR. RENÉ DRUCKER COLÍN

MÉXICO, D. F.

28 de Agosto del 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca que me otorgó durante el periodo Febrero 2004 - Septiembre 2008 y a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por la beca complemento.

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas todo el apoyo y orientación que recibí de personas que laboran dentro de dicha Institución, al Dr Juan Núñez Farfán, a Lilia Jiménez a María de Jesús Márquez a Lilia Espinoza y a Yolanda Morales porque todos ellos me apoyaron, animaron y guiaron cuando veía el camino sin salida. Gracias Dr Núñez Farfán y Lilia Jiménez, fueron la base de muchas de mis decisiones.

Agradezco al Dr. René Drucker Colín todo su apoyo a lo largo de mi Doctorado, por ser un ejemplo a seguir y por enseñarnos a confiar en nosotros mismos.

A mis asesores, la Dra María Luisa Fanjul Peña y Miguel Pérez de la Mora por su orientación y amistad.

A Marina R. Picciotto y Yann S. Mineur por creer y confiar en mí.

Agradezco a Diana Millán Aldaco y Marcela Palomero Rivero su guía técnica y ayuda cuando fue necesaria. Gracias Diana por tu amistad.

Sr Lino!!!!!!!!!!, mil gracias por su amistad y apoyo incondicional, no sé que hubiera hecho sin su ayuda, usted si sabe ser amigo.

INDICE

Abreviaturas	3
Resumen	5
Abstract	7
CAPITULO 1.- Estudio del efecto antidepresivo de la nicotina	
Introducción	9
Depresión	11
Alteraciones en la depresión	12
Tratamientos Antidepresivos	14
¿Que es la Nicotina?	14
<i>Farmacología de la Nicotina</i>	15
<i>Receptores Nicotínicos</i>	16
¿La nicotina un antidepresivo?	18
<i>Mecanismo de interacción de la Nicotina en los desordenes depresivos</i>	19
<i>Modelos animales para inducir depresión</i>	21
Hallazgos del efecto antidepresivo de la nicotina en modelos animales	24
Bulbectomía olfatoria como modelo animal para estudiar depresión	25
¿Porqué administrar nicotina de manera oral en modelos animales?	27
Estimulación Magnética Transcraneal (EMT), una nueva herramienta antidepresiva	29
Justificación y Planteamiento del Problema	30
Hipótesis	31
Objetivos	32
Materiales y Métodos	33
Resultados	37
Discusión	38
Conclusiones	42
Perspectivas	43

CAPITULO 2.- Estudio del efecto adictivo de la nicotina	
Introducción	44
¿Cuándo inicia la adicción a nicotina?	45
Modelos para inducir adicción a la nicotina	45
Abstinencia	47
Signos de abstinencia en ratas	48
Justificación y Planteamiento del Problema	50
Hipótesis	51
Objetivos	52
Materiales y Métodos	53
Resultados	55
Conclusiones	58
Anexo I	59
Anexo II	64
Referencias	85

ABREVIATURAS

aCh	acetilcolina
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
am	antes meridiano
AOB	Bulbo Olfatorio Accesorio
BNST	estria terminalis
BO	Bulbectomía Olfatoria
Cm	centímetros
CRF	Factor Liberador de Corticotropinas
CPP	Preferencia al Lugar Condicionado
DA	Dopamina
DH β E	dihydro- β -erythroidina
DFP	Diisopropil Fluorofosfato
DSM-IV	Manual Estadístico y Diagnóstico de Desórdenes Mentales-Cuarta Edición
EMT	Estimulación Magnética Transcraneal
FI	intervalo fijo
FR	tasa fija
FRL	Línea de ratas Flinders Resistente
FSL	Línea de ratas Flinders Sensibles
GABA	Ácido Gama Aminobutírico
Glut	Glutamato
H	Horas
His	Histamina
H.I.d.b.b	banda diagonal de Broca
HPA	Eje Hipotálamo Pituitario Adrenal
ICD-10	Clasificación Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud-Décima Revisión
5HT	Serotonina
H	Horas
Hz	Hertz
i.p.	Intraperitoneal

Kg	Kilogramo
L	Litro
LDT	núcleo laterodorsal
mg	miligramo
MOB	Bulbo Olfatorio Mayor
MOR	Movimientos Oculares Rápidos
mT	mini Teslas
NA	Noradrenalina
NAc	Núcleo Accumbens
nDR	Núcleo Dorsal del Rafé
nAChR	Receptores Acetilcolina Nicotínicos
NaSSA	Antidepresivos Serotoninérgicos y Noradrenérgicos
nc	Nicotina
nRD	núcleo dorsal del rafe
NF	Nado Forzado
pm	pasado meridiano
PPT	pedúnculo pontino tegmental
RB	Ratas Bulbectomizadas
s.c.	subcutánea
Sham	Bulbectomía Simulada
SNC	Sistema Nervioso Central
SNc	sustancia negra pars compacta
SNRI	Inhibidores de la Recaptura de Noradrenalina y Serotonina
TCAs	Antidepresivos Tricíclicos
TRN	Terapias de Reemplazo de Nicotina
UI	Unidades Internacionales
VTA	Area Tegmental Ventral

RESUMEN

Se ha postulado que el fumar es una forma de auto medicación utilizada por individuos deprimidos para aliviar sus síntomas, usando nicotina, el componente psicoactivo del tabaco. La base neurobiológica de esta asociación “nicotina – depresión” no es clara. Debido a esto, en la primera parte del estudio se evaluaron por nado forzado los síntomas depresivos inducidos por bulbectomía olfatoria en dos cepas de ratas, Wistar y Long Evans además de estudiar el efecto de la auto-administración oral de nicotina en ambas cepas. A la par, se compararon los efectos de la nicotina en ratas Wistar contra los efectos de la estimulación magnética transcraneal (EMT), una posible alternativa terapéutica para el manejo de la depresión.

Los resultados muestran que ratas Wistar bulbectomizadas desarrollan síntomas depresivos al ser evaluadas en nado forzado, 4 semanas después de la bulbectomía. Sin embargo, ratas Long Evans bulbectomizadas no presentan síntomas claros debido a la alta variabilidad en su comportamiento de nado. Estos resultados sugieren diferencias innatas en susceptibilidad al estrés entre estas dos cepas de ratas.

En ratas Wistar, el consumo voluntario de nicotina (1.2 mg/kg/día por 14 días) al igual que la nicotina administrada i.p. (1.5 mg/kg/día por 14 días) disminuye los síntomas depresivos de la bulbectomía. La estimulación magnética diaria (60 Hz y 0.7 mT / 2 H/ día por 14 días) también disminuyó los síntomas depresivos pero fue menos efectiva que el consumo de nicotina.

Los resultados apoyan la idea de posibles diferencias innatas para la susceptibilidad a la depresión y que los sujetos se auto administran nicotina para contrarrestar sus síntomas depresivos. Además, la nicotina muestra mayor efecto en disminuir los síntomas en sujetos deprimidos que la EMT. Sin embargo, ambas son herramientas útiles para el tratamiento de este síndrome.

Teniendo como antecedente que las ratas Wistar tienen un comportamiento más homogéneo y que tienden a ingerir mayor cantidad de nicotina, se seleccionó a esta cepa para realizar los experimentos de la segunda parte de la tesis. Ésta consistió en estudiar más a fondo si la auto administración oral de nicotina genera una posible adicción a este componente psicoactivo.

Se considera que el uso de tabaco inicia durante la adolescencia y quienes inician el consumo en esta etapa lo mantienen por mayor tiempo a lo largo de su vida que los

que inician en la edad adulta. Además, ha sido muy difícil replicar en modelos animales la adicción a nicotina. Debido a esto, se expuso a ratas Wistar recién destetadas (adolescentes) al consumo de nicotina en el agua de bebida hasta llegar a la edad adulta (2 meses después aproximadamente). Al llegar a la edad adulta se dividieron a los animales en 2 grupos, al grupo 1 se le dio la opción de elegir entre solo agua o una dosis alta de nicotina y al grupo 2 entre una dosis baja y una alta de nicotina. Posteriormente se sometieron a un periodo de abstinencia (solo agua/3 días). Después, se reintrodujo nicotina con el fin de estudiar si los animales retornan al consumo habitual de esta sustancia.

Los resultados muestran que la nicotina en el agua de bebida no afecta la ingesta normal de líquidos (25-30 ml/día). Además, el 70 % de los animales de ambos grupos consumen una cantidad significativamente mayor de dosis alta de nicotina que de agua o que de dosis baja. Al retirar la nicotina del agua de bebida, los signos de abstinencia se exacerban y disminuyen al reintroducirla. Por otro lado, los animales siguen mostrando mayor ingesta de dosis alta de nicotina después del periodo de abstinencia.

Estos datos soportan la idea de que la adolescencia es una etapa extremadamente importante para el desarrollo de consumo de nicotina en la edad adulta y que la administración crónica de nicotina en el agua de bebida es un buen modelo para desarrollar un posible estado adictivo.

ABSTRACT

It has been proposed that smoking could be a way of self medication, used by depressed individual to decrease their symptoms using nicotine, the psychoactive component of tobacco. The biological basis of the association “nicotine - depression” has not been elucidated. In this study, we compared the depression-like symptoms induced by olfactory bulbectomy (OBX) in the two inbred Wistar and Long Evans rat strains. We also analyzed the self-regulated oral intake of nicotine in these strains and the effect of nicotine on the depression-like symptoms of olfactory bulbectomy. Furthermore, we compared the antidepressant-like effects of nicotine on Wistar rats to those of transcranial magnetic stimulation (TMS), which has emerged as a therapeutic alternative for depression management.

Our results show that Wistar rats develop depression-like symptoms, demonstrated by the forced swim test (FST), 4 weeks after OBX. However, in bulbectomized Long Evans rats these symptoms cannot be assessed due to a higher degree of variability of the swimming behavior of this strain. These results suggest that there are some innate differences in susceptibility to stress between these two rat strains.

In Wistar rats, voluntary oral nicotine intake (1.2 mg/kg/day for 14 days) as well as nicotine administered as a single daily i.p. injection (1.5 mg/kg/day for 14 days) decrease the depression-like symptoms of OBX. Daily transcranial magnetic stimulation (60 Hz and 0.7mT for 2 h/day for 14 days) also decreases depression-like symptoms but is less effective than nicotine.

Our results support the idea that there are possible innate differences for depression susceptibility and that nicotine and TMS may be useful in the treatment of this syndrome.

Because Wistar rats show a homogeneous behavior and higher levels of nicotine consumption, we selected this strain to carry on the second set of experiments, which, consisted in analyzing if self administration of oral nicotine leads to addiction.

Tobacco use start in adolescence and it is considered that smokers who start at this age keep smoking for longer periods. Moreover, it has been difficult to generate animal models of nicotine addiction. Adolescent Wistar rats were exposed to oral nicotine for 2 months. When they reached adulthood, the animals were divided into two groups, group 1 had to

choose between water or a high nicotine solution; group 2 had to choice between high or low nicotine doses.

The results show that oral nicotine did not affect normal liquid consumption (25-30 ml/day). Moreover, 70 % of rats of both groups ingest a significant higher level of nicotine than water. Rats shown withdrawal symptoms when nicotine was excluded from the drinking bottles. When nicotine was reintroduced after the withdrawal period, animals kept their high levels of nicotine consumption.

These data support the notion that adolescence is an extremely important age to develop nicotine addiction through adulthood and that chronic nicotine administration in drinking water is a good model to develop a possible addictive state.

CAPITULO I

ESTUDIO DEL EFECTO ANTIDEPRESIVO DE LA NICOTINA

INTRODUCCIÓN

La depresión es un desorden heterogéneo crónico que a menudo se manifiesta con síntomas psicológicos, conductuales y fisiológicos [1]. Este desorden psiquiátrico afecta a más del 21% de la población a nivel mundial [170] por lo que se considera un problema importante de salud pública.

Entre las características bioquímicas que a menudo se observan en pacientes deprimidos se encuentran niveles elevados de cortisol plasmático [94] además de importantes cambios tanto en el sistema noradrenérgico como serotoninérgico pero las causas de esta alteración no son claras. Estos trastornos bioquímicos se traducen en las siguientes conductas: pérdida de la motivación e interés, inhabilidad para experimentar placer (anhedonia), pérdida del apetito, insomnio, retardo motor o agitación, pérdidas de autoestima, fatiga continua, dificultad cognitiva y pensamiento suicida [172], 10-15 % de sujetos hospitalizados por depresión se suicidan [5, 172].

Existen 3 tratamientos efectivos para la depresión; el tratamiento con antidepresivos, la psicoterapia y la terapia electroconvulsiva, recientemente reemplazada por la estimulación magnética transcraneal (EMT), una alternativa menos invasiva, menos estresante para los pacientes y que parece no producir efectos colaterales.

Se ha reportado que la incidencia de fumadores de cigarro es mucho mas alta en pacientes con depresión o con síntomas depresivos presentes [33, 53] y que la aplicación de parches de nicotina en sujetos deprimidos mejora el estado de ánimo e incrementa la latencia al primer periodo de sueño MOR el cual está alterado en esta patología [136]. En sujetos no fumadores y con trastornos depresivos, la aplicación transdermal crónica (mayor a un mes) de nicotina y la administración oral de fluoxetina, un antidepresivo tricíclico, también mejora su estado de ánimo según la escala de Hamilton [63]. Por otra parte se ha observado que individuos con una historia de depresión tienden a fumar más que los no deprimidos [20] y la supresión de este hábito provoca una depresión mayor [33] que se revierte con el uso de antidepresivos.

En base a estas observaciones se ha postulado que el fumar es una forma de automedicación utilizada por individuos deprimidos para aliviar sus síntomas depresivos usando nicotina, el componente psicoactivo del tabaco. La base neurobiológica de esta asociación “nicotina – depresión” no es clara. Debido a esto, en el presente trabajo se investigó esta interacción y se comparó el efecto de la nicotina con el de la EMT.

Para reproducir la depresión y analizarla se han reportado 12 modelos [168] y al menos 4 líneas de ratas genéticamente modificadas [156, 168], sin embargo, ninguno de estos modelos ha sido capaz de replicar el cuadro patológico en su totalidad. Además, es poco el apoyo experimental que indique autoadministración de nicotina incrementada por el efecto de la depresión o su relación con otros factores no controlados vinculados con la tendencia a ingerir nicotina y no con la depresión *per se*.

Uno de los modelos mas relevantes es la bulbectomía olfatoria [145] que consiste en la remoción bilateral de los bulbos olfatorios de las ratas que da como resultado una serie de alteraciones conductuales, neuroquímicas, neuroendocrinas y neuroinmunes; muchas de la cuales están relacionadas con los cambios observados en la depresión [79]. Los animales sometidos a esta cirugía responden al tratamiento crónico con antidepresivos, como sucede en humanos deprimidos, por lo que se considera el modelo que mejor replica la enfermedad y debido a estas características fue el modelo elegido en el presente estudio. Además, este modelo puede ser útil para estudiar susceptibilidades a la depresión o al consumo de nicotina en diferentes cepas de ratas, ya que en humanos ha sido reportada gran variabilidad interindividual hacia la depresión o al consumo de tabaco [93].

El presente trabajo consistió en comparar la susceptibilidad al desarrollo de síntomas depresivos después de la bulbectomía olfatoria en dos cepas de ratas, Wistar y Long Evans empleando la prueba conductual de nado forzado que es una de las mejores y mas usadas técnicas para estudiar actividad antidepresiva además de la prueba de campo abierto que fue utilizada para evaluar la actividad locomotora de los animales y diferenciar los efectos de la nicotina en la locomoción general de los efectos de la nicotina en nado forzado.

También se analizaron los efectos del consumo voluntario de nicotina en animales bulbectomizados y se comparó la eficacia del consumo oral y la inyección intraperitoneal de nicotina en ratas bulbectomizadas. Finalmente se compararon los efectos de la nicotina inyectada y la EMT.

Depresión

Desde los años 60s, la depresión ha sido denominada como “Depresión Mayor”, sin embargo hay varios subtipos, los cuales se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

Subtipos de Depresión

- a. Depresión melancólica: presenta síntomas graves y anormalidades neurovegetativas.
- b. Depresión reactiva: síntomas moderados, aparentemente en respuesta a factores externos.
- c. Depresión psicótica: presenta síntomas graves asociados con psicosis, ej., creer que la depresión es un castigo por errores pasados (una ilusión) o voces que dicen que la depresión es merecida (una alucinación).
- d. Depresión atípica: presenta humor frágil o lábil, hipersomnio, incremento de apetito y ganancia de peso.
- e. Distimia: presenta síntomas más suaves, pero con un curso más prolongado

Tomada de E.J. Nestler, 2002

El Manual Estadístico y Diagnóstico de Desórdenes Mentales-Cuarta Edición (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders—Fourth Edition (DSM-IV) [1] y la Clasificación Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (The International Classification of Diseases and Related Health Problems, Tenth revision (ICD-10) [1] señalan como síntoma central la incapacidad para experimentar placer “anhedonia”, sin embargo no existen signos o características clínicas claras que indiquen depresión y los subtipos de depresión pueden confundirse debido a la diferente respuesta a sustancias antidepresivas.

Los criterios diagnósticos de DSM-IV para detectar depresión se mencionan en la Tabla 2.

Tabla 2	
Criterio Diagnóstico para Depresión Mayor	
a.	Humor decaído
b.	Irritabilidad
c.	Baja autoestima
d.	Sentimientos de preocupación, culpa, desesperanza
e.	Decremento de la habilidad para concentrarse y pensar
f.	Decremento o incremento de apetito
g.	Pérdida o ganancia de peso
h.	Insomnio e Hiperinsomnio
i.	Baja energía, fatiga, agitación
j.	Decremento de interés por estímulos placenteros (ej. sexo, comida, interacción social)
k.	Pensamientos recurrentes de muerte y suicidio

Tomada de E.J. Nestler, 2002

Alteraciones en la depresión

En las décadas de los 60 y 70 se describieron alteraciones en los sistemas de neurotransmisión, principalmente de noradrenalina (NA), serotonina (5HT) y dopamina (DA), a la par que se desarrollaban agentes terapéuticos que incidían a este nivel.

Se considera que la alteración del sistema noradrenérgico media algunos de los síntomas fundamentales de la depresión, como déficit atencional, dificultades de concentración y de memoria, aislamiento social y estados de excitación. Su función es coordinar la respuesta central y periférica precoz al estrés [132]. Se han relacionado con la disfunción del sistema noradrenérgico tanto un aumento como una disminución de la frecuencia de descarga noradrenérgica. Esto produce una alteración en la sensibilidad de los receptores noradrenérgicos y en las interacciones con otros sistemas moduladores, resultando una

modulación noradrenérgica postsináptica inefectiva [128]. En la modulación del sistema noradrenérgico están involucrados otras áreas cerebrales además del *locus coeruleus* (córtex, tálamo, núcleo del rafe, hipocampo) y otros sistemas como el GABAérgico, glutamatérgico, de las encefalinas, neuropeptídico, etc. Está descrita una relación recíproca entre el sistema noradrenérgico, serotoninérgico [28, 111] y su relación con el eje HPA, como mediadores de la respuesta sistémica al estrés [159].

Se han propuesto que predisponen a padecer una depresión mayor alteraciones de la actividad presináptica serotoninérgica y alteraciones en los receptores postsinápticos 5-HT₂ y 5-HT_{1A} y también se ha objetivado una relación recíproca entre las alteraciones del sistema serotoninérgico y el eje hipotálamico pituitario adrenal (HPA) [94].

Existen multitud de hallazgos que apoyan la influencia del sistema serotoninérgico en la fisiopatología de la depresión, como por ejemplo, la posibilidad de inducir sintomatología depresiva con técnicas que deplecionan el L-triptófano, el precursor de 5-HT [39, 67], las bajas concentraciones de L-triptófano, 5-HT y un metabolito de la 5-HT, 5-HIAA halladas en estudios histológicos post-mortem de pacientes suicidas y el aumento de la concentración de L-triptófano con tratamiento antidepresivo. Además, en la Depresión Mayor se reporta un incremento del número y de la afinidad de los receptores postsinápticos 5-HT₂ [9, 110] y una regulación a la baja y desensibilización de los receptores 5-HT_{1A} postsinápticos. En cuanto a la relación con el eje HPA, se ha demostrado que la 5-HT estimula este eje a través de la activación de los receptores 5-HT_{1A} y 5-HT₂ que actúan sobre la Hormona estimulante corticotrópica.

En aproximadamente la mitad de individuos con depresión se ha observado excesiva activación del HPA y esta anomalía es corregida con el uso de antidepresivos [72, 133]. Algunos pacientes muestran incremento de la producción de cortisol plasmático y aumento de la concentración del factor liberador de corticotropinas (CRF) en líquido cerebroespinal [7, 72]. Existe una hipótesis que considera que altos niveles de cortisol mantenidos durante largos periodos de tiempo pueden ser tóxicos para neuronas hipocámpales lo que puede contribuir a algunas de las anomalías cognitivas vistas en la depresión aunque el mecanismo molecular y celular es desconocido. En modelos animales el estrés induce cambios en el hipocampo (reducción en arborización dendrítica o nacimiento de nuevas neuronas), lo que puede ser relacionado con la pequeña reducción del volumen hipocámpal observada en pacientes deprimidos [22, 140].

Tratamientos Antidepresivos

A partir de los años 20s y 30s han sido descritos varios tratamientos para la depresión que aun en nuestros días siguen siendo utilizados, como la terapia electroconvulsiva y el psicoanálisis, este último no ha mostrado ser un método científico efectivo aunque en pacientes con síntomas ligeros y en combinación con antidepresivos tiene efectos positivos.

Los antidepresivos son un grupo heterogéneo de sustancias que actúan principalmente incrementando la disponibilidad de monoaminas en la terminal sináptica.

El descubrimiento por serendipia de la actividad antidepresiva de los inhibidores de la monoamina oxidasa en los 50s (derivados de estudios de drogas antituberculares) [114], por ejemplo iproniazid, desencadenó una serie de investigaciones acerca de nuevas sustancias, como los antidepresivos tricíclicos (TCAs) (derivados de estudios con antihistamínicos) [114], por ejemplo imipramina o desipramina, que constituyen la primera generación de antidepresivos y son caracterizados por la inhibición de la recaptura de noradrenalina con variaciones en el bloqueo del receptor e inhibición de la recaptura de serotonina [35]. A partir de los años 80s se desarrollaron otras sustancias como los inhibidores de la recaptura de noradrenalina y serotonina (SNRI) por ejemplo el venlafaxina; antidepresivos serotoninérgicos duales como el nefazodone que bloquea la recaptura de serotonina y el receptor postsináptico 5HT₂, antidepresivos serotoninérgicos y noradrenérgicos (NaSSA) como el mirtazapine e inhibidores de la recaptura de dopamina como el bupropion [170].

¿Que es la Nicotina?

El tabaco contiene por lo menos 4000 componentes químicos, siendo el principal componente psicoactivo el alcaloide nicotina, su efecto sobre el Sistema Nervioso Central (SNC) resulta de la interacción con los receptores nicotínicos de la acetilcolina. La acetilcolina es uno de los principales neurotransmisores del cerebro y se ha relacionado con una multitud de funciones entre las que destacan la regulación del apetito, la motilidad, el ciclo vigilia-sueño y recientemente con los trastornos depresivos.

Farmacología de la Nicotina

Cuando el tabaco es fumado, la nicotina es absorbida rápidamente aunque la cantidad absorbida depende del volumen e intensidad de succión, la dilución con el aire y la profundidad de la inhalación. Después de la bocanada, se alcanzan altos niveles de nicotina en el cerebro en 10 o 20 s, mas rápido que con administración intravenosa [14]. Las concentraciones de nicotina en la sangre arterial después de fumar un cigarro son usualmente entre 20 y 60 ng/ml y las concentraciones después de la primer bocanada son 7 ng/ml [92].

La absorción de nicotina a través de las membranas biológicas depende del pH. La absorción es rápida en pulmones presumiblemente por la amplia área que presentan los alveolos y el pH pulmonar (7.4). Cerca de 1 mg (0.3 – 2 mg) de nicotina es absorbido al momento de fumar un cigarrillo [56, 85].

Las terapias de reemplazo de nicotina (TRN), tales como la goma de mascar, parches transdermales, spray nasal y tabletas sublinguales tienen pH alcalino para facilitar la absorción de nicotina a través de las membranas biológicas, sin embargo la absorción es baja e incrementa los niveles de nicotina mas gradualmente que con el fumar .

Posterior a su absorción, la nicotina entra en el torrente sanguíneo donde a un pH de 7.4 el 69% es ionizada, el 31% es desionizada y el 5% se une a proteínas plasmáticas [16]. Evidencias provenientes de estudios animales muestran que los tejidos con mayor afinidad para la nicotina son el riñón, hígado, pulmón, cerebro y corazón en este orden; el músculo esquelético tiene moderada afinidad para la nicotina y el tejido adiposo tiene la mas baja afinidad [15], sin embargo, basados en muestras de autopsias de fumadores, la nicotina tiene mayor afinidad por el hígado, seguida por riñón, bazo y pulmones y la mas baja afinidad es por el tejido adiposo [158] denotando que la afinidad depende de la vía de administración.

Con la administración transdermal de nicotina, las concentraciones de esta sustancia en jugo gástrico son 60 veces mas altas que en plasma y en saliva son 11 veces mas altas que en plasma, sin embargo con la administración de nicotina al fumar, las concentraciones en jugo gástrico son 53 veces mas altas que en plasma y 87 veces mas altas en saliva. [88]. La nicotina tiene un bajo volumen de absorción en estomago porque es ionizada en el jugo gástrico pero es mejor absorbida en intestino delgado porque tiene un pH más alcalino y posee una gran superficie de absorción. La nicotina

también se acumula en la leche materna, además de que cruza la barrera placentaria fácilmente y existe evidencia de acumulación de nicotina en suero fetal y líquido amniótico en concentraciones mayores que en el suero materno [40].

Receptores Nicotínicos

En el sistema nervioso central los receptores nicotínicos son pre-sinápticos en su mayoría pero también los hay post-sinápticos. Son canales catiónicos (Na^+ o Ca^{++}) operados por ligandos [90]. Tienen una estructura pentamérica con al menos dos sitios de unión-ligando en la interfase entre las subunidades [37, 115] (Fig 1 A). Al unirse la acetilcolina o nicotina a estos sitios generan un cambio conformacional del receptor y apertura del canal lo que conlleva a un flujo de cationes dentro y fuera de la célula y la liberación de neurotransmisores tales como dopamina [123, 124], ácido gama aminobutírico (GABA) [76], Glutamato [105], serotonina [129] y péptidos opioides [21, 122]. Los genes que codifican para dichas subunidades han sido identificados y clonados en mamíferos ($\alpha 1$ - $\alpha 10$); ($\beta 1$ - $\beta 9$) y varias de estas subunidades han sido encontradas en el sistema nervioso central ($\alpha 2$ - $\alpha 7$; $\beta 2$ - $\beta 4$). El arreglo o ensamble de estas subunidades determina diferentes subtipos de receptores nicotínicos que difieren en sus propiedades farmacológicas y biofísicas. Las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$, γ , δ y ϵ forman el receptor muscular; las subunidades $\alpha 2$ - $\alpha 6$ y $\beta 2$ - $\beta 4$ representan el receptor neuronal heteropentamérico (Fig 1 C) y los $\alpha 7$ - $\alpha 10$ representan el receptor neuronal homopentamérico (Fig 1 B).

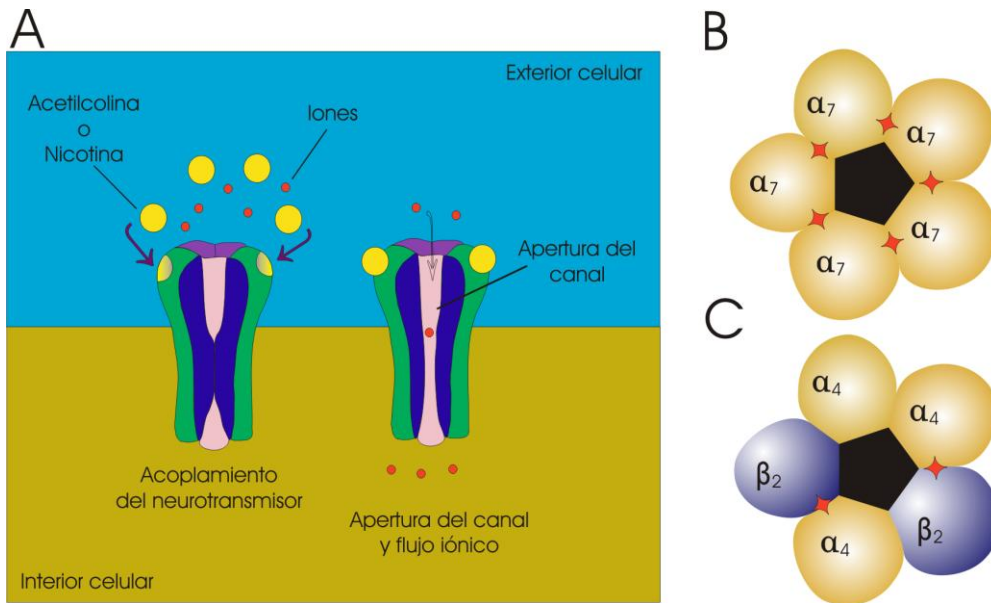


Figura 1. Esquema que representa un receptor nicotínico. El panel A muestra el mecanismo de acción del receptor nicotínico tipo canal ante el acoplamiento de nicotina o de acetilcolina. En el panel B se muestra un esquema de un receptor nicotínico homopentamérico (α_7) con cinco sitios de unión para acetilcolina o nicotina. En el panel C se ilustra un receptor heteropentamérico ($\alpha_4\beta_2$) con dos sitios de unión. Las estrellas señalan los sitios de unión.

Los receptores nicotínicos no solo se encuentran en el cuerpo neuronal y dendritas, también se encuentran en las terminales axónicas [6] y están distribuidos en varias regiones del cerebro (Tabla 1), los principales hallazgos provienen de estudios de inmunohistoquímica, de la utilización de ligandos radioactivos (binding) y de hibridación *in situ*. De estos estudios se ha concluido que el receptor nicotínico $\alpha_4\beta_2$ es uno de los más abundantes en el cerebro. El receptor $\alpha_4\beta_2$ y el α_7 están asociados a desórdenes conductuales como la depresión y adicción a nicotina [6, 139, 155].

Tabla 3
Distribución de subtipos de nAChRs en el cerebro

ÁREA CEREBRAL	SUBUNIDADES
Corteza cerebral	$\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$
Hipocampo	$\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$
Cuerpo Estriado	$\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 6\beta 2$, $\alpha 4\alpha 6$
Núcleo del rafé dorsal	$\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$
Hábenula	$\alpha 3\beta 4$
Locus coeruleus	$\alpha 3\beta 4$
Cerebelo	$\alpha 3\beta 4$
Núcleo accumbens	$\alpha 4\beta 2$, $\alpha 6\beta 2$
Núcleo interpeduncular	$\alpha 3\beta 4$
Hipotálamo	$\alpha 7$
Septum	$\alpha 7$
Substancia negra	$\alpha 4\beta 2$, $\alpha 6\beta 2$
Tracto óptico	$\alpha 3\beta 4$

Lindstrom *et al*, 1996 [89]

La nicotina un antidepresivo?

Se ha sugerido que la nicotina puede jugar un papel importante como antidepresivo [107, 136, 137, 139]. Varios estudios epidemiológicos han mostrado la existencia de una fuerte comorbilidad entre depresión y el fumar, en efecto, el tiempo de prevalencia de depresión es directamente correlacionada con la prevalencia de dependencia a nicotina [23, 25]. La incidencia del consumo de cigarro es mucho mayor en pacientes con depresión o cuando los síntomas depresivos están presentes [25], además fumadores con historia depresiva tienen mas problemas para dejar de fumar [32] sobretodo, el cese de fumar frecuentemente precipita síntomas depresivos que pueden ser revertidos con la reintroducción del fumar [147] o con el uso de antidepresivos. Estudios clínicos han mostrado que la aplicación de parches transdermales de nicotina mejora el estado de ánimo de pacientes deprimidos no fumadores e incrementa la latencia al primer periodo del sueño de movimientos oculares rápidos (MOR) el cual está alterado en esta patología [135, 137].

Mecanismo de interacción de la Nicotina en los desordenes depresivos

Como se mencionó anteriormente sujetos deprimidos presentan cambios en la actividad tanto en el sistema noradrenérgico como serotoninérgico, así como altos niveles de cortisol plasmático [94], sin embargo las causas de estas alteraciones no son claras.

Actualmente existe evidencia suficiente de que la nicotina es capaz de incrementar la liberación de serotonina en varias regiones del cerebro entre las cuales podemos citar: corteza, hipocampo, estriado, septum lateral, núcleo dorsal del rafe (nRD) y médula espinal [60, 108, 129]. El efecto fisiológico que tiene la 5-HT liberada por nicotina dependerá del tipo de receptor serotoninérgico que se estimula así como de la región cerebral donde se liberó [144]. Varios estudios han reportado las propiedades antidepressivas de la nicotina tanto en humanos [112, 135], como en modelos animales de depresión [139, 155, 163] e inclusive en ratas normales [162].

Resultados experimentales señalan que existen receptores nicotínicos localizados en la terminal pre-sináptica de las neuronas serotoninérgicas. Por ejemplo, en estudios *in vitro* se ha observado que las neuronas del nRD al ser estimuladas con nicotina (10-300 μ M) disminuyen su frecuencia de disparo pero simultáneamente se incrementa la liberación de 5-HT en el medio [109]. De hecho se ha sugerido que la nicotina actúa sobre las neuronas serotoninérgicas de dos maneras: la primera, utilizando un mecanismo directo de tipo excitatorio y un mecanismo indirecto de naturaleza inhibitoria, ambos mecanismos actúan en las neuronas del nDR y tienen efectos fisiológicos opuestos [87, 109]. Además, se ha demostrado que la nicotina actúa sobre receptores tipo 5-HT_{2C} [150] y se ha propuesto que modula la expresión de receptores 5HT_{2C} localizados en ciertas regiones corticales y límbicas envueltas en la etiología de la depresión [80, 104]. De ahí se puede sugerir que uno de los mecanismos antidepressivo de la nicotina sea estimulando la liberación de 5-HT de las terminales pre-sinápticas del nDR tal como lo hacen los antidepressivos tricíclicos como la fluoxetina, uno de los antidepressivos más usados actualmente.

Este mecanismo de liberación de 5-HT podría estar mediado no solamente por la acción de la nicotina administrada exógenamente, sino también de manera endógena por la estimulación que proviene de las fibras colinérgicas del núcleo laterodorsal (LDTg) y pedúnculo pontino tegmental (PPT) del tallo cerebral.

Se ha sugerido que la administración de nicotina puede tener influencia positiva en el tratamiento con agentes serotoninérgicos ya que nicotina y fluoxetina pueden tener efectos sinérgicos en tratamientos agudos pero no en tratamientos crónicos [163].

Experimentos usando microdiálisis *in vivo* han reportado que una sola inyección de fluoxetina induce un transitorio incremento de 5HT extracelular mientras repetida administración incrementa los niveles base de 5HT [83]. En adición, la administración crónica de fluoxetina induce incremento en la desensibilización de receptores 5HT_{2C} [150, 173].

Recientemente se reporto que el efecto antidepresivo de la nicotina es inmediato desde la primera administración. Lo cual no se observa con la administración de fluoxetina ya que el efecto antidepresivo se observa cuando es administrado de manera crónica [162].

Se ha observado que inhibidores de la recaptura de 5HT aumentan la respuesta postsináptica a dopamina en las terminales del sistema mesolímbico [4, 29] al igual que la nicotina [73, 116], lo que da pie junto con otros hallazgos a sugerir otro mecanismo de acción antidepresivo de la nicotina relacionado con el sistema dopaminérgico.

Neuronas dopaminérgicas expresan una gran variedad de subunidades de receptores nicotínicos, los cuales se ha propuesto, regulan la neurotransmisión dopaminérgica en estriado. Neuronas dopaminérgicas en sustancia negra pars compacta (SNc) y área tegmental ventral (VTA) de roedores expresan mRNAs para las subunidades α_4 , α_5 , α_6 , β_2 y β_3 así como bajos niveles de α_3 , α_7 y β_4 [10]. Esta diversidad de expresión de subunidades da una gran variedad de pentámeros en las regiones somatodendríticas (VTA/SNc) y las terminales axónicas (estriado) y como consecuencia una diversidad de funciones, entre ellas, los efectos de refuerzo o adictivos [57, 99, 157]. Los 2 pares α/β que forman los sitios de unión- ligando en axones dopaminérgicos de estriado se sugiere son principalmente α_4/β_2 o α_6/β_2 (α_3/β_2 en primates) [91, 126]. La quinta subunidad en el pentámero puede consistir de cualquier otra subunidad incluyendo α_5 o β_3 . Existen diferencias entre las subunidades presentes en cada región, mientras α_7 y β_4 están presentes en VTA/SNc [36, 126], la subunidad α_7 ha sido expresada en estriado por neuronas no dopaminérgicas [11].

Las subunidades α_4 , α_5 , α_6 , β_2 y β_3 (y α_3 en primates) son encontradas en alta densidad en terminales axónicas dopaminérgicas, sin embargo, es carente la subunidad α_3 en estriado de roedores pero no en primates [36, 126, 171].

Evidencia electrofisiológica muestra que receptores nicotínicos expresados en neuronas que secretan dopamina en VTA pueden ser desensibilizados por prolongada exposición a nicotina a dosis comúnmente encontradas en plasma de fumadores [121].

Esta observación es consistente con resultados de estudios de microdialisis *in vivo* que han mostrado que los efectos estimulantes de la inyección de nicotina en la liberación de dopamina en NAc son extinguidos en ratas a las que se les administra nicotina a una tasa que mantiene la concentración de nicotina plasmática en un rango encontrado en fumadores habituales [18].

La administración de antagonistas de receptores nicotínicos a animales crónicamente expuestos a nicotina precipita los cambios conductuales asociados con el síndrome de abstinencia de nicotina y decrementa el flujo de DA en NAc [69]. Los cambios en el flujo de dopamina han sido interpretados como un correlato neuronal de la anhedonia o disforia experimentada por fumadores cuando intentan dejar este hábito. Epping-Jordan *et al*, 1998 [45] han reportado que la abstinencia de nicotina siguiendo un periodo de administración constante decrementa los efectos gratificantes de la auto-estimulación intracraneal. Los resultados implican que siguiendo un periodo de constante exposición a la nicotina, neuronas DA de mesoacumbens pueden volverse dependientes de la nicotina para mantener sus niveles normales de actividad [11].

Estos datos sustentan la hipótesis de que reducciones en la concentración de nicotina plasmática siguiendo un periodo de exposición crónica pueden provocar un estado anhedónico que el fumador trata de evitar por lo que continúa fumando.

Modelos animales para inducir depresión

Como en muchos otros desordenes psiquiátricos, es casi imposible tener un perfecto modelo animal de depresión [114]. Los roedores no tienen una conducta humana típica como baja autoestima o tendencias suicidas, aunque muchas características de este complejo desorden pueden ser reproducidas, además, el poco conocimiento de la vulnerabilidad genética hace más difícil replicar en animales la depresión.

Los modelos animales proveen una importante herramienta para investigar susceptibilidades genéticas, propiedades farmacológicas, consumo de sustancias y factores neurobiológicos envueltos en desórdenes depresivos.

Estudios epidemiológicos muestran que alrededor del 40 – 50% del riesgo de padecer depresión es genético [47] y al momento se han desarrollado al menos 4 líneas de ratas genéticamente modificadas [156].

La depresión también es descrita como un desorden relacionado con el estrés y una buena evidencia es que episodios de depresión a menudo se manifiestan en pacientes estresados, aunque el estrés *per se* no es suficiente causa de depresión [114].

Como resultado de los antecedentes mencionados, todos los modelos animales siguen dos principios: 1.- Acción de antidepresivos conocidos y 2.- Respuesta al estrés [125, 155], algunas de estas pruebas, en particular el nado forzado han sido muy útiles en predecir eficacia antidepresiva de nuevas sustancias.

Un dato curioso es que por serendipia, al tratar de desarrollar una cepa genéticamente resistente a los efectos del organofosfato anticolinesterasa, diisopropil fluorofosfato (DFP) [117], se obtuvo el resultado contrario, una línea de ratas sensibles a tal sustancia, las Flinders Sensibles (FSL). Tales ratas son hiper-responsivas a la estimulación colinérgica y muestran una exagerada inmovilidad en la prueba de nado forzado en comparación con las Flinders Resistentes (FRL) [155], esta inmovilidad se contrarresta con la administración de drogas antidepresivas usadas clínicamente por lo que también se considera un modelo de depresión.

En la tabla 4 se muestran algunos de los modelos animales mas utilizados para investigar el comportamiento y efecto de nuevas sustancias en la depresión.

Tabla 4.- Ejemplo de modelos animales utilizados en investigación de la depresión	
Modelos	Características
Nado Forzado (Forced swim test)	Antidepresivos administrados agudamente incrementan el tiempo que el animal lucha o se esfuerza por escapar de una cámara con agua, la pérdida de esfuerzo se piensa representa desesperanza
Suspensión de la cola (Tail suspension test)	Antidepresivos administrados agudamente incrementan el tiempo que el animal se esfuerza por escapar cuando se le suspende de la cola, la pérdida de esfuerzo se piensa representa desesperanza
Desesperanza aprendida (impotencia) (Learned helplessness)	Animales expuestos a shocks en la patas toman un tiempo mas largo para escapar o no escapan cuando son expuestos de nueva cuenta a shocks; los antidepresivos disminuyen la latencia de fuga y fracasos.

Estrés crónico (Chronic mild stress)	Animales expuestos repetidamente a varios tipos de estrés (frío, interrupción del ciclo luz-oscuridad, shocks en las patas, restricción, etc.) muestran reducida preferencia por la glucosa y comportamiento sexual; sin embargo esto ha sido difícil de replicar, en particular en ratones.
Estrés social (social stress)	Animales expuestos a varios tipos de estrés social (proximidad a machos dominantes, olores de depredadores naturales) muestran anormalidades conductuales; tales anormalidades han sido difíciles de reproducir, en particular en ratones.
Estrés a edad temprana (Early life stress)	Animales separados de sus madres muestran anormalidades conductuales y del eje Hipotálamo Pituitario Adrenal (HPA) que persisten en la edad adulta y el uso de antidepresivos revierte estas anormalidades.
Bulbectomía olfatoria	La lesión química o quirúrgica al bulbo olfatorio causa anormalidades conductuales, algunas de las cuales pueden ser revertidas por antidepresivos.
Condicionamiento al miedo (Fear conditioning)	Animales previamente expuestos a señales neutras (ej. sonido) o el contexto (ej. jaula) que ha sido asociada con un estímulo aversivo (ej. un shock) muestran respuestas similares al miedo.
Pruebas basadas en gratificación	Animales muestran respuestas similares al consumo de sustancias de abuso en ensayos de condicionamiento clásico y operante (ej. preferencia al lugar condicionado, auto-administración de drogas, refuerzo condicionado y ensayos de auto-estimulación intracraneal).
Pruebas basadas en cognición	La capacidad de los animales para atender, aprender y recordar es medida en una variedad de circunstancias. ej. memoria espacial (Laberinto de Morris, laberinto radial), memoria de trabajo (Laberinto en T), y atención (prueba de 5 opciones seriales).

Tomada de E.J. Nestler, 2002

Hallazgos del efecto antidepresivo de la nicotina en modelos animales

Estudios animales han demostrado que el tratamiento crónico con nicotina produce efectos antidepresivos.

Semba *et al*, 1998 [139] implantó ratas con bombas miniosmóticas para liberar 1.5 mg/kg/día de nicotina y las sometió al modelo de desesperanza aprendida, a los 14 días el efecto antidepresivo de la nicotina fue evidente (disminuyó el número de escapes fallidos), y éste fue bloqueado con la coadministración del antagonista del receptor nicotínico mecamilamina indicando que la actividad antidepresiva fue mediada por estos receptores.

También utilizando el modelo de desesperanza aprendida se demostró que SIB-1508Y, un agonista de receptores nicotínicos revertía los déficits de escape [48].

Comparando ratas FSL con FRL, se observó que la administración aguda y crónica de nicotina (0.4 mg/kg s.c) disminuye el tiempo de inmovilidad en nado forzado de ratas FSL pero no de FRL [155], lo que demuestra el efecto antidepresivo de la nicotina en ratas deprimidas (FSL) pero no manifiesta ningún efecto en ratas FRL. Sin embargo, ese mismo año se realizó la misma comparación entre ratas FSL y FRL pero administrando la nicotina vía oral y ambas líneas de ratas, tratadas crónicamente con nicotina, disminuyen su tiempo de inmovilidad en nado forzado en comparación con animales no expuestos a nicotina o expuestos a periodos cortos [42]. Este hallazgo indica que las propiedades antidepresivas de la nicotina son independientes de diferencias genéticas, como también se sustenta en la presente tesis.

Vázquez-Palacios *et al*, 2004 [162] reportó el efecto antidepresivo de la nicotina en ratas Wistar sometidas a nado forzado, este efecto se manifestó con la inyección aguda de nicotina, no incrementó con la administración crónica y desapareció cuando se suspendieron las inyecciones. Además, la coadministración por 7 días (subcrónica) de nicotina con fluoxetina produce un efecto mayor. La administración de solo de fluoxetina tiene efecto cuando es inyectada por 14 días (crónicamente) y regresa a niveles normales 7 días después de suspender el tratamiento [162].

Una evidencia indirecta del efecto antidepresivo de la nicotina fue el demostrado por Martínez-González *et al*, 2002 [103] cuando al tratar con nicotina a ratas consumidoras de alcohol y deprimidas por el modelo de clomipramina neonatal [165], observó una disminución en el consumo etílico.

Bulbectomía olfatoria como modelo animal para estudiar depresión

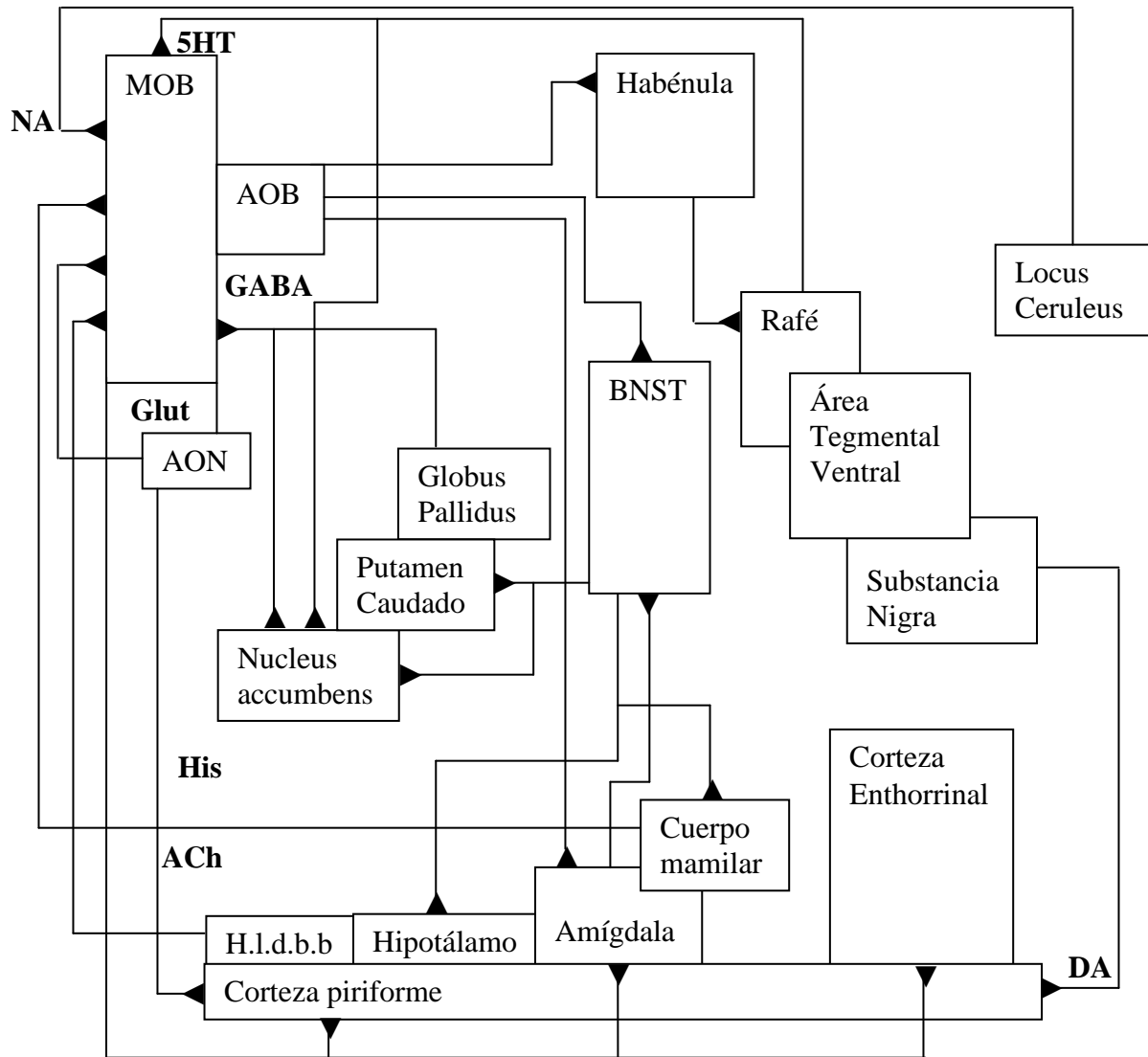
Watson, 1907 [166], fue uno de los primeros investigadores que comentó los cambios conductuales que ocurren en la rata después de la bulbectomía olfatoria.

Los bulbos olfatorios son extensiones del telencéfalo rostral y constituyen cerca del 4% de la masa total del cerebro en la rata adulta [27]. Mantienen conexiones eferentes con la región mesocortical y subcortical por lo que es predecible que la remoción de los bulbos olfatorios tenga un impacto mayor en las funciones del cerebro y no solo provoque cierto grado de anosmia.

Algunos de los cambios subsecuentes pueden resultar del daño quirúrgico y edema [26] y un posterior daño mayor por la interrupción del flujo sanguíneo local que conlleva a neuro-degeneración. A nivel celular, estos efectos provocan cambios en el número y función sináptica [160]. Duman *et al*, 2001 postulan que estos cambios neurodegenerativos son similares a los que padecen los pacientes deprimidos [43, 44]. Las anormalidades vistas en ratas bulbectomizadas son resultado de cambios disfuncionales en muchas áreas del cerebro como consecuencia de la interrupción de conexiones neuronales entre el bulbo olfatorio y otras regiones.

La rata posee dos órganos quimiosensoriales, el epitelio olfatorio que envía axones al bulbo olfatorio mayor y el órgano vomeronasal que proyecta al bulbo olfatorio accesorio. El tercer componente de este sistema es el nervio terminal que inerva al epitelio y al órgano vomeronasal [19]. En el bulbo olfatorio mayor existen seis regiones bien definidas; la capa mas externa está formada por el glomérulo y las células en penacho, las cuales son principalmente dopaminérgicas y GABAérgicas [145] y se comunican con la corteza piriforme, amígdala y stria terminalis (por su citoarquitectura considerada una extensión del núcleo central y medial de la amígdala) [145]. La siguiente capa es de células mitrales y en penacho medias e internas; contienen neuronas ACh, 5HT y NA y proyectan a corteza piriforme, amígdala (anterior y posterolateral) y corteza entorrinal [145]. Las células en penacho proyectan solo a corteza piriforme anterior [26]. El bulbo olfatorio accesorio proyecta al tracto olfatorio dorsal, amígdala y stria terminalis [145]. Ni el bulbo olfatorio mayor ni el accesorio proyectan contralateralmente, y las fibras del mayor proyectan a través del accesorio hacia el tracto olfatorio lateral. De esta forma, la lesión del bulbo accesorio afectará al bulbo olfatorio mayor. Las conexiones de la amígdala van a núcleo accumbens, putamen caudado e hipotálamo.

La figura 2 muestra una representación esquemática de aferencias y eferencias del bulbo olfatorio.



Tomado de J. P. Kelly, 1997

Figura 2.- Representación esquemática de aferencias y eferencias del bulbo olfatorio. ACh; acetilcolina, DA; dopamina, His; histamina, Glut; glutamato, GABA; ácido gama aminobutírico, NA; noradrenalina, 5HT; serotonina, MOB; bulbo olfatorio mayor, AOB; bulbo olfatorio accesorio, BNST; estria terminalis, H.I.d.b.b; banda diagonal de Broca.

Los animales sometidos a este modelo responden al tratamiento crónico (más de 14 días) con antidepresivos, al igual sucede en humanos deprimidos por lo que se considera el modelo que mejor replica la enfermedad.

Un periodo de 2 semanas post-cirugía es el tiempo óptimo en el que se desarrolla el síndrome de bulbectomía [160], el cual consiste en los siguientes cambios:

Cambios conductuales: incremento de comportamiento muricidal [27], canibalismo [50], disminución de libido [84], incremento exploratorio [143], hiperactividad en campo abierto [82], aumento de actividad nocturna [52], déficit de memoria como se observa en la prueba de evitación pasiva [154], en laberinto de Morris [161] y radial [61]; incremento de entradas al brazo abierto en laberinto elevado en mas y cambios en comportamiento de ingesta de alimento [79], y aversión al sabor [75].

Un importante punto es que la respuesta conductual de ratas sham y no operadas (e.j. que solo recibieron anestésico) es similar en laberinto elevado en mas, campo abierto y laberinto de Morris [161], lo que indica que la operación sham no interfiere con las pruebas conductuales realizadas en RB.

Cambios en la neurotransmisión: varios estudios han demostrado reducción en la concentración de noradrenalina [145], la cual es revertida por tratamiento antidepresivo. Se ha observado también una reducción en el contenido de serotonina e incremento de su principal metabolito ácido 5-hydroxi indol acético (5HIAA) [75] en corteza amigdaloides y frontal principalmente [127], esto también es revertido por tratamiento antidepresivo. Además, disminución de receptores muscarínicos [70], sin embargo, en víctimas de suicidio se ha encontrado incremento en la densidad de estos receptores [106]. También se reporta secreción normal de corticosterona en ratas bulbectomizadas en fase de luz pero hipersecreción en la fase oscura, lo que sugiere secreción circadiana alterada de corticosterona [145].

¿Porqué administrar nicotina de manera oral en modelos animales?

El patrón típico de consumo de nicotina en humanos es crónico de acceso ilimitado y los fumadores pueden ajustar su consumo para mantener los niveles de nicotina sérica como sea deseado [141].

La nicotina inyectada tiene efectos relativamente cortos y para producir efectos similares al consumo humano pueden ser necesarias varias inyecciones diarias.

Estudios encaminados al desarrollo de modelos de adicción han utilizado varias formas de administrar nicotina, aunque experimentos con roedores muestran efectos controversiales. El programa más usado en ratas es el FR (tasa fija), donde cierto número de respuestas son requeridas para cada infusión intravenosa de nicotina. Los primeros estudios utilizaron un programa de reforzamiento continuo donde cada respuesta producía una inyección (FR-1) aunque la respuesta no variaba entre la inyección de nicotina o solución salina [34] y las ratas incrementaban significativamente la respuesta no solo de la palanca que liberaba nicotina sino también de la palanca control inactiva cuando la nicotina estaba disponible [34, 62].

Usando el procedimiento de 2 palancas e incrementando los requerimientos de respuesta para la inyección intravenosa de nicotina (e.j. FR-5) se han observado mayores tasas de respuesta en la palanca activa comparada con la inactiva sobre un rango de dosis de nicotina [30]. Sin embargo los factores que regulan la adquisición de auto-administración no han sido evaluados.

El método de libre acceso a 2 bebederos ha sido muy utilizado en estudios de auto-administración oral de alcohol, cocaína, morfina y nicotina [151].

A continuación se mencionan las ventajas del uso del método de libre acceso a 2 bebederos:

- Las ratas beben en diferentes periodos, lo que estimula la distinción periódica de nicotina como probablemente ocurre en fumadores o mscadores de tabaco.
- Los animales son libres de consumir nicotina cuando lo deseen.
- Se evita manipulación excesiva.
- Se encontró que ratas titulan su consumo de nicotina casi a cantidades idénticas cuando se le ofrecen soluciones con diferentes concentraciones de nicotina [93].
- La adición de quinina, una sustancia desagradable para las ratas, en ambos botes, reduce el consumo de agua al 50% pero no afecta el consumo del bebedero que contiene nicotina [93].
- Durante estudios de consumo forzado (ambos botes conteniendo nicotina), las ratas consumen entre 13 y 19 mg/kg/día de nicotina sin reducir su consumo total significativamente lo que indica que el sabor de la nicotina puede no ser aversivo [93].

-
- La auto-administración operante (e.j. intravenosa) de nicotina da como resultado consumos cerca de 0.18-1.38 mg/kg/día, lo cual es muy cercano al consumo oral de nicotina 0.41–2.2 mg/kg/día [93].

Estimulación Magnética Transcraneal (EMT), una nueva herramienta antidepresiva

La EMT se basa en el principio de James Maxwell: la fluctuación de campos magnéticos puede inducir corrientes eléctricas en conductores cercanos, y ha sido utilizada para generar corrientes eléctricas en el cerebro y estimular neuronas en determinada área cerebral, aunque el mecanismo estimulante aún es desconocido.

Desde la pasada década la EMT de la corteza prefrontal dorsolateral ha sido establecida como una alternativa menos invasiva que la terapia electroconvulsiva [118] para el tratamiento de síntomas depresivos, además, se considera una alternativa para la psicoterapia o el uso de antidepresivos ya que a los pacientes no les desagrada y parece no producir efectos colaterales.

Se ha demostrado que el uso de EMT en ratones [12] y ratas [66] evaluados en NF disminuye el tiempo de inmovilidad. Esto puede ser debido a que el tratamiento agudo con TMS en roedores reduce los niveles de dopamina en corteza prefrontal y los incrementa en el estriado [13, 77] e hipocampo [13, 77]. La estimulación eléctrica de la corteza prefrontal aumenta la liberación de dopamina en estriado dorsal y NAc [118]. Un estudio con HPLC reportó incremento de 5HT en tejido hipocampal [101], pero este efecto no se observó por microdiálisis [102].

En otros desórdenes actúa como ansiolítico, por ejemplo en estrés post-traumático [58] y esquizofrenia [71].

JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La base neurobiológica de la asociación “nicotina – depresión” no es clara, además, es poco el apoyo experimental que demuestre que la auto-administración de nicotina es incrementada por el efecto de la depresión y no solo por la tendencia a ingerir nicotina. Además es importante conocer si la tendencia a la depresión o al consumo de nicotina depende de la susceptibilidad genética. Y observar si la vía de administración de nicotina tiene efectos similares en sujetos deprimidos, en este caso comparando el efecto del consumo voluntario vs. inyección intraperitoneal.

Habiendo mencionado los antecedentes de porqué se propone a la nicotina como un posible antidepresivo, se consideró de importancia comparar estos efectos con los provocados por una herramienta antidepresiva, la estimulación magnética transcraneal.

Teniendo en cuenta estos puntos, se plantea lo siguiente: comparar la susceptibilidad al desarrollo de síntomas depresivos después de la bulbectomía olfatoria, un modelo animal de depresión, en dos cepas de ratas, Wistar y Long Evans empleando la prueba conductual de nado forzado para evaluar los síntomas depresivos además de la prueba de campo abierto para estudiar alteraciones en la actividad locomotora de los animales. También analizar los efectos del consumo voluntario de nicotina en sujetos bulbectomizados y comparar la eficacia del consumo oral y la inyección intraperitoneal de nicotina en ratas bulbectomizadas. Finalmente estudiar los efectos de la nicotina inyectada y la EMT.

HIPÓTESIS

1.-Ratas deprimidas por el modelo de bulbectomía olfatoria consumirán mayor dosis de nicotina que ratas sham.

2.- Si la nicotina muestra efectos antidepresivos, la vía de administración de esta sustancia no interferirá en sus efectos.

3.- Si existen susceptibilidades genéticas a la depresión, la comparación entre dos cepas de ratas, Wistar y Long Evans, mostrarán diferencias conductuales y de ingesta de nicotina.

OBJETIVO GENERAL

1.- Estudiar los posibles efectos antidepresivos de la nicotina

OBJETIVOS PARTICULARES

1.1.- Determinar el efecto antidepresivo de la nicotina en ratas deprimidas por bulbectomía olfatoria.

1.2.- Estudiar la auto-administración oral de nicotina en ratas deprimidas por bulbectomía olfatoria.

1.3.- Comparar susceptibilidades a la depresión y al consumo de nicotina entre dos cepas de ratas, Wistar y Long Evans.

1.4.- Comparar el efecto antidepresivo de la nicotina y de la estimulación magnética transcraneal.

1.5.- Comparar el efecto de dos vías de administración de nicotina, oral e inyectada en animales bulbectomizados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales:

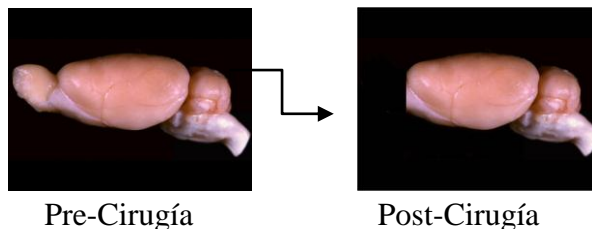
Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar y Long Evans colocadas en jaulas individuales y mantenidas bajo condiciones controladas en el vivario: temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), ciclo de 12 H luz / 12 H oscuridad y libre acceso al consumo de alimento. Todos los animales fueron aclimatados a las condiciones del vivario y adaptados a obtener agua de 2 bebederos una semana antes de iniciar cualquier experimento. Para evitar el condicionamiento al lugar o espacio, ambos bebederos fueron intercambiados de lugar diariamente durante todo el proceso experimental. La descripción detallada de los animales e ingesta líquida se menciona posteriormente en cada experimento.

Modelo para inducir depresión “Bulbectomía Olfatoria Bilateral”:

Las ratas fueron inducidas a anestesia con halotano al 3% y mantenidas al 1%.

Posteriormente el animal fue colocado en el aparato estereotáxico y 5.2 mm anterior a Bregma y 2.0 mm lateral a línea media se oradó el hueso frontal, al tener a simple vista los bulbos olfatorios se aspiraron con una bomba de succión teniendo cuidado de no dañar la corteza frontal. Después de la cirugía se colocó esponja hemostática (Gelfoam, Pharmacia & Upjohn Company, Michigan, USA) en el espacio que ocupaban los bulbos para evitar o controlar hemorragias, posteriormente el orificio se selló con una capa muy delgada de acrílico dental, se procedió a suturar piel y se limpió el área con iodo. Para prevenir infecciones los animales fueron inyectados s.c. con 1,200,000 UI/kg de penicilina G benzatínica (Novartis, Mexico D.F., Mexico). En el caso de la bulbectomía simulada (sham) se siguen todos los pasos que en la bulbectomía total con excepción de la remoción de los bulbos olfatorios. Todos los animales fueron sacrificados al final del estudio y solo ratas con remoción completa de los bulbos y sin daño a corteza prefrontal fueron incluidos en el análisis de datos.

Para considerar que el animal es adecuado para el estudio, se debe calcular la extensión de la lesión post-mortem, esto se puede hacer visualmente, y si los animales muestran remoción incompleta o lesión en otras áreas el animal deberá ser excluido del subsecuente análisis.

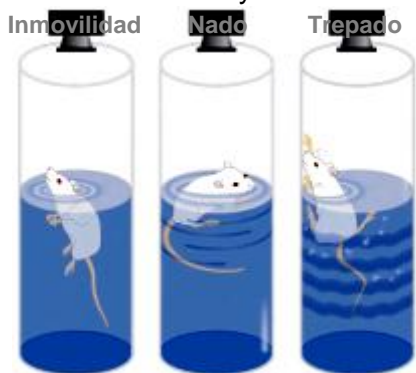


Técnica para evaluar actividad locomotora “Campo abierto”:

Para diferenciar los efectos de la nicotina del efecto locomotor general, cada animal fue colocado en el centro de una base circular hecha de madera de 80 cm de diámetro dividida en cuadrantes de 15 cm cada uno y rodeada de una pared. El número de cuadrantes cruzados por el animal con sus cuatro patas fueron contabilizados durante un periodo de 3 minutos. Las observaciones fueron realizadas entre las 10 am y 1 pm.

Modelo para evaluar depresión “Nado Forzado”:

Consiste en colocar a la rata en un cilindro transparente de 40 cm de alto y 18 cm de diámetro conteniendo 30 cm de agua a una temperatura de 25° C. 15 minutos después la rata es secada y colocada de nuevo en su caja. Al día siguiente se vuelve a colocar a la



misma rata en el cilindro con agua limpia pero solo por 5 min y se contabiliza el tiempo de los movimientos orientados al escape (nado, trepado) poniendo énfasis en el tiempo de inmovilidad (flotación pasiva) que representa la desesperanza o estado depresivo del animal.

Las observaciones fueron realizadas entre las 10 am y 1 pm.

Estimulación Magnética Transcraneal

Los animales fueron colocados individualmente en cajas de retención cilíndricas de plástico para evitar movimiento de las ratas mientras recibían estimulación magnética en su cabeza. Pequeñas cajas de plástico (10.5cm×10.5cm×3.5 cm) con el interior conteniendo un espiral de 1000 vueltas de alambre de cobre recubierto (7 cm de diámetro) y un par de espirales Helmholtz (seleccionados para minimizar los efectos del campo eléctrico) para generar los campos (Dhan 1000(tm); Magnetoterapia S.A. de C.V., Mexico D.F., Mexico), fueron colocadas sobre la caja de retención. La distancia entre cada espiral y el punto medio de la cabeza fue aproximadamente 6 cm. La estimulación consistió de un campo magnético oscilatorio en la forma de una onda sinusoidal con una frecuencia de 60 Hz y amplitud de 0.7 mT aplicadas por 2 H en la mañana y 2 H en la tarde durante 14 días.

1: Efecto de la auto-administración de nicotina en ratas Wistar y Long Evans bulbectomizadas y evaluadas en nado forzado:

Fueron utilizadas ratas macho Wistar y Long Evans de 60 días de edad (200–250 g). El consumo de líquidos en ambos bebederos fue *ad libitum* y medido cada 24 hrs a las 11 am. 16-28 animales de cada cepa fueron asignados al azar en dos grupos experimentales:

- *Grupo Nicotina*: se llenó un bebedero con 30 mg de nicotina / L de agua desionizada y el otro con solo agua desionizada.
- *Grupo Agua*: ambos bebederos fueron llenados con solo agua desionizada.

Después de 15 días de la división en grupos, las ratas fueron sometidas a cirugía y se subdividió cada grupo en sham y bulbectomizadas (n=8-18). Durante el periodo de recuperación post-cirugía (15 días) los animales de todos los grupos recibieron solo agua desionizada en sus bebederos. Durante los siguientes 15 días post-recuperación, los animales de cada grupo tuvieron acceso a un bebedero con nicotina y a otro con solo agua desionizada. Al finalizar cada periodo de 15 días las ratas fueron evaluadas en campo abierto seguido por nado forzado.

2: Efecto de la inyección i.p de nicotina o EMT en nado forzado en ratas bulbectomizadas.

Se utilizaron 20 ratas macho Wistar de 60 días de edad (200–250 g) con consumo de alimento y agua *ad libitum* divididas en los siguientes grupos:

- *BO + Vehículo* (agua desionizada).
- *BO + Nicotina* (1.5 mg/kg de peso corporal i.p).
- *BO + Mock EMT* (se colocaron a los animales en la caja de EMT pero no se les realizó ninguna estimulación).
- *BO + EMT*.

15 días post-cirugía los tratamientos empezaron y se mantuvieron por 14 días, al finalizar el tratamiento asignado a cada grupo los animales fueron sujetos a campo abierto seguido de nado forzado.

Análisis estadístico:

Diferencias de tiempo de inmovilidad entre animales sham y bulbectomizados fueron comparados usando ANOVA de dos vías seguido de la prueba poshoc Holm Sidak. El nivel de significancia considerado fue de $P < 0.05$.

Diferencias de tiempo de inmovilidad y consumo de fluido (agua vs. nicotina) entre las diferentes cepas fueron comparados usando ANOVA de tres vías. La comparación múltiple pareada entre los diferentes grupos se realizó usando la prueba poshoc Holm Sidak. El nivel de significancia considerado fue de $P < 0.05$.

Las diferencias entre tratamientos (Vehículo, Mock EMT, Nicotina, EMT) en el experimento de EMT, fueron analizadas por ANOVA de una vía seguida por la prueba poshoc de Bonferroni para determinar la fuente de significancia. El nivel de significancia estadística fue de 0.05.

Los datos son presentados como media \pm S.E.M. StatView 5 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) fue el programa utilizado para realizar los análisis estadísticos.

RESULTADOS:

Los resultados del efecto de la auto-administración de nicotina en ratas Wistar y Long Evans bulbectomizadas y evaluadas en nado forzado y del efecto de la inyección i.p de nicotina o EMT en nado forzado en ratas bulbectomizadas son mostrados en el artículo: Antidepressant-like effects of nicotine and transcranial magnetic stimulation in the olfactory bulbectomy rat model of depression. Patricia Vieyra-Reyes, Yann S. Mineur, Marina R. Picciotto, Isaac Túnez, Román Vidaltamayo, René Drucker-Colín. Brain Research Bulletin 77 (2008) 13–18.

Este artículo se anexa a continuación

DISCUSIÓN

Existe una alta comorbilidad entre depresión y dependencia de drogas en humanos [102]. Se considera que alrededor del 48% de la población padece al menos un desorden psiquiátrico en su vida y dentro de esta población el 60% tiene múltiples desordenes afectivos que incluyen dependencia a sustancias, entre ellas nicotina [102].

El efecto hedónico de la nicotina ha sido ampliamente demostrado [141]. Si la nicotina produce mejora del humor entonces se puede esperar que el cese de la administración crónica de nicotina lleve a un estado depresivo o que sujetos deprimidos se auto administran nicotina para aliviar su malestar.

Uno de los motivos de este estudio fue comparar el estado depresivo inducido por bulbectomía en dos diferentes cepas de ratas y evaluar el efecto de la nicotina en este modelo.

La existencia de variables fisiológicas capaces de responder a una situación de estrés o depresiva son de gran importancia, no solo para cuantificarlas en el animal sino para comparar diferencias conductuales entre animales y entre cepas. Además estas variables pueden depender del individuo o de la manipulación experimental.

Ha sido reportado que varias cepas de ratas (Fischer 344, SHR y Wistar-Kyoto) difieren en su comportamiento en nado forzado [8]. Sin embargo, es mínima la información respecto a ratas Wistar y Long Evans. Armario, 1995 [8], al comparar en nado forzado a 5 cepas de ratas (Brown-Norway, Fischer 344, Lewis, SHR y Wistar-Kyoto) mostró que ratas Brown-Norway y Wistar-Kyoto tienen mayores niveles de inmovilidad en comparación con las otras tres cepas y las ratas Lewis son las más activas y propone que por adoptar un comportamiento pasivo en el nado forzado, las ratas Brown-Norway y Wistar-Kyoto se pueden considerar un modelo genético de depresión.

Nuestros resultados mostraron diferencias innatas en cuanto a la susceptibilidad a desarrollar síntomas similares a los depresivos después de la bulbectomía olfatoria entre ratas Wistar y Long Evans. Ratas Wistar inician el desarrollo de síntomas depresivos pocas semanas después de la bulbectomía olfatoria, esto se verifica por el incremento del tiempo de inmovilidad en nado forzado, ratas Long Evans no mostraron un incremento significativo en el tiempo de inmovilidad aún 4 semanas después de la bulbectomía. Este último resultado puede ser debido a una diferencia intrínseca en susceptibilidad a la depresión o porque estas ratas mostraron mayor variabilidad interindividual en el comportamiento de nado.

Aunque, pre-cirugía y sin recibir ningún tratamiento ratas Long Evans tienden a permanecer más tiempo inmóviles en nado forzado que ratas Wistar, no podemos sugerir que las ratas Long Evans pudiesen ser un modelo para estudiar depresión ya que la variabilidad conductual entre individuos enmascara las diferencias post-cirugía (bulbectomía o sham).

Es poco conocido el efecto antidepresivo de la auto-administración de nicotina en animales experimentales, en la mayoría de los estudios han usado inyecciones vía intraperitoneal, subcutánea e intravenosa como vías de administración., sin embargo los animales pocas veces son libres de elegir el tratamiento que ellos requieren o que les provoca menos malestar o efectos adversos, por tal razón, nuestros sujetos experimentales tuvieron libertad de auto-administrarse nicotina según lo requirieran.

Ha sido demostrado que ratones que consumen crónicamente (desde la adolescencia hasta la edad adulta) nicotina de manera oral y restringida a 2 H/día en el método de libre acceso a 2 bebederos vs. animales no tratados, muestran una preferencia significativa por nicotina, sin embargo al evaluar comportamientos de actividad locomotora, ansiedad y depresión se observaron pocos cambios conductuales, lo que indica que la nicotina en ratones normales no altera estos comportamientos [164], sin embargo, en ratas deprimidas por bulbectomía olfatoria los efectos son notables ya que en ambas cepas de ratas el consumo auto-regulado de nicotina disminuye el tiempo de inmovilidad en NF después de cualquier tipo de cirugía. El efecto de la nicotina parecido al antidepresivo ha sido previamente reportado en ratas [162] y en otros modelos de depresión usando roedores, como el estrés crónico y la desesperanza aprendida [48, 139].

De forma interesante, el consumo promedio de nicotina (≈ 1.2 mg/kg/día) se aproxima o semeja la dosis que ha mostrado tener efectos terapéuticos en la depresión [103, 139] y que es comparable con la cantidad ingerida por un fumador de 70 kg que consume 3 paquetes de cigarros por día [95].

También se observaron diferencias en el consumo de nicotina entre cepas, ratas Wistar mostraron mayor consumo que Long Evans. Estas diferencias pueden ser relacionadas a variabilidad fenotípica entre estas dos cepas al igual que las diferencias en nado forzado. La naturaleza de esta variabilidad, ya sea la relacionada a diferencias intrínsecas al estrés o a diferencias en la actividad locomotora, necesitan ser mas estudiadas.

Este estudio está de acuerdo con estudios previos que han mostrado diferencias en tiempo de inmovilidad en nado forzado entre cepas [8]. De forma interesante, no fue encontrada preferencia por nicotina comparada con agua en ninguna de las dos cepas en condiciones basales, esto puede ser debido a la pérdida de preferencia que refleja el limitado consumo de agua, ya que las ratas primero beben nicotina hasta obtener un umbral fisiológico pero necesitan beber agua para hidratarse. Estudios previos han mostrado que ambos, animales y humanos pueden titular la dosis consumida de nicotina [54, 138]; debido a esto, probablemente los animales consumieron nicotina hasta cierto nivel donde presentaran o sintieran un efecto y cesaban el consumo una vez que este nivel se alcanzaba. Es importante hacer notar que las ratas no prefirieron la nicotina que el agua al principio, sin embargo los animales mostraron consumo significativo de la droga. Sobre todo, el alto consumo de nicotina en ratas Wistar observada durante todas las condiciones, puede sugerir una alta preferencia intrínseca de la cepa.

El consumo de nicotina disminuyó en ambas cepas después de los procedimientos quirúrgicos ya fuese sham o BO. Este decremento puede ser relacionado a la adaptación sensorial al sabor amargo, ya que los animales fueron expuestos a la nicotina antes de las cirugías y el consumo de nicotina fue reevaluado 4 semanas después de la cirugía; por ejemplo, las ratas tienden a rechazar el sabor amargo de la nicotina una vez que ellas están familiarizadas con éste. Por otro lado, el efecto de la titulación de la nicotina puede también imitar el limitado consumo, para sostener esta última idea, ratas Long Evans sham mostraron la misma reducción de tiempo de inmovilidad después del consumo de nicotina, aunque el consumo disminuyó el 50% después de la cirugía.

Animales bulbectomizados, independientemente de la cepa, mostraron mayor consumo de nicotina que animales sham. Esto puede ser relacionado con la adaptación sensorial en la percepción del sabor por la bulbectomía (por ejemplo, la aversión al sabor amargo puede ser alterado)[148] o debido a un mecanismo de automedicación porque no hubo diferencias significativas entre el tiempo de inmovilidad de animales sham y bulbectomizados expuestos a nicotina. Estos resultados fortalecen el modelo donde los animales ingieren nicotina hasta cierto nivel o grado donde ella asume o realiza su máximo efecto (disminuyendo el tiempo de inmovilidad en nado forzado).

Después de mostrar que la nicotina tiene un efecto antidepresivo cuando es voluntariamente ingerida, se decidió evaluar los efectos de la inyección diaria (por 15 días) intraperitoneal de nicotina en ratas Wistar bulbectomizadas para comparar estos dos

métodos de administración de nicotina. Además se compararon los efectos antidepresivos de la nicotina contra los efectos de EMT, porque es bien sabido que el modelo de bulbectomía olfatoria responde bien a otras terapias antidepresivas [101] y EMT ha surgido como una alternativa a la terapia electroconvulsiva para el tratamiento de la depresión humana [86], sobretodo, la repetida EMT reduce el tiempo de inmovilidad en nado forzado, lo cual fortalece la información de los efectos antidepresivos de esta terapia [134].

La nicotina inyectada fue tan efectiva como la nicotina consumida oralmente, decrementando el tiempo de inmovilidad en nado forzado de RB Wistar. Los resultados también muestran que la estimulación con EMT (2H/día X 2H/día por 15 días), decremента el tiempo de inmovilidad pero el efecto de la nicotina fue mayor, sugiriendo un mayor efecto antidepresivo de la nicotina que de EMT. Además, la nicotina inyectada y la EMT atenuaron la hiperactividad asociada con la bulbectomía como lo efectúan otras sustancias antidepresivas [78].

CONCLUSIONES

1. El nado forzado es una buena herramienta para estudiar el comportamiento depresivo de sujetos bulbectomizados.
2. Pre-cirugía, ratas Long Evans presentan mayor tiempo de inmovilidad en nado forzado que ratas Wistar, lo que sugiere cierta susceptibilidad al desarrollo de síntomas depresivos en Long Evans.
3. Post-bulbectomía, ambas cepas de ratas muestran comportamiento depresivo, sin embargo ratas Long Evans manifiestan mayor variabilidad conductual interindividual, principalmente en el comportamiento de nado. En ratas Wistar el comportamiento es más homogéneo, por tal motivo fue clara la evidencia de conducta depresiva.
4. Ratas Wistar consumen mayor cantidad de nicotina que Long Evans, lo que demuestra diferencias en la susceptibilidad o preferencia a la nicotina entre cepas.
5. El consumo de nicotina tiene efectos antidepresivos, independientemente del tipo de cirugía realizada (sham o bulbectomía).
6. Ratas bulbectomizadas se auto-administran mayor cantidad de nicotina que ratas sham.
7. Sujetos bulbectomizados se auto-administran una cantidad similar de nicotina (1.24 ± 0.05 mg/kg/día) independientemente del tipo de cepa para contrarrestar sus síntomas depresivos. Lo que indica una posible dosis terapéutica que es comparable a la cantidad ingerida por un fumador de 70 kg que consume 3 paquetes de cigarrillos por día.
8. Independientemente de la vía de administración, ya fuese oral o inyectada, la nicotina presentó efectos antidepresivos.
9. Ambos, nicotina o EMT mostraron efectos antidepresivos en ratas bulbectomizadas sin embargo, el efecto de la EMT fue más modesto que el de la nicotina.

PERSPECTIVAS

Estudiar la auto-administración de nicotina por el método de 2 bebederos en ratas adolescentes ya que esta etapa es considerada como el parte aguas para el desarrollo de auto-administración y posiblemente influya en el proceso depresivo.

Realizar estudios respecto a susceptibilidad al consumo de nicotina en ratones ya que la información es escasa y mucho más los estudios comparativos entre cepas (Anexo I).

Estudiar el sistema serotoninérgico en ratas Long Evans ya que la variabilidad en el comportamiento de nado está relacionada con este sistema.

Estudiar a fondo si existen diferencias a la susceptibilidad al estrés entre ratas Wistar y Long Evans, pudiese ser comparando los niveles de ACTH y corticosterona.

CAPITULO II

ESTUDIO DEL EFECTO ADICTIVO DE LA NICOTINA

INTRODUCCIÓN

Existe una alta comorbilidad entre depresión y dependencia de drogas en humanos [20]. Se considera que alrededor del 48% de la población padece al menos un desorden psiquiátrico en su vida y dentro de esta población el 60% tiene múltiples desordenes afectivos que incluyen dependencia de drogas.

La adicción es un complejo fenómeno con importantes causas y consecuencias sociales y psicológicas. Incluye un proceso biológico que consta de los efectos de la repetida exposición a drogas, en este caso nicotina, en un sustrato (cerebro) sobre el tiempo; las alteraciones que la sustancia produce en neuronas individuales influye en su funcionamiento y esto repercute en el funcionamiento del circuito neural en el que dicha neurona opera. El proceso patogénico que lleva a la adicción no ha sido esclarecido.

El inicio del comportamiento adictivo implica alteraciones en los procesos de formación de hábitos y su relación con proyecciones nigro-estriatales [13]. Las propiedades gratificantes de las drogas de abuso son atribuidas a su influencia en proyecciones dopaminérgicas mesolímbicas [30].

Se considera que la nicotina es capaz de actuar sobre neuronas meso-límbicas y nigro-estriatales que proyectan al estriado, amígdala y corteza prefrontal [27], así modulando ansiedad, inhibición o desinhibición conductual y gratificación.

Las propiedades adictivas de la nicotina son mediadas por la activación de nAChR [26] expresados en VTA, lo cual induce incremento en la liberación de dopamina [28].

Aunque también se ha propuesto que la nicotina puede no actuar directamente sobre neuronas dopamina sino a través de aferencias glutamatérgicas en estas neuronas [8]. Específicamente, aferencias glutamatérgicas a estriado pueden afectar la plasticidad neuronal y la formación de hábitos [13], lo cual es una clave importante en el inicio de la adicción [25].

Si el mecanismo molecular aún no es claro, el decremento patológico de aferentes glutamatérgicas AMPA en estriado puede ser considerado un importante hallazgo respecto a los cambios plásticos que llevan a la formación de hábitos adictivos.

¿Cuándo inicia la adicción a nicotina?

Muchos estudios han mostrado que el uso de tabaco inicia durante la adolescencia y quienes inician el consumo en esta etapa lo mantienen por mayor tiempo a lo largo de su vida que los que inician en la edad adulta.

La adolescencia es asociada con incremento de irresponsabilidad, toma de riesgos, ansiedad y bajos niveles de evasión a la destrucción [37]. La edad al primer contacto con drogas psicoactivas es muy importante ya que aumenta la probabilidad de dar un cambio de uso a abuso y desarrollar adicción a edad temprana [4].

Un tercio de la población adulta a nivel mundial son fumadores y la mayoría inició este hábito en la adolescencia [24], además, los adolescentes muestran signos de dependencia a nicotina después de consumir pocos cigarros [9].

La periadolescencia es definida en roedores como el periodo que precede (7-10 días) a la pubertad (40 días de edad aprox) y pocos días después [32]. Durante este periodo las áreas del cerebro muestran proliferación y maduración de terminales axónicas y sinapsis [34]. Roedores adolescentes muestran elevados niveles de novedad, impulsividad, comportamientos de riesgo y reducida respuesta al estrés [1]. El consumo oral de alcohol [12] y nicotina [2] es elevado. Estudios recientes indican diferencias importantes en la respuesta a nicotina entre ratas adultas y adolescentes [11] además de mayor vulnerabilidad al desarrollo de adicción a nicotina en la pubertad [1].

Modelos para inducir adicción a la nicotina

Los efectos adictivos de la nicotina han sido difíciles de demostrar en sujetos experimentales humanos y animales por lo que existe cierta controversia en la literatura respecto al desarrollo de modelos animales, sin embargo hay cierta evidencia de la auto-administración en diferentes especies animales.

En simios se realizaron infusiones de nicotina bajo varios programas de reforzamiento incluyendo FR (tasa fija) y FI (intervalo fijo) [14]. Usando programas de FR perros beagle se auto-administran 0.003-0.3 mg/kg de nicotina y la tasa de respuesta fue similar a la mantenida para cocaína [29], aunque bajo un programa de tasa progresiva la respuesta de los perros fue mucho mayor para cocaína que para nicotina [29].

Experimentos usando roedores han mostrado efectos controversiales. El programa más usado en ratas es el FR, en el cual cierto número de respuestas son requeridas para cada infusión intravenosa de nicotina. Los primeros estudios utilizaron un programa de reforzamiento continuo donde cada respuesta producía una inyección (FR-1) aunque la respuesta no variaba entre la inyección de nicotina o solución salina [7]. Además el antagonista nicotínico mecamilamina no disminuía la auto-administración de nicotina. Cox *et al*, 1984 [7] encontró que ratas incrementaban significativamente la respuesta no solo de la palanca que liberaba nicotina sino también de la palanca control inactiva cuando la nicotina estaba disponible.

Usando el procedimiento de 2 palancas (Fig 1 B) e incrementando los requerimientos de respuesta para la inyección intravenosa de nicotina (e.j. FR-5) se han observado mayores tasas de respuesta en la palanca activa comparada con la inactiva sobre un rango de dosis de nicotina [5]. Aunque un gran número de estudios de auto-administración han evaluado a la nicotina como reforzador, los factores que regulan la adquisición de auto-administración no han sido evaluados.

Ratas con restricción de alimento muestran mayores tasas de auto-administración que ratas saciadas control, por tal motivo, Corrigan *et al*, 1989 [5] restringieron el alimento a 1 H/día, durante esta hora los animales fueron condicionados a presionar una palanca para obtener pellets de alimento y después de cada presión de la palanca era liberada una dosis de nicotina (Fig 1 B). Esto es evidencia de los procesos adaptativos en el comportamiento de consumo de nicotina [33] y la influencia del estrés.

Los efectos motivacionales de la nicotina, particularmente los estímulos ambientales condicionados muestran cambios significativos después de periodos de exposición a la nicotina. La administración repetida de nicotina durante 4 días antes del condicionamiento puede atenuar la aversión al sabor [19]. En contraste, la previa exposición a nicotina puede producir un moderado grado de sensibilidad para mantener la preferencia al lugar condicionado [31], que es uno de los modelos mas usados y consiste en colocar al animal en una caja dividida en 2 por una puerta intermedia, cada compartimento tiene diferentes características como se muestra en la (Fig 1 A) y se condiciona a que en uno de los compartimentos el animal reciba nicotina y en el otro vehículo.

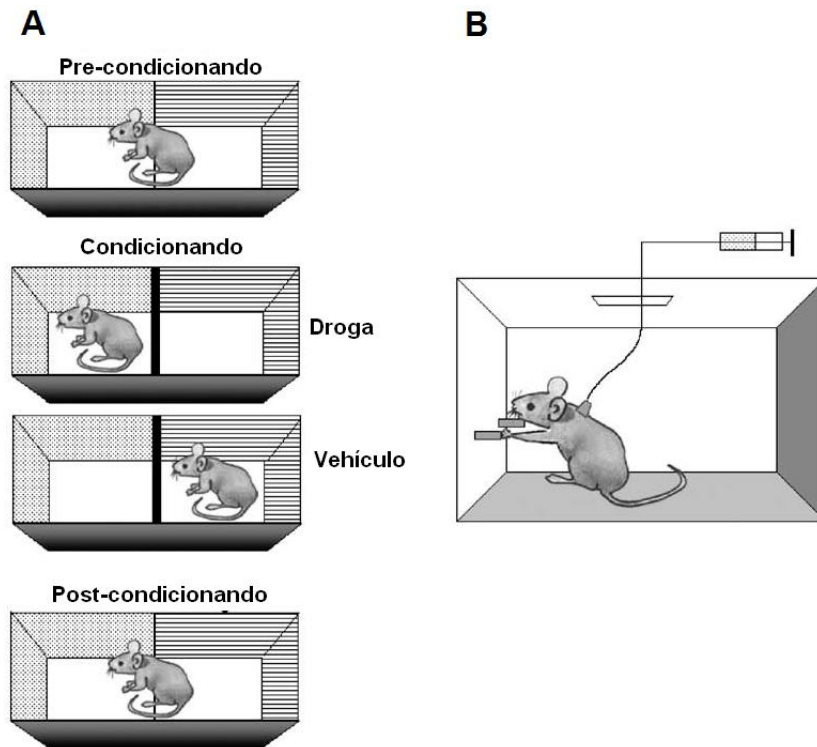


Figura 3.- Modelos animales de adicción a nicotina. A: Preferencia al lugar condicionado. B: Método de dos palancas.

Abstinencia

Se ha estimado que el 80% de fumadores regulares desean dejar de fumar y la gran mayoría de ellos lo han intentado pero han fallado [17], este síndrome es considerado la mayor causa de recaída observada durante los primeros días del cese de fumar. Se considera que solo el 2.5 % de fumadores lo ha logrado exitosamente [17].

El síndrome de abstinencia durante el cese de fumar [17], o por la reducción en el contenido de nicotina del cigarro [36]; es generalmente aversivo y el fumar sirve como un reforzador negativo para aliviar este estado [35].

La mayor intensidad de los signos de abstinencia aparece 24 H después del cese de consumo de nicotina. Los signos que se presentan son: irritabilidad, ansiedad, dificultad para concentrarse, cansancio e impaciencia. Hambre excesiva, disturbios de sueño, letargia y anhelo por nicotina también son observados.

En ratas este síndrome puede ser precipitado por la inyección de bloqueadores de receptores nicotínicos como el antagonista competitivo dihydro- β -erythroidina (DH β E) [10]; o por inactivación con antagonistas no competitivos mecamlamina [21], hexametonium [23] o clorisondamina [18]. La administración de antagonistas nicotínicos, decrementa el flujo de DA en el nucleus accumbens, lo cual es interpretado como un correlato neuronal de anhedonia o disforia que experimentan los fumadores cuando tratan de dejar este hábito. Epping- Jordan *et al*, 1998 [10] han reportado que la abstinencia de nicotina en roedores, seguida de un periodo de constante infusión, decrementa los efectos gratificantes de la auto-estimulación intracraneal. Los resultados implican que siguiendo un periodo de constante exposición a nicotina, las neuronas dopaminérgicas de mesoaccumbens se vuelven dependientes de nicotina para mantener sus niveles normales de actividad. Además, se ha observado que el retiro de la inyección subcutánea crónica de nicotina provoca un ligero incremento en la corticosterona sérica, sugiriendo una respuesta al estrés [3], además genera ansiedad [16], ganancia de peso e incremento del consumo de alimento en ratas hembras [15]. Conductualmente, la abstinencia de inyección i.p. de nicotina altera la preferencia luz/obscuridad en ratones [6]; en ratas entrenadas para condicionamiento operante, el retiro de nicotina conlleva a patrones de respuesta operante apetitiva [5]. Sin embargo, como en muchas pruebas conductuales, es difícil determinar la existencia de un patrón emocional en ratas abstinentes de nicotina.

Signos de abstinencia en ratas

Estudios piloto sugieren que los signos de abstinencia a nicotina en la rata son similares a los observados durante la abstinencia a opiáceos. Malin, 1992 [22] en base a sus observaciones, desarrolló la forma adecuada de evaluar estos signos, entre los que se incluye: castañeteo dental, masticación, constricción abdominal, hipo, ptosis, temores (particularmente temer de carrillos), y misceláneos o menos frecuentes incluyendo eyaculación seminal, rasguños, mordidas.

Los criterios en los que se basa esta prueba son los siguientes:

- 1.- Ratas en el climax (pico) de la fase de abstinencia deben presentar mas signos que previo a la administración de nicotina baseline (control), que durante el periodo de administración de nicotina y que durante la subsecuente fase de recuperación.
- 2.- Animales a los que previamente se les administró nicotina deben presentar mas signos que animales control previamente inyectados con solución salina.
- 3.- la frecuencia de signos de abstinencia debe variar de acuerdo a la cantidad de nicotina a la que fueron expuestos.
- 4.- Los signos de abstinencia deben ser atenuados por una pequeña dosis aguda de nicotina.

JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La adicción a la nicotina es un fuerte problema de salud pública a nivel mundial, sin embargo, existen pocos modelos animales de adicción a este componente psicoactivo y ha sido muy difícil replicarlos entre laboratorios y mas aún entre especies, tal fuese el caso entre ratones y ratas. Esto ha dificultado el estudio de como se establece la adicción, como generar tratamientos contra ella, cual es la relación depresión-adicción, etc. Se sabe que los problemas adictivos inician a edades tempranas, entre la niñez y adolescencia y dependen de señales ambientales, como imitación si se convive con un fumador.

En base a estas observaciones se plantea lo siguiente; estudiar el posible desarrollo de adicción a nicotina en ratas que tienen el acceso a esta sustancia en el agua de bebida desde la adolescencia (posterior al destete) hasta inicios de la edad adulta (2 meses después aproximadamente). Al llegar a la edad adulta dar la opción de elegir entre solo agua o una dosis alta de nicotina o entre una dosis baja y una alta, posteriormente someter a un periodo de abstinencia (solo agua/3 días). Después, reintroducir nicotina con el fin de estudiar si los animales retornan al consumo habitual de nicotina.

HIPÓTESIS

El consumo crónico de nicotina durante la adolescencia favorece la auto administración de esta sustancia en la edad adulta.

Si sujetos que consumen nicotina son sometidos a un periodo de abstinencia, mostrarán signos de este síndrome y regresarán al consumo de nicotina.

OBJETIVO GENERAL

1.- Estudiar el efecto del consumo crónico de nicotina en ratas adolescentes.

OBJETIVOS PARTICULARES

1.1.- Estudiar el efecto de la auto administración crónica de nicotina en ratas adolescentes.

1.2.- Determinar posibles signos de abstinencia en ratas que se auto administran nicotina.

1.3.- Determinar si después del periodo de abstinencia los animales retornan a la auto administración de nicotina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Administración de nicotina en ratas adolescentes.

Se utilizaron 40 ratas macho Wistar recién destetados (22 días de edad o 50 – 60 g). Alimento *ad libitum* y acceso restringido a dos bebederos con nicotina 2 H/día. La dosis de nicotina se fue incrementando gradualmente con el fin de evitar aversión. A continuación se menciona/día la forma de habituación que se realizó para evitar estrés en los animales y el incremento gradual de las dosis de nicotina.

Día 1.- arribo de los animales al vivario.

Día 1 – 15.- Se colocó en cada caja 2 bebederos con agua + nicotina (15 mg/L).

Día 1-6.- Se colocaron 4 animales por caja.

Día 1–4.- Se colocó el líquido *ad libitum*.

Día 5–9 empezó la restricción a 12 H/día y a partir del **Día 10** la restricción fue a 2 H/día.

Día 7–12.- Se separaron los animales, colocando solo 2 ratas por caja.

Día 13.- Se separaron en cajas individuales.

Día 16 - 23.- Dosis de nicotina: 18 mg / lt.

Día 24 – 31.- Dosis de nicotina: 21 mg / lt.

Día 32 – 39.- Dosis de nicotina: 24 mg / lt.

Día 40 – 47.- Dosis de nicotina: 27 mg / lt.

Día 48 – 56.- Dosis de nicotina: 30 mg / lt.

Elección entre “dosis alta de nicotina vs. solo agua” o “dosis alta vs. baja de nicotina” en ratas adultas previamente expuestas a nicotina.

Las 40 ratas pretratadas con nicotina fueron divididas al azar en 2 grupos:

Grupo 1.- (N=20) se les dio a escoger entre un bebedero con dosis alta (30 mg de nicotina/L) o un bebedero con solo agua.

Grupo 2.- (N=20) se les dio a escoger entre un bebedero con dosis alta (30 mg/L) o uno con dosis baja (15 mg/L) de nicotina.

Después de un periodo de 2 semanas (**Día 57-71**) con su respectivo tratamiento, se seleccionaron los animales con consumo mayor de dosis alta de nicotina en cada

grupo. Se suministró *ad libitum* su respectivo tratamiento por 3 días (**Día 72-74**) con el fin de que los animales se auto-administraran la dosis deseada y mantener nicotina circulante por 24 hrs. Posteriormente se sometieron a un periodo de abstinencia.

Evaluación de signos de abstinencia

Cada rata fue observada en su caja y filmada por 10 minutos. La ocurrencia de los signos de abstinencia fue registrada.

La categoría de fasciculación facial incluyó tremor de carrillos, castañeteo dental y masticación. Misceláneos; intentos de escape, rasguños, mordidas y bostezos.

El **Día 75** a las 9 am se realizó la observación/10 min de los signos presentes, inmediatamente después se cambiaron ambos bebederos por bebederos con solo agua y se mantuvieron los siguientes 3 días (**Día 75-77**) con el fin de someter a abstinencia a los animales. El **Día 78** a las 9 am se realizó la observación correspondiente/10 min y ese mismo día, después de evaluar signos presentes se reintrodujo el tratamiento designado a cada grupo para estudiar si los animales regresaban a su consumo habitual pre-abstinencia., 24 H después (**Día 79**) a las 9 am se volvieron a evaluar los signos presentes. A partir del **Día 79**, se restringió el consumo de líquidos a 2 H/día como se había realizado normalmente y se mantuvo el tratamiento designado por grupo hasta el **Día 90**, posteriormente los animales fueron sacrificados.

Análisis estadístico:

Las diferencias en cuanto a consumo de nicotina y signos de abstinencia fueron analizadas por ANOVA de dos vías seguida por la prueba poshoc de Bonferroni para determinar la fuente de significancia. El nivel de significancia estadística fue de 0.05.

Los datos son presentados como media \pm S.E.M. StatView 5 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) fue el programa utilizado para realizar los análisis estadísticos.

RESULTADOS

Efecto del consumo crónico de nicotina durante la adolescencia:

Desde la adolescencia hasta la edad adulta, ratas Wistar consumieron crónicamente nicotina en el agua de bebida, esto no ocasionó que los animales alteraran su ingesta normal de agua por día (25-30 ml/día). Al llegar a inicios de la edad adulta y tener oportunidad de elegir, el 70 % de los animales de ambos grupos consumieron significativamente mayor cantidad de dosis alta de nicotina vs. agua (15.58 ± 0.78 ml vs. 10.30 ± 0.67 ml $P < 0.0001$) o vs. dosis baja (15.39 ± 0.69 ml vs. 11.52 ± 0.66 ml $P = 0.015$). Considerando el consumo en mg, el primer grupo consumió 1.36 ± 0.08 mg/kg/día de nicotina y el segundo grupo 1.37 ± 0.06 mg/kg/día de dosis alta vs. 0.50 ± 0.02 mg/kg/día de dosis baja $P < 0.0001$. Si tomamos en cuenta la cantidad de nicotina consumida/animal dependiendo del tratamiento por grupo, el grupo 1 consumió menor cantidad de nicotina que el grupo 2 (1.36 ± 0.08 vs. 1.87 ± 0.05 $P = 0.03$) lógicamente porque en el grupo 2, ambos bebederos contenían nicotina y en el grupo 1 tuvieron la opción de consumir agua o nicotina. Posteriormente, el 70 % de los animales seleccionados anteriormente por consumo significativamente mayor de dosis alta de nicotina, se sometieron a un periodo de abstinencia (solo agua/3 días), y durante estos días se observó que el consumo total de líquidos, no fue afectado en grupo 1 (pre abstinencia 25.88 ± 0.54 ml/día vs. abstinencia 26.05 ± 0.44 ml/día $P = 0.09$) y grupo 2 (pre abstinencia 26.91 ± 0.62 ml/día vs. abstinencia 26.18 ± 0.57 ml/día $P = 0.11$). Después del periodo de abstinencia, al reintroducir en el grupo 1 dosis alta vs. agua, los sujetos mantuvieron el consumo elevado de dosis alta de nicotina (16.88 ± 1.22 ml vs. 11.93 ± 1.25 ml de agua $P = 0.03$) 1.18 ± 0.08 mg/kg/día. En el grupo 2, no se obtuvo diferencia estadísticamente significativa entre el consumo de dosis alta vs. baja (15.57 ± 1.46 ml vs. 12.47 ± 1.53 $P = 0.28$) debido a la pérdida de homogeneidad en el consumo de ambas dosis, sin embargo, al estudiar el consumo en mg la diferencia estaba presente y era obviamente significativa (1.15 mg/kg/día ± 0.10 vs. 0.46 mg/kg/día ± 0.05 $P < 0.0001$). El consumo total de nicotina entre el grupo 1 y grupo 2 fue diferente estadísticamente (1.18 ± 0.08 mg/kg/día vs. 1.61 ± 0.08 $P = 0.03$).

En la tabla 5 se resume el comportamiento de la ingesta líquida pre y post-abstinencia.

Tabla 5.- Consumo de nicotina pre y post abstinencia				
	Grupo 1 "Dosis alta vs. agua"		Grupo 2 "Dosis alta vs. baja"	
	Dosis alta (30 mg/L)	Agua	Dosis alta (30 mg/L)	Dosis baja (15 mg/L)
Pre-abstinencia				
Consumo líquido total (ml/día)	25.88 ± 0.54		26.91 ± 0.62	
ml/día/rata	15.58 ± 0.78 *	10.30 ± 0.67	15.39 ± 0.69 **	11.52 ± 0.66
mg/kg/día/rata	1.36 ± 0.08		1.37 ± 0.06 **	0.50 ± 0.02
Total mg/kg/día/rata	1.36 ± 0.08 ***		1.87 ± 0.05	
Post-abstinencia				
Consumo líquido total (ml/día)	28.88 ± 0.75		28.04 ± 0.80	
ml/día/rata	16.88 ± 1.22 *	11.93 ± 1.25	15.57 ± 1.46	12.47 ± 1.53
mg/kg/día/rata	1.18 ± 0.08		1.15 ± 0.10 **	0.46 ± 0.05
Total mg/kg/día/rata	1.18 ± 0.08 ***		1.61 ± 0.08	

* P<0.01 vs. Agua

** P=0.01 vs. Dosis baja

***P=0.01 vs. Grupo 2

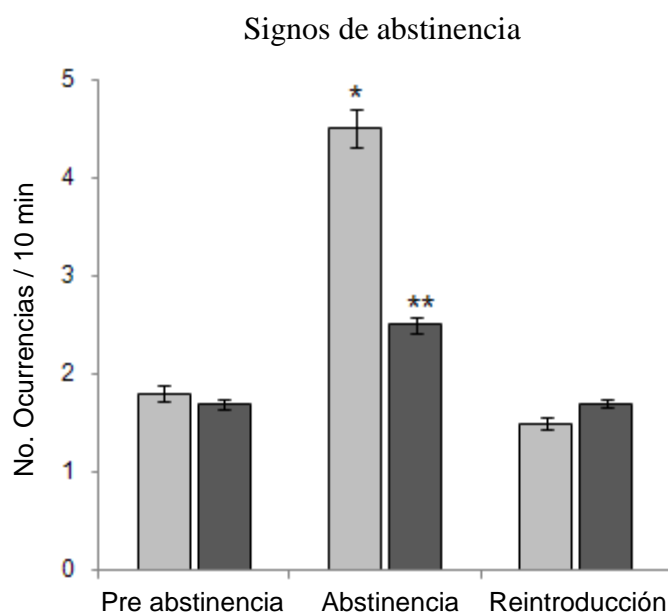
Evaluación de signos de abstinencia en ratas que se auto administran nicotina:

Al llegar a la edad adulta y posterior a la selección de animales con preferencia por nicotina (que consuman una cantidad significativamente mayor en ml de dosis alta que de baja o agua, dependiendo del grupo y tratamiento designado), las ratas fueron sometidas a abstinencia (solo agua/3 días) y posteriormente se reintrodujo el tratamiento por grupo.

Sujetos de ambos grupos presentaron comportamientos similares, ya fuese pre, post abstinencia o reintroducción.

Pre abstinencia, no hubo conductas diferentes entre ambos grupos, el comportamiento fue muy homogéneo (Fasciculación facial 1.8 ocurrencias/10 min y misceláneos 1.7 ocurrencias/10 min). Post abstinencia la ocurrencia de signos incrementó, sin embargo el comportamiento continuó casi idéntico entre grupos (Fasciculación facial 4.6 ocurrencias/10 min y misceláneos 2.5 ocurrencias/10 min). Al reintroducir la nicotina en el agua de bebida, según el tratamiento/grupo, la frecuencia de los signos de abstinencia disminuyó a los niveles pre abstinencia (Fasciculación facial 1.6 ocurrencias/10 min y misceláneos 1.8 ocurrencias/10 min).

Si comparamos el comportamiento post abstinencia, encontramos que es significativamente diferente a pre abstinencia ($P=0.03$) y reintroducción ($P=0.03$) (Gráfica 1).



Gráfica 1.- Evaluación de signos de abstinencia/10 min en ratas del grupo 2 (dosis alta vs. baja) durante pre-abstinencia (tratamiento designado/grupo), post-abstinencia (interrupción de tratamiento/3 días) y reintroducción de tratamiento/grupo. Las barras claras indican fasciculación facial (tremor de carrillos, castañeteo dental y masticación) y barras oscuras misceláneos (intentos de escape, rasguños, mordidas y bostezos). Post-abstinencia se manifiestan los signos de retiro de nicotina ($*P=0.03$ vs. Pre-abstinencia), ($*P=0.03$ vs. Reintroducción) que se revierten con la reintroducción del tratamiento.

CONCLUSIONES

1.- Sujetos sometidos a consumo crónico con incremento gradual de nicotina en el agua de bebida, muestran ingesta normal de líquidos.

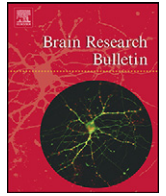
2.- Sujetos que consumen nicotina desde la adolescencia, desarrollan preferencia por esta sustancia en la edad adulta.

3.- Animales con preferencia por nicotina, muestran signos de abstinencia cuando esta sustancia es retirada del agua de bebida.

4.- Los signos de abstinencia se reducen cuando se reintroduce nicotina en el agua de bebida.

5.- Al reintroducir nicotina después del periodo de abstinencia, el consumo de nicotina fue similar al consumo pre abstinencia.

6.- A pesar de las diferencias en el consumo de nicotina entre el grupo 1 y grupo 2, el comportamiento de los animales fue similar.



Research report

Antidepressant-like effects of nicotine and transcranial magnetic stimulation in the olfactory bulbectomy rat model of depression

Patricia Vieyra-Reyes^{a,b}, Yann S. Mineur^b, Marina R. Picciotto^b, Isaac Túnez^c,
Román Vidaltamayo^a, René Drucker-Colín^{a,*}

^a Depto. de Neurociencias/Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Interior, Ciudad Universitaria, CP 04510 México, D.F., Mexico

^b Yale University School of Medicine, Department of Psychiatry, 34 Park Street, 3rd Floor Research, New Haven, CT 06508, USA

^c Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, University of Córdoba, Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 November 2007

Received in revised form 21 May 2008

Accepted 29 May 2008

Available online 26 June 2008

Keywords:

Models of depression

Olfactory bulbectomy

Nicotine

Self-medication

Forced swim test

Transcranial magnetic stimulation

ABSTRACT

In this study, we compared the depression-like symptoms induced by olfactory bulbectomy (OBX) in the two inbred Wistar and Long Evans rat strains. We also analyzed the self-regulated oral intake of nicotine in these strains and the effect of nicotine on the depression-like symptoms of olfactory bulbectomy. Furthermore, we compared the antidepressant-like effects of nicotine on Wistar rats to those of transcranial magnetic stimulation (TMS), which has emerged as a therapeutic alternative for depression management.

Our results show that Wistar rats develop depression-like symptoms, demonstrated by the forced swim test (FST), 4 weeks after OBX. However, in bulbectomized Long Evans rats these symptoms cannot be assessed due to a higher degree of variability of the swimming behavior of this strain. These results suggest that there are some innate differences in susceptibility to stress between these two rat strains.

In Wistar rats, voluntary oral nicotine intake (1.2 mg/(kg day) for 14 days) as well as nicotine administered as a single daily i.p. injection (1.5 mg/(kg day) for 14 days) decrease the depression-like symptoms of OBX. Daily transcranial magnetic stimulation (60 Hz and 0.7 mT for 2 h/day for 14 days) also decreases depression-like symptoms but is less effective than nicotine.

In conclusion, our results support the idea that there are possible innate differences for depression susceptibility and that nicotine and TMS may be useful in the treatment of this syndrome.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

There are mainly three effective treatments for depression: drug treatment, psychotherapy and electroconvulsive therapy. It has been shown that the lifetime prevalence of depression in smokers is directly correlated with the degree of nicotine dependence [2,3]. Nicotine patch can improve mood in non-smoking depressed patients [8,23–25], while smoking cessation frequently precipitates depressive symptoms that are reversed upon relapse to smoking [17,28].

Based on these observations, a self-medication hypothesis could be envisioned, in which smoking alleviates some symptoms of depression through the actions of nicotine, the primary psychoactive component in tobacco [15,30]. Behavioral studies in rodents have shown that chronic nicotine administration has antidepressant-like effects through its actions on specific subtypes of the nicotinic acetylcholine receptor [4,6,27]. However, little is

known about the antidepressant-like effects of freely consumed nicotine in animals, a mode of intake that more clearly resembles nicotine self-administration in humans.

Over the past decade, transcranial magnetic stimulation (TMS) of the dorsolateral prefrontal cortex has been established as a much less invasive alternative to electroconvulsive therapy [20] as treatment of depressive symptoms, but presently no comparison has been made between nicotine and TMS on depression.

The olfactory bulbectomy (OBX) rat model is considered to be one of the best animal models of depression because of its complex constellation of behavioral, neurochemical, neuroendocrine and neuroimmune alterations; similar to those reported in patients with major depression [10,11,32]. OBX has been shown to be sensitive to chronic, but not acute, administration of clinically efficacious antidepressants [5,32]. In addition, this model does not rely on selectively bred animals and can therefore provide a method to investigate the interaction between genetic susceptibility and environmental factors in different inbred strains of rats.

In the present study, we compared the susceptibility to develop depression-like symptoms after OBX in the two inbred Wistar and Long Evans rat strains using the forced swim test (FST). We decided

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5622 5733; fax: +52 55 5622 5607.

E-mail address: drucker@servidor.unam.mx (R. Drucker-Colín).

to use these two rat strains because they are commonly used in experimental approaches and they provide different genetic backgrounds, which would allow us to analyze intrinsic differences in susceptibility to the treatments.

We also analyzed the effect of voluntary oral intake of nicotine on these depression-like symptoms and compared the efficacy of orally ingested to i.p. injected nicotine on OBX. Finally, we compared the antidepressant-like effects of i.p. injected nicotine and TMS.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Sixty-day-old male Wistar and Long Evans rats (200–250 g) were used in this study. Animals were individually housed under standard colony conditions: 12:12 light/dark cycle (lights on at 7:00 a.m.), controlled room temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) with free access to food and water. Rats were acclimated to these conditions for 1 week prior to experimentation. All studies were conducted in accordance with the Principles and Procedures described by the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and in accordance with the Local Committee of the Universidad Nacional Autonoma de Mexico.

2.2. Olfactory bulbectomy: surgical procedure

OBX was performed under anesthesia induced by 3% halothane and maintained at 1%. A cranial window with the posterior edge at 5.2 mm anterior to Bregma was created in the frontal bone. Olfactory bulbs were cut and aspirated, taking care not to damage the frontal cortex. After surgery, bleeding was controlled by plugging the holes with haemostatic sponge (Gelfoam, Pharmacia & Upjohn Company, Michigan, USA). The sham operation was performed similarly, except that bulbs were left intact. Following surgery, rats were returned to their home cage and animals were observed but not handled. To prevent infection, animals were given 1,200,000 IU/kg of benzathine G penicillin (Novartis, Mexico D.F., Mexico) by intramuscular injection after surgery. A 2-week recovery period was allowed after the surgical procedure. All animals were sacrificed at the end of the study and only rats with a complete removal of the olfactory bulbs and with no damage to the frontal cortex were included for data analysis.

2.3. Open field: locomotor activity

In sequence to differentiate the effects of nicotine on swimming test from a general locomotor effect, each animal was placed individually into the center of the apparatus (circle made of wood, 80 cm in diameter) [35], the number of squares-crosses made by the animal (with all four paws) during 3 min observation period was recorded as the locomotor activity. All open field tests were performed between 10 a.m. and 1 p.m.

2.4. Forced swim test

This test was performed under standard conditions described previously [36]. Rats were placed in a cylindrical tank (height: 40 cm, diameter: 18 cm) filled with water at 25°C (water depth to 30 cm). Animals were removed and returned to their home cages after 15 min in water. Twenty-four hours later, rats were placed in the same cylinder under the same conditions. The total duration of immobility was measured for a 5-min period. A rat was considered immobile when it remained floating passively in the water [18] with only respiratory movements.

The amount of time spent floating was recorded and was considered to be an index of depressive-like behavior. All forced swim tests were performed between 10 a.m. and 1 p.m.

2.5. Transcranial magnetic field stimulation

Animals were placed in plastic cylindrical cages designed to keep them immobile while receiving magnetic stimulation to their heads. Each coil consisted of 1000 turns of enamelled copper wire (7 cm diameter) contained in plastic boxes ($10.5\text{ cm} \times 10.5\text{ cm} \times 3.5\text{ cm}$). A pair of Helmholtz coils (selected to minimize electric field effects) generated the fields (Dhan 1000(tm); Magnetoterapia S.A. de C.V., Mexico D.F., Mexico). The stimulation consisted of an oscillatory magnetic field in the form of a sinusoidal wave with a frequency of 60 Hz and amplitude of 0.7 mT applied for 2 h in the morning and 2 h in the afternoon during 14 days. The distance between each coil and the midpoint of the head was approximately 6 cm.

2.6. Effects of nicotine self-administration on OBX-induced depression in rats evaluated by the forced swim test

For individual fluid intake measurement Wistar and Long Evans rats were single-housed. Every home cage was equipped with two drinking bottles and rats had access to fluid *ad libitum*. For a 15-day period, 16–28 animals of each strain were randomly assigned to two experimental groups—(a) *Nicotine group*: one bottle was filled with nicotine (30 mg/l in deionized water) [7] and the other one with deionized water or (b) *Water-only group*: both bottles were filled with deionized water. During the following 15-day period, rats from each group were subjected to surgery and separated into sham and bulbectomized animals ($n=8-18$). During this period (postsurgery recovery), animals from each group consumed only deionized water in both drinking bottles. During the last 15-day period, rats of each group had access to one bottle filled with deionized water and other with nicotine. Fluid intake was recorded daily and animals were weighed weekly.

After these three 15-day periods, animals were subject to open field test followed by forced swim test [30].

2.7. Effect of i.p. injected nicotine or TMS on forced swim test in rats with olfactory bulbectomy

For this experiment 20 Wistar rats were divided as follows: (a) OBX + Vehicle (deionized water); (b) OBX + Nicotine; (c) OBX + Mock TMS, which involved placing the animals in the same TMS cage for the same period of time, but without any stimulation; (d) OBX + TMS.

Two weeks after surgery drug treatment began, nicotine was administered chronically once daily for 14 days at dose of 1.5 mg/kg body weight i.p. (dissolved in deionized water and prepared freshly each morning) [31] and TMS was applied for 14 days, either on its own or combined with olfactory bulbectomy. The animals were subjected to open field test followed by forced swim test on the 14th day of chronic nicotine administration.

2.8. Statistical analysis

Differences in immobility between sham-operated and OBX-animals were compared using two-way ANOVA followed by Holm–Sidak post hoc test. A significant level was considered when $P < 0.05$.

Differences in immobility times and fluid intake (water vs. nicotine) between the different rat strains were compared using three-way ANOVA test. Multiple pairwise comparison between the different groups was evaluated using the Holm–Sidak test. A significant level was considered when $P < 0.05$.

When comparing result from the TMS experiments, differences of treatment (Vehicle, Mock TMS, Nicotine, TMS) in rats were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni-corrected post hoc test to determine the source of significance. The level of statistical significance was set at 0.05. Data are presented as mean \pm S.E.M. StatView 5 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) was used to perform all analyses.

3. Results

3.1. Effects of OBX on Wistar and Long Evans rats

We evaluated the time that rats spent immobile in the FST. Wistar rats tended to stay less time immobile than Long Evans rats (73.3 ± 1.3 s/5 min vs. 105.9 ± 7.5 , respectively; $P = 0.00005$). Moreover, swimming behaviour was less homogeneous in Long Evans (median immobility time 97.5 s/5 min, range: 69–150 s/5 min) than in Wistar rats (median immobility time 74 s/5 min, range: 70–90 s/5 min). Four weeks after OBX, the time Wistar rats spent immobile was increased (94.6 ± 4.6 s/5 min, $P = 0.03$) with respect to pre-surgery and sham procedure (72.5 ± 1.7 s/5 min) values. In contrast, Long Evans did not show increases in immobility after OBX (96.6 ± 15.6 ; $P = 0.103$) or sham (78.2 ± 2.6 ; $P = 0.128$), although there was a significant difference between the two surgeries ($P = 0.0037$). A higher variability in the time Long Evans rats spent immobile was still observed after either surgical procedures (Fig. 1A and B). Two-way ANOVA analysis showed that the effect of the surgeries is dependent upon the rat strain, because there is a significant interaction between these two variables ($P = .0009$).

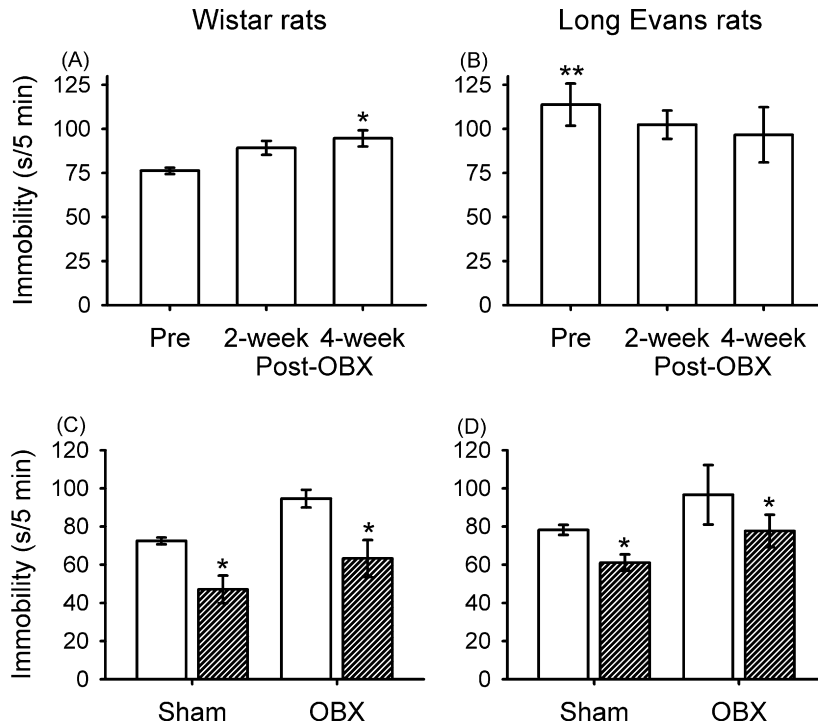


Fig. 1. Effects of OBX on Wistar and Long Evans rats. (A and B) Immobility time in the FST from animals exposed to water only. Prior to surgery, Wistar rats tended to stay less time immobile than Long Evans rats in the FST (** in B denotes $P < 0.05$ vs. pre-surgery Wistar rats). Four weeks after OBX, the time Wistar rats spent immobile was increased with respect to pre-surgery and sham procedures (* in A denotes $P < 0.05$ vs. pre-surgery). (C and D) Immobility time in the FST from animals subject to surgery and exposed to nicotine. Voluntary nicotine intake (hatched-bars) decreased the immobility time in both sham operated and OBX rats ($*P < 0.05$ vs. water-only, empty bars), independent from the strain.

3.2. Nicotine decreases immobility time independent from the surgical procedure

We analyzed the effect of oral self-administration of nicotine on immobility in FST in OBX and sham-operated animals. Three-way ANOVA analysis followed by post hoc Holm–Sidak comparison shows that nicotine reduces the immobility time in all the animals, independent from the surgical procedure and the strain. In Long Evans rats, which did not show a significant increase in immobility in FST after OBX, nicotine intake decreased immobility after both sham (61.1 ± 4.3 s/5 min vs. 78.25 ± 2.7 s/5 min water-only; $P = 0.0009$) and OBX surgeries (77.7 ± 8.5 s/5 min vs. 96.6 ± 15.6 s/5 min water-only; $P = 0.0009$). Similarly, in Wistar rats, nicotine intake decreased immobility in both sham-operated (47 ± 7.2 s/5 min vs. 72.5 ± 1.7 s/5 min water-only; $P = 0.0005$) and OBX rats (63.2 ± 9.7 s/5 min vs. 94.6 ± 4.6 s/5 min water-only; $P = 0.0005$).

There is not a significant interaction between the different surgeries or treatments across these two strains (strain \times surgery \times drug; $P = 0.775$), which indicates that both of these strains are equally sensitive to nicotine effects on immobility in the FST (Fig. 1C and D).

3.3. Nicotine intake does not increase after surgeries

Prior to OBX or sham surgeries, Wistar rats showed greater nicotine intake than Long Evans rats (1.62 ± 0.06 mg/(kg day) vs. 1.17 ± 0.05 mg/(kg day), $P = 0.0002$). Rats were then separated into different groups and were subject to surgery. After a 4-week period, nicotine consumption was reassessed.

In the group of Wistar rats where sham surgery was performed, animals decreased their nicotine intake by 30%

after surgery (1.08 ± 0.07 mg/(kg day) vs. 1.6 ± 0.09 mg/(kg day) pre-surgery; $P = 0.00005$). Nicotine intake was decreased by 25% in the group of Wistar rats where OBX surgery was performed (1.2 ± 0.05 mg/(kg day) vs. 1.7 ± 0.08 mg/(kg day) pre-surgery; $P = 0.00002$). Nicotine consumption was higher in OBX animals, compared to sham-operated Wistar rats, 4 weeks after the surgery ($P = 0.0006$).

Long Evans rats show a dramatic decrease (by 55%) in their nicotine intake after sham surgery (0.45 ± 0.04 mg/(kg day) vs. 0.99 ± 0.09 pre-surgery; $P = 2 \times 10^{-6}$). After OBX, Long Evans rats showed a smaller, but significant decrease in nicotine intake with respect to pre-surgery intake (1.2 ± 0.05 mg/(kg day) vs. 1.3 ± 0.06 ; $P = 0.024$), but they showed a significant higher intake when compared to sham-operated animals ($P = 5 \times 10^{-15}$). Total fluid intake among all different experimental groups was not significantly different (Table 1). Three-way ANOVA analysis indicates that there is a significant interaction between the strain and the surgery the rat was subject to, which correlates with the higher nicotine intake observed in Wistar animals ($P = 0.0009$). However, nicotine intake is higher in OBX animals, independent from the strain, since there are no significant interactions for the variables strain \times surgery \times treatment ($P = 0.023$). Moreover, the nicotine dose ingested by OBX animals was similar in both strains (1.25 ± 0.05 mg/(kg day) in Wistar vs. 1.24 ± 0.05 in Long Evans rats; $P = 0.24$).

3.4. Comparison of antidepressant effects of nicotine and TMS

Because our results showed an antidepressant effect of nicotine when administered as a voluntarily ingested oral solution, we decided to evaluate the effect of a single i.p. injection of nicotine on OBX, to have a tighter control over nicotine dosage.

Table 1
Nicotine consumption pre- and post-surgery

	Long Evans	Wistar
Baseline		
Total fluid intake		
Water only group (ml/day)	44.12 ± 1.16 (n = 16)	43.34 ± 2.06 (n = 16)
Water + Nicotine group (ml/day)	38.79 ± 1.76 (n = 28)	42.1 ± 1.1 (n = 24)
Nicotine intake		
ml/day	13.42 ± 0.68	17.21 ± 0.65
mg/(kg day)	1.22 ± 0.06	1.64 ± 0.06*
Pre-sham		
Total fluid intake		
Water only group (ml/day)	42.15 ± 1.07 (n = 8)	43.7 ± 1.96 (n = 8)
Water + Nicotine group (ml/day)	39.01 ± 1.05 (n = 10)	43 ± 1.09 (n = 8)
Nicotine intake		
ml/day	10.66 ± 0.97	18.29 ± 1.06
mg/(kg day)	0.99 ± 0.09	1.56 ± 0.09*
Post-sham		
Total fluid intake		
Water only group (ml/day)	39.64 ± 1.65 (n = 8)	44 ± 1.26 (n = 8)
Water + Nicotine group (ml/day)	40.78 ± 1.9 (n = 10)	42.7 ± 1.84 (n = 8)
Nicotine intake		
ml/day	6.21 ± 0.49	17.21 ± 1.14
mg/(kg day)	0.45 ± 0.04 [†]	1.08 ± 0.07 ^{†,‡}
Pre-OBX		
Total fluid intake		
Water only group (ml/day)	41.15 ± 1.18 (n = 8)	41.78 ± 1.93 (n = 8)
Water + Nicotine group (ml/day)	39.86 ± 1.56 (n = 18)	42.0 ± 1.72 (n = 16)
Nicotine intake		
ml/day	14.97 ± 0.89	16.68 ± 0.81
mg/(kg day)	1.35 ± 0.08	1.67 ± 0.08*
Post-OBX		
Total fluid intake		
Water only group (ml/day)	39.51 ± 1.22 (n = 8)	40.69 ± 1.4 (n = 8)
Water + Nicotine group (ml/day)	41.8 ± 1.64 (n = 18)	42.9 ± 1.38 (n = 16)
Nicotine intake		
ml/day	17.53 ± 0.71	17.92 ± 0.77
mg/(kg day)	1.24 ± 0.05 ^{†,‡}	1.25 ± 0.05 ^{†,‡}

[†] $P < 0.01$ vs. pre-surgery intake.

[‡] $P < 0.01$ vs. sham-operated animals.

* $P < 0.01$ vs. Long Evans rats.

Furthermore, we compared this effect to TMS, which has arisen as an alternate therapy for major depression. Nicotine administered as a single, daily i.p. injection (1.5 mg/(kg day) for 15 days) decreased the immobility time in OBX Wistar rats (63 ± 2.7 s/5 min vs. 160.8 ± 22.4 s/5 min in vehicle-injected group; $F_{(1,16)} = 3.03$, $P < 0.0001$). TMS also decreased the immobility time in OBX Wistar rats (106.2 ± 8.6 s/5 min) when compared to OBX animals subject to the same procedure under the TMS apparatus without exposing them to a magnetic field (OBX + Mock TMS group: 163.6 ± 11.2 s/5 min; $F_{(1,16)} = 15.60$, $P < 0.0001$). Nicotine had a stronger effect than TMS on immobility time in OBX animals ($F_{(1,16)} = 3.03$, $P < 0.0001$) (Fig. 2). There were no significant differences between the OBX + Vehicle vs. OBX + Mock TMS groups ($F_{(1,16)} = 3.03$, $P = 0.7272$). The effect of nicotine or TMS on OBX rats vs. Vehicle or Mock TMS, decrease the locomotor activity ($F_{(1,16)} = 15.60$, $P < 0.0001$) (Fig. 2).

4. Discussion

The aim of this study was to compare the depression-like state induced by OBX in two different inbred rat strains and to evaluate the antidepressant effect of nicotine in this model. We observe innate differences in susceptibility to develop depression-like symptoms after OBX between Wistar and Long Evans rats.

While Wistar rats started developing depression-like symptoms 2 weeks after OBX, assessed by an increased time of immobility in the FST, Long Evans rats did not show significant increases in immobility, even 4 weeks after OBX. This latter result could be due either to an intrinsic difference in susceptibility to depression in these rats or to a higher degree of variability in the swimming behavior of this strain. Long Evans rats tend to spend more time immobile in the FST at baseline than Wistar rats. Higher baseline immobility and variability could mask differences between OBX- and sham-operated Long Evans rats.

In both inbred rat strains, self-regulated nicotine intake decreased the immobility time in the FST, after either the sham surgery or OBX. An antidepressant-like effect of nicotine has been previously reported in rats [33] and other rodents using models that induce depression-like behavior, such as chronic mild stress and learned helplessness [4,6,27]. Interestingly, the average consumption of nicotine (≈ 1.2 mg/(kg day)) approaches the doses that had been shown to have therapeutic effects on depression [16,27]. To the best of our knowledge, this is the first description of an antidepressant effect of nicotine when voluntarily self-administered as an oral solution.

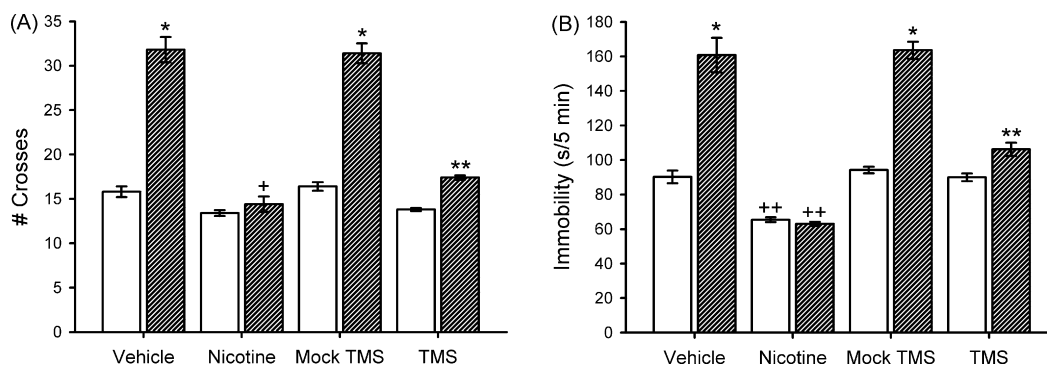


Fig. 2. Comparison of antidepressant effects of nicotine and TMS. (A) OBX-Wistar rats (hatched bars) showed increased locomotor activity in the open field test, when compared to sham-operated animals (empty bars; * $P < 0.0001$ vs. sham-operated animals). Injected nicotine and TMS decreased the hyperactivity of OBX-Wistar rats (* $P < 0.0001$ vs. Vehicle; ** $P < 0.0001$ vs. Mock TMS). These treatments did not have significant effects on the locomotor activity of sham-operated rats. (B) As previously shown, OBX increased the time Wistar rats spent immobile in the FST (* $P < 0.0001$ vs. sham-operated animals). Injected nicotine decreased the immobility time in both OBX- and sham-operated rats (** $P < 0.0001$ vs. Vehicle and TMS). However, this effect was proportionally higher in OBX-animals. TMS decreased the immobility time in OBX-rats, but not in sham-operated animals (** $P < 0.0001$ vs. Mock TMS). Nicotine showed a stronger antidepressant effect than TMS.

We observed nicotine intake differences between Wistar, which showed higher rates of consumption, and Long Evans rats. These differences could be related to intrinsic phenotypic variability between these two strains, as it was observed in the immobility time in FST after OBX. The nature of this variability, whether related to intrinsic differences in susceptibility to stress or differences in baseline locomotor activity, remains to be elucidated [1]. Our studies were in agreement with previous studies that have shown similar differences in immobility between inbred strains [13,19,34].

Interestingly, there was no preference for nicotine compared to water at baseline in any of the two inbred strains we tested. It is possible, however, that the lack of preference reflects a limitation in fluid intake, such that rats first drink nicotine up to a physiological threshold, but still need to drink fluid for hydration. Previous studies have shown that both animals and humans can titrate nicotine dosage intake precisely [7,26]. Thus, it is possible that our experimental animals ingested nicotine up to certain level where it exerts its effects and they ceased consumption once this level was reached. It should be noted that even though the rats did not prefer nicotine to water at baseline, all animals showed a significant intake of the drug. Moreover, the higher rates of nicotine intake in Wistar rats, observed under all conditions but OBX, could suggest a high intrinsic preference for nicotine in this strain.

Nicotine intake decreased in both Wistar and Long Evans rats after the surgical procedures, either sham or OBX. This decrease could be related to sensory adaptation to the bitter flavor, because animals subject to surgery had been exposed to nicotine before the procedures and nicotine intake was reevaluated 4 weeks after surgery (i.e., rats tend to reject the bitter flavor of nicotine once they are familiar with it). On the other hand, nicotine-effect titration could also limit intake. Supporting this latter idea, we observed in sham-operated Long Evans rats the same rate of reduction in the immobility time after nicotine consumption, although intake was decreased by 50% after the surgery.

OBX animals, either Wistar or Long Evans, showed higher nicotine intake than sham-operated animals. This could be related to either sensory adaptation in taste perception due to the bullectomy (i.e., aversion to bitter taste could be altered) [29] or to a self-medication mechanism controlling nicotine intake, because there are no significant differences between the immobility time of the sham-operated group and the OBX animals when exposed to this drug. These results further support a model where animals ingest nicotine up to a certain level, where it reaches putative maximal effects (decreasing the immobility time in the FST).

After showing that nicotine had an antidepressant-like effect when voluntarily ingested, we decided to evaluate the effect of a single, daily i.p. injection of this drug on the depression-like symptoms induced by OBX in Wistar rats, to compare the efficacy of these two methods of nicotine administration. We further compared the effect of nicotine to the antidepressant like effects of TMS, because it is well known that the OBX-rodent model responds well to other antidepressant therapies [14,21], and we wanted to test the effect of TMS, which has emerged as an alternative to electroconvulsive therapy for the treatment of human depression [12]. Moreover, repetitive TMS reduces immobility time in the FST, which further supports an antidepressant effect for this therapy [22].

Injected nicotine was as effective as orally ingested nicotine in decreasing immobility in the FST in OBX Wistar rats. Our results also show that chronic stimulation with TMS (2 h/day \times 2 h/day for 15 days) decreased the immobility time but that the effect of nicotine was greater, suggesting a more efficient antidepressant efficacy for this drug than TMS. Furthermore, injected nicotine and TMS attenuated the hyperactivity associated with OBX as shown by other antidepressant substances [9].

Finally, it can be suggested that TMS had more modest antidepressant properties than nicotine, and both approaches may provide an alternative for the treatment of depressive symptoms.

Acknowledgments

The authors would like to thank Lino E. Aguilar-Ortiz, Diana Millán-Aldaco and Marcela Palomero-Rivero for their technical support. Patricia Vieyra-Reyes was supported by Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. Yann S. Mineur and Marina R. Picciotto were supported by NIH grants # MH77681, DA13334/AA15632, DA00436 and the NARSAD Foster Bam award. R. Vidaltamayo was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM grant # IN211307.

References

- [1] A. Armario, A. Gavaldà, J. Martí, Comparison of the behavioural and endocrine response to forced swimming stress in five inbred strains of rats, *Psychoneuroendocrinology* 20 (1995) 879–890.
- [2] N. Breslau, M. Kilbey, P. Andreski, Nicotine dependence, major depression, and anxiety in young adults, *Arch. Gen. Psychiatry* 48 (1991) 1069–1074.
- [3] N. Breslau, D.F. Klein, Smoking and panic attacks: an epidemiologic investigation, *Arch. Gen. Psychiatry* 56 (1999) 1141–1147.
- [4] M.J. Buckley, C. Surowy, M. Meyer, P. Curzon, Mechanism of action of A-85380 in an animal model of depression, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 28 (2004) 723–730.
- [5] J.F. Cryan, C. Mombereau, In search of a depressed mouse: utility of models for studying depression-related behavior in genetically modified mice, *Mol. Psychiatry* 9 (2004) 326–357.
- [6] S.M. Ferguson, J.D. Brodtkin, G.K. Lloyd, F. Menzaghi, Antidepressant-like effects of the subtype-selective nicotinic acetylcholine receptor agonist, SIB-1508Y, in the learned helplessness rat model of depression, *Psychopharmacology (Berl.)* 152 (2000) 295–303.
- [7] S.D. Glick, K.E. Visser, I.M. Maisonneuve, An oral self-administration model of nicotine preference in rats: effects of mecamylamine, *Psychopharmacology (Berl.)* 128 (1996) 426–431.
- [8] R. Haro, R. Drucker-Colin, Effects of long-term administration of nicotine and fluoxetine on sleep in depressed patients, *Arch. Med. Res.* 35 (2004) 499–506.
- [9] J.P. Kelly, B.E. Leonard, An investigation of the antidepressant properties of lofepramine and its desmethylated metabolites in the forced swim and olfactory bulbectomized rat models of depression, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 9 (1999) 101–105.
- [10] J.P. Kelly, A.S. Wynn, B.E. Leonard, The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: an update, *Pharmacol. Ther.* 74 (1997) 299–316.
- [11] B.E. Leonard, M. Tuite, Anatomical, physiological, and behavioral aspects of olfactory bulbectomy in the rat, *Int. Rev. Neurobiol.* 22 (1981) 251–286.
- [12] Y. Levkovitz, N. Grisaru, M. Segal, Transcranial magnetic stimulation and antidepressive drugs share similar cellular effects in rat hippocampus, *Neuropsychopharmacology* 24 (2001) 608–616.
- [13] C. Lopez-Rubalcava, I. Lucki, Strain differences in the behavioral effects of antidepressant drugs in the rat forced swimming test, *Neuropsychopharmacology* 22 (2000) 191–199.
- [14] A. Mar, E. Sprekmeester, J. Rochford, Antidepressants preferentially enhance habituation to novelty in the olfactory bulbectomized rat, *Psychopharmacology (Berl.)* 150 (2000) 52–60.
- [15] A. Markou, T.R. Kosten, G.F. Koob, Neurobiological similarities in depression and drug dependence: a self-medication hypothesis, *Neuropsychopharmacology* 18 (1998) 135–174.
- [16] D. Martínez-González, O. Prospero-García, S. Mihăilescu, R. Drucker-Colin, Effects of nicotine on alcohol intake in a rat model of depression, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 72 (2002) 355–364.
- [17] A. Moreno-Coutino, C. Calderon-Ezquerro, R. Drucker-Colin, Long-term changes in sleep and depressive symptoms of smokers in abstinence, *Nicotine Tob. Res.* 9 (2007) 389–396.
- [18] G. Nowak, B. Szewczyk, J.M. Wieronska, P. Branski, A. Palucha, A. Pilc, K. Sadlik, W. Piekoszewski, Antidepressant-like effects of acute and chronic treatment with zinc in forced swim test and olfactory bulbectomy model in rats, *Brain Res. Bull.* 61 (2003) 159–164.
- [19] D.H. Overstreet, The Flinders sensitive line rats: a genetic animal model of depression, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 17 (1993) 51–68.
- [20] T. Paus, J. Barrett, Transcranial magnetic stimulation (TMS) of the human frontal cortex: implications for repetitive TMS treatment of depression, *J. Psychiatry Neurosci.* 29 (2004) 268–279.
- [21] M. Roche, A. Harkin, J.P. Kelly, Chronic fluoxetine treatment attenuates stressor-induced changes in temperature, heart rate, and neuronal activation in the olfactory bulbectomized rat, *Neuropsychopharmacology* 32 (2007) 1312–1320.
- [22] P.S. Sachdev, R. McBride, C. Loo, P.M. Mitchell, G.S. Malhi, V. Croker, Effects of different frequencies of transcranial magnetic stimulation (TMS) on the

- forced swim test model of depression in rats, *Biol. Psychiatry* 51 (2002) 474–479.
- [23] R.J. Salin-Pascual, J.R. de la Fuente, L. Galicia-Polo, R. Drucker-Colin, Effects of transdermal nicotine on mood and sleep in nonsmoking major depressed patients, *Psychopharmacology (Berl.)* 121 (1995) 476–479.
- [24] R.J. Salin-Pascual, R. Drucker-Colin, A novel effect of nicotine on mood and sleep in major depression, *Neuroreport* 9 (1998) 57–60.
- [25] R.J. Salin-Pascual, M. Rosas, A. Jimenez-Genchi, B.L. Rivera-Meza, V. Delgado-Parra, Antidepressant effect of transdermal nicotine patches in nonsmoking patients with major depression, *J. Clin. Psychiatry* 57 (1996) 387–389.
- [26] G. Scherer, Smoking behaviour and compensation: a review of the literature, *Psychopharmacology (Berl.)* 145 (1999) 1–20.
- [27] J. Semba, C. Mataka, S. Yamada, M. Nankai, M. Toru, Antidepressantlike effects of chronic nicotine on learned helplessness paradigm in rats, *Biol. Psychiatry* 43 (1998) 389–391.
- [28] K.B. Stage, A.H. Glassman, L.S. Covey, Depression after smoking cessation: case reports, *J. Clin. Psychiatry* 57 (1996) 467–469.
- [29] H.S. Stock, K. Ford, M.A. Wilson, Gender and gonadal hormone effects in the olfactory bulbectomy animal model of depression, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 67 (2000) 183–191.
- [30] Y. Tizabi, D.H. Overstreet, A.H. Rezvani, V.A. Louis, E. Clark Jr., D.S. Janowsky, M.A. Kling, Antidepressant effects of nicotine in an animal model of depression, *Psychopharmacology (Berl.)* 142 (1999) 193–199.
- [31] I. Tunez, P. Montilla, M.C. Munoz, R. Drucker-Colin, Effect of nicotine on 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in synaptosomes, *Eur. J. Pharmacol.* 504 (2004) 169–175.
- [32] H. van Riezen, B.E. Leonard, Effects of psychotropic drugs on the behavior and neurochemistry of olfactory bulbectomized rats, *Pharmacol. Ther.* 47 (1990) 21–34.
- [33] G. Vazquez-Palacios, H. Bonilla-Jaime, J. Velazquez-Moctezuma, Antidepressant-like effects of the acute and chronic administration of nicotine in the rat forced swimming test and its interaction with fluoxetine [correction of flouxetine], *Pharmacol. Biochem. Behav.* 78 (2004) 165–169.
- [34] J.M. Weiss, M.A. Cierpial, C.H. West, Selective breeding of rats for high and low motor activity in a swim test: toward a new animal model of depression, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 61 (1998) 49–66.
- [35] Y. Xu, B.S. Ku, H.Y. Yao, Y.H. Lin, X. Ma, Y.H. Zhang, X.J. Li, Antidepressant effects of curcumin in the forced swim test and olfactory bulbectomy models of depression in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 82 (2005) 200–206.
- [36] R.D. Porsolt, M. Le Pichon, M. Jalfre, Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments, *Nature*. 266 (1977) 730–732.

Voluntary oral nicotine intake in mice down-regulates GluR2 but does not modulate depression-like behaviors

Patricia Vieyra-Reyes^{a,b,1}, Marina R. Picciotto^a, Yann S. Mineur^{a,*}

^a Yale University, Department of Psychiatry, 34 Park Street, New Haven, CT 06508, USA

^b Depto. de Neurociencias / Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Interior, Ciudad Universitaria, México D.F., CP 04510, Mexico

Received 28 September 2007; received in revised form 7 January 2008; accepted 10 January 2008

Abstract

Repeated exposure to nicotine induces adaptive changes in the central nervous system including the mesolimbic dopamine (DA) projections from the ventral tegmental area (VTA) to the nucleus accumbens (NAc). These modifications can modulate nicotine reward and reinforcement, but also anxiety and depression-related behaviors. The development of addiction-related phenotypes is known to be modulated by regulation of glutamate receptors, as well as activation of transcription factors including cAMP response element-binding protein (CREB), in the NAc. We investigated the effects of nicotine pre-exposure on nicotine preference and levels of GluR1/2 and CREB in the mesolimbic system in male mice C57BL/6J and BALB/c inbred mice. We also evaluated locomotor activity, anxiety-like and depression-like behaviors known to be affected by nicotine. There were few behavioral changes in mice subjected to chronic nicotine exposure, but there was a marked regulation of GluR2 in the mesolimbic system. Both treated and non-treated animals showed a significant preference for nicotine when facing a choice with a control solution. These results suggest that voluntary nicotine drinking induces nicotine preference in mice, but does not alter a number of affective behaviors. In addition, alterations in CREB and GluR1 levels are not sufficient to explain preference for nicotine in a 2-bottle choice paradigm.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Nicotine; 2-Bottle choice; Behavior; AMPA receptors; CREB

Tobacco use induces adaptive changes in the central nervous system that could lead to nicotine dependence [8]. Mesolimbic dopamine (DA) projections from the ventral tegmental area (VTA) to the nucleus accumbens (NAc) are critical for drug reinforcement. Nicotine stimulates the DA system [21], thus resulting in nicotine reward and reinforcement, but also modulating anxiety and depression-related behaviors [1].

Addictive behavior also depends on the habit-forming process, mediated in part through glutamatergic modulation of the dopamine system and its projections [7]. For example, AMPA receptors in the shell of the NAc are critical for Pavlovian approach to drug cues and in cocaine-seeking behavior in rats [27]. The glutamatergic input to the striatum could affect neuronal plasticity [7,29], critical for the development of behaviors related to drug addiction [17,16]. Addictive disorders

also depend on drug-induced regulation of transcription factors including cAMP response element-binding protein (CREB), which are necessary for stable changes in neuronal function induced by repeated drug exposure [16,28].

Like other drugs of abuse, nicotine is self-administered and can result in a conditioned place preference under specific conditions [11]. Administration of nicotine in the drinking water is a less stressful alternative to repeated injection for chronic exposure experiments [20]. This method is very different from rapid infusion methods, such as smoking or jugular infusion, but results in intermittent exposure only during the waking period, and is sufficient to cause neuronal adaptations, including up-regulation of nicotinic binding sites, that are observed in the brains of human smokers [18,19,26]. Furthermore, the effects of oral nicotine exposure are increased in adolescent mice [2]. Finally, as with intravenous self-administration, animals can titrate their drug intake; thus, it is possible to test nicotine preference.

We investigated the effects of oral nicotine pre-exposure on nicotine preference and levels of the glutamate receptor subunits GluR1/2 and CREB in the mesolimbic system. We subjected

* Corresponding author. Tel.: +1 203 737 2042; fax: +1 203 737 2043.

E-mail address: yann.mineur@yale.edu (Y.S. Mineur).

¹ Present address: Depto. de Neurociencias/Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Interior, Ciudad Universitaria, México D.F., CP 04510, Mexico.

mice to increasing concentrations of nicotine in the drinking water from adolescence onward, and assessed nicotine intake at different concentrations in adulthood. We also measured locomotor activity, anxiety-like and depression-like behavior. Because the initiation of nicotine self-administration and abuse can rely on genetic differences between individuals, these experiments were also carried out in C57BL/6J and BALB/c mice. These inbred strains were chosen because of their clear phenotypic differences, especially related to depression-like behavior [12,13].

Male mice of the C57BL/6J (C57) and BALB/cJ (BALB) strains were obtained at ~3 weeks of age with nursing mothers from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Mice were housed under standard conditions: 12-h light:12-h dark cycle (lights on at 7:00 a.m.), controlled room temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) with free access to food. All studies were conducted in accordance with the principles and procedures described in the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 12 mice per group (for a total of 48) were used for behavioral experiments. 8 animals per group were randomly chosen for biochemical analyses.

Mice had *ad libitum* access to fluid for 2 h a day from 10 a.m. to noon. Mice were randomly assigned to the control group or the nicotine exposed group. Each cage had two drinking bottles from the time of weaning to habituate the animals for the nicotine preference tests. During pre-exposure, both bottles were filled with nicotine bitartrate (Sigma) or a molar-equivalent of tartaric acid (Sigma) alone dissolved in 2% sucrose to increase palatability (pH adjusted to 7.0) [10]. The concentration of nicotine or tartaric acid was increased from 13 to 28 mg/L every 7 days to ensure the animals maintained their fluid intake (Table 1). Bottles were wrapped in foil to protect against photodegradation.

At adulthood, about 3 months of age, all animals were provided with 2 bottles, one with tartaric acid and another with nicotine (13–28 mg/L), to determine whether animals could titrate nicotine intake by increasing their nicotine drinking at low

concentrations and decreasing at high concentrations. Consumption was measured daily by weighing bottles, and weight gain was recorded each week. Bottles were randomly positioned to avoid any side preference (see Table 1 for experimental design).

Mice were tested 2–4 h after drinking. Each test was performed in the sequence described below, separated by 48 h between tests.

The elevated plus maze was performed as described in Ref. [24]. The apparatus consisted of 2 open (4 mm-high edges) and 2 closed (black, 15 cm-high) arms (30 cm \times 5 cm). Floors were white Plexiglas and the apparatus was elevated 50 cm above the floor. Each mouse was placed in the central square (5 cm \times 5 cm) facing an open arm, and allowed to explore the maze for 5 min. The maze was thoroughly cleaned with water and dried with a cloth between sessions.

Mice were placed in a clean cage (48 cm \times 22 cm \times 18 cm) for 20 min. Locomotor activity was recorded using the Optomax system (Columbus instruments, Columbus, Ohio, USA). Twelve parallel beams were equally distributed across the cage. Horizontal locomotor activity was derived from the number of beam breaks during the test session.

The tail suspension test was performed as has been described in Ref. [14]. Mice were suspended by the tail with a paper clip attached with adhesive tape about 5–10 mm from the end of the tail. Time spent immobile was recorded over the 6 min test, along with number of bouts of immobility.

Mice were weighed and food was removed from the cage. The testing apparatus consisted of a clear Plexiglas enclosure (40 cm \times 40 cm \times 17 cm) with a lid. The floor was covered with 2 cm of bedding. A small piece of mouse chow was placed in the center on a piece of white, circular filter paper (diameter: 9.5 cm). At the start of the experiment, each animal was placed in a defined corner of the testing area, and the time to the first feeding event was recorded. Immediately after the mouse began to eat, the subject was removed and placed back in its home cage with a piece of chow. At the end of a 5-min period, the amount of food consumed was determined.

Passive avoidance testing was performed using a chamber from Ugo Basile (Comerio, Italy). On Day 1, each mouse was placed in the light chamber and was allowed to explore both compartments for 5 min. On Day 2, each mouse was placed in the light chamber and latency to enter the dark chamber was measured. Immediately after entry into the dark chamber, the door between compartments closed, and a 2-s electric shock (0.2 mA) was administered through the grid floor. On Day 3, each mouse was placed in the light chamber, and time to enter the dark chamber was recorded.

At least 2 days after the end of behavioral testing, mice were rapidly decapitated (between 10 a.m. and 1 p.m.), brains were removed, frozen immediately and kept at -80°C until use. Brains were placed in phosphate buffered saline (PBS) and sliced in a plastic matrix at 4°C . Punches targeting the VTA, NAc shell (Sh) and NAc core (Co) were collected, sonicated in homogenization buffer (10% SDS, 50 mM TRIS (pH 7.4), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, and 1 mM PMSF), then centrifuged at $14,000 \times g$ (10 min). The time between thawing and homogenization did not exceed 1.5 min.

Table 1
Schedule and description of the experiments

Date	[Nicotine] or [tartaric acid] (mM)	Paradigm
Day 0	15	Weaning
Day 3	15	Separation (3 mice/cage)
Day 7	18	Separation (single housing)
Day 14	20	Forced consumption
Day 21	23	
Day 28	28	Choice paradigm
Day 33	25	Forced consumption
Day 41	18	Choice paradigm
Day 46	28	Forced consumption
Day 48	13	Choice paradigm
Day 50	28	Forced consumption (until sacrifice)
Days 57–58	28	Elevated plus maze
Days 59–60	28	Open field
Days 64–65	28	Tail suspension
Days 66–67	28	Novelty-suppressed feeding
Days 72–76	28	Passive avoidance
Days 79–80	28	Brain removal–storage

Protein concentration was determined using a Lowry assay, 10 μ g of protein per lane was loaded on a 10% SDS-polyacrylamide gel and subsequently transferred to nitrocellulose membrane, rinsed in TRIS buffered saline (TBS), and blocked in 5% nonfat milk in TBS with 0.1% Tween (TBS-T) for 1 h at room temperature. After rinsing in TBS-T, membranes were incubated overnight in primary antibody diluted in TBS-T.

CREB (1:1000), pCREB (Ser133; 1:500) antibodies (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), GluR1 (1:3000) and GluR2 (1:500) antisera (Abcam, Cambridge, MA, USA) were used. Blots were washed in TBS-T and incubated 1 h in 1:5000 affinity-purified fluorescent anti-rabbit or anti-mouse IgG (Rockland IRdye 800 and Alexafluor 680), washed in TBS-T then milliQ water, and scanned using an Odyssey Infrared Imager (LI-COR Biosciences). Results are expressed in arbitrary units derived from the absorbance measured \pm S.E.M. Seven samples across the different groups were removed from the study due to abnormal variability (very faint, distorted and/or incomplete band) in Ponceau staining.

Data were analyzed by two-way analyses of variance (ANOVA) with Strain (2 levels), and Treatment (2 levels) as main factors, using StatView 5 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). *T*-tests against the null hypothesis were used to determine nicotine preference. *T*-test post hoc analyses (with Bonferroni corrections if necessary) were performed when relevant. Significance level was set at 5%.

There were no significant differences in total volume of fluid ingested in the nicotine or vehicle groups, either during the forced consumption (see Table 1; data not shown: $F(1, 1148) = 0.34, p = 0.06$) or nicotine choice period (data not shown: $F(1, 1509) = 1.23, p = 0.27$). Although BALB mice drank more (nicotine and/or control solutions) than C57 mice both during the forced exposure period ($F(1, 1148) = 7.43, p = 0.006$) and in the choice period ($F(1, 1509), p = 42.78, p < 0.0001$) no interactions were detected between strain and treatment.

During the nicotine choice period, mice titrated their nicotine intake as concentration increased to maintain a constant level (i.e. mice were drank more nicotine-based fluid when the concentration was low, and less when it was high (data not shown: $F(4, 481) = 0.48, p = 0.71$) independent of strain ($F(4,$

$481) = 0.51, p = 0.83$). No interactions between strain and treatment were detected ($F(4, 481) = 0.15, p = 0.10$).

During the choice paradigm, animals showed a marked preference for nicotine as compared to the control solution (Fig. 1A; $t_{656} = 10.22, p < 0.0001$), although no differences were seen following pre-exposure to nicotine ($F(1, 645) = 0.002, p = 0.96$). A trend toward a strain difference was observed ($F(1, 645) = 3.22, p = 0.07$). There was no difference in preference between 13 and 25 mg/L ($t_{404} = -0.40, p = 0.69$) but 18 mg/L was less preferred than 25 mg/L (Fig. 1B; $t_{574} = -2.85, p = 0.004$).

Forced nicotine intake did not result in significant behavioral differences in the paradigms studied, although strain differences were detected (data not shown)—elevated plus maze (time spent in the open arms): treatment $F(1, 43) = 0.48, p = 0.49$, strain $F(1, 43) = 29.4, p < 0.0001$, BALB > C57 in anxiety-like behavior; locomotor activity in open field: treatment $F(1, 43) = 34.3, p = 0.82$; tail suspension test: treatment $F(1, 41) = 1.92, p = 0.17$, strain $F(1, 41) = 111.28, p < 0.0001$, C57 > BALB; novelty-suppressed feeding: $F(1, 44) = 0.33, p = 0.56$); passive avoidance: treatment $F(1, 44) = 0.17, p = 0.68$.

No differences in GluR1 were detected between the different treatments ($F(1, 58) = 0.27, p = 0.87$) or genotypes (Fig. 2). However, highly significant differences in expression were detected between brain regions ($F(2, 58) = 90.53, p < 0.0001$). No interactions were detected between treatments and/or strain and/or brains regions.

No differences in GluR2 were detected overall across treatment and strain, although there were significant differences among brain areas and numerous interactions were detected (Fig. 2). Treatment effects on GluR2 varied between BALB and C57 mice ($F(1, 130) = 8.86, p = 0.003$) and their respective brain loci ($F(2, 130) = 3.07, p = 0.04$). Post hoc analyses revealed that GluR2 levels were significantly reduced in the core ($t_{20} = 0.09, p = 0.0006$) and shell ($t_{22} = 0.38, p < 0.0001$) of the NAc and the VTA ($t_{22} = 0.38, p = 0.005$) of C57 mice but not BALB mice. No overall treatment effect on CREB or pCREB levels were detected, but total CREB levels differed between BALB and C57 mice ($F(1, 131) = 5.47, p = 0.02$), and their respective brain loci ($F(2, 131) = 6.59, p = 0.002$). No other interactions were detected (Fig. 3).

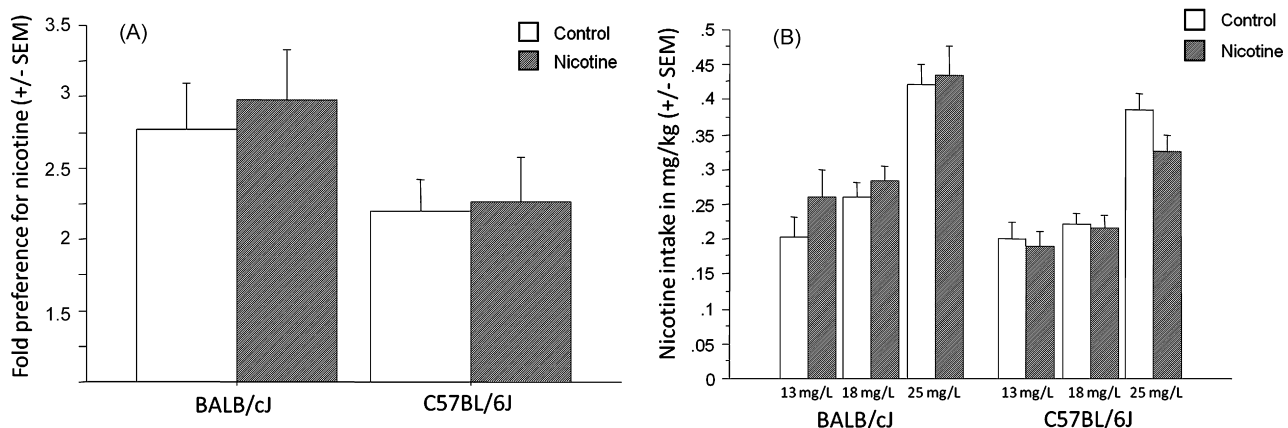


Fig. 1. Nicotine consumption in C57BL/6J and BALB/cJ mice during the nicotine preference paradigm. (A) Average preference per session for nicotine \pm S.E.M. (B) Average nicotine intake per session expressed in mg/kg \pm S.E.M. $n = 12$ /group.

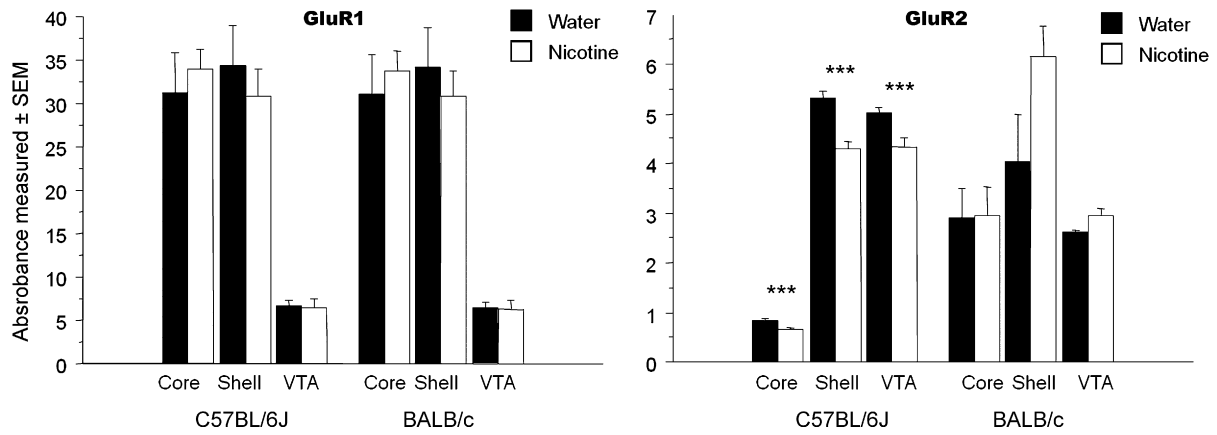


Fig. 2. Western blotting for GluR1 and GluR2 in the NAc (core and shell) and VTA of C57BL/6J and BALB/cJ mice. Results are expressed in arbitrary units of absorbance ± S.E.M. Comparisons are made between nicotine and control groups. *** $p < 0.001$. $n = 7-8$ /group.

Sensitization to the psychostimulant properties of nicotine occurs following repeated intermittent exposure, potentially underlying the shift from drug use to abuse, when ‘desire for the drug’ might become sensitized independently from ‘drug pleasure’ [1]. In our study, pre-exposure to nicotine did not influence nicotine intake, although mice strongly preferred nicotine over control solution even when animals were nicotine naïve. In mice, paradigm differences can significantly affect nicotine intake [11]. For example, dose or water-deprivation schedule strongly influences mouse oral nicotine intake, and single-housing can modify stress levels in male mice, altering nicotine consumption [3,25]. Dopaminergic neurons of the VTA show enhanced responsiveness to AMPA receptor stimulation after chronic stimulant exposure, potentially mediated by increased expression of specific AMPA receptor subunits following chronic drug administration. This could contribute to heightened activity of the mesolimbic dopamine system, and drug sensitization [15]. Nicotine stimulates glutamatergic inputs to dopamine neurons [1]. AMPA receptors seem to be specifically involved in drug-seeking and in vulnerability to drug addiction [6,7,27], through cortical glutamatergic inputs to the striatum that might affect neuronal plasticity and habit forming processes. In our study, nicotine exposure down-regulated

GluR2 in the NAc and the VTA of C57 but not BALB mice. This decrease in GluR2 expression has been observed previously in adolescent animals administered nicotine, whereas comparable exposure during adulthood had the opposite or no effect [1]. However, nicotine preference was similar in mice that did not receive nicotine pre-exposure, suggesting that while chronic nicotine use during adolescence can down-regulate GluR2, this does not translate into a shift of nicotine preference. Alternatively, because mice preferred nicotine at baseline, they might have already reached a threshold of nicotine consumption due to a ceiling effect.

None of the behaviors assayed showed significant differences between the treatment groups. This is unforeseen as nicotine/nicotinic agents can modify antidepressant-like and anxiety-like behavior, passive avoidance, and locomotor activation [9,10,14,21,22]. However, most previous studies used different routes of admission and/or acute treatment in adults. Adaptation following the oral nicotine pre-treatment period may lead to compensatory changes in systems regulating these behaviors, consistent with the lack of differences we found in CREB expression or activation. CREB is involved in depression-like and anxiety-like behaviors [4,23] and is activated in the NAc following chronic drug use [5,17], behaviors unaffected in the

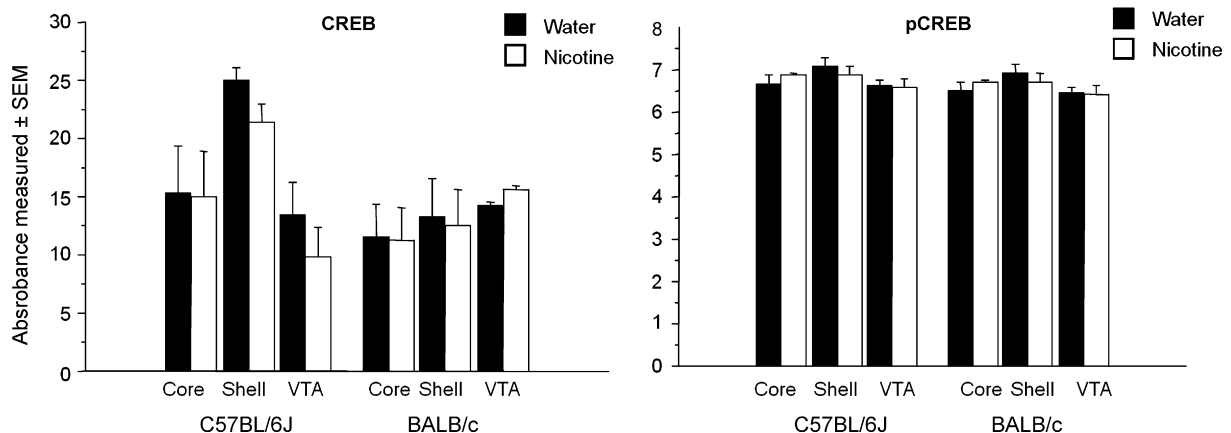


Fig. 3. Western blotting for CREB and pCREB in the NAc (core and shell) and the VTA of C57BL/6J and BALB/cJ. Results are expressed in arbitrary units of absorbance ± S.E.M. $n = 6-8$ /group.

present study. However, adaptations associated with addiction may also occur outside of the mesolimbic dopamine system [15]. In addition, modulation by CREM could also account for some of the results we observed. However, further data are needed to investigate this possibility.

It is noteworthy that no differences in response to nicotine treatment could be detected in the two strains used here, and that both strains showed a lack of nicotine-induced behavioral effects after nicotine pre-exposure. Nonetheless, statistical analyses revealed strain differences in the different paradigms, similar to what has been reported previously in Ref. [12,13]. For instance, BALB mice showed more anxiety-like behavior than C57 mice in the elevated plus maze, and exhibited less behavioral despair in the tail suspension test, suggesting that there is enough statistical power to detect differences in behavior, and that the two strains share at least some neurochemical and behavioral responses to adolescent nicotine exposure.

In summary, these results indicate that nicotine drinking with previous fluid deprivation is an efficient way to induce nicotine preference in distinct genetic backgrounds of mice. However, despite significant nicotine intake, mice did not show robust biochemical alterations beyond GluR2 down-regulation. Thus, alterations in CREB and GluR1 are not sufficient to explain preference for nicotine in a 2-bottle choice paradigm.

Acknowledgements

This work was supported by DA14241, DA10455 and AA15632.

References

- [1] W. Adriani, G. Laviola, Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model, *Behav. Pharmacol.* 15 (2004) 341–352.
- [2] W. Adriani, S. Macri, R. Pacifici, G. Laviola, Peculiar vulnerability to nicotine oral self-administration in mice during early adolescence, *Neuropsychopharmacology* 27 (2002) 212–224.
- [3] W. Adriani, S. Macri, R. Pacifici, G. Laviola, Restricted daily access to water and voluntary nicotine oral consumption in mice: methodological issues and individual differences, *Behav. Brain Res.* 134 (2002) 21–30.
- [4] M. Barrot, J.D. Olivier, L.I. Perrotti, R.J. DiLeone, O. Berton, A.J. Eisch, S. Impey, D.R. Storm, R.L. Neve, J.C. Yin, V. Zachariou, E.J. Nestler, CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2002) 11435–11440.
- [5] J.D. Berke, S.E. Hyman, Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory, *Neuron* 25 (2000) 515–532.
- [6] S. Fasano, R. Brambilla, Cellular mechanisms of striatum-dependent behavioral plasticity and drug addiction, *Curr. Mol. Med.* 2 (2002) 649–665.
- [7] G.L. Gerdeman, J.G. Partridge, C.R. Lupica, D.M. Lovinger, It could be habit forming: drugs of abuse and striatal synaptic plasticity, *Trends Neurosci.* 26 (2003) 184–192.
- [8] B.T. Hope, D. Nagarkar, S. Leonard, R.A. Wise, Long-term upregulation of protein kinase A and adenylate cyclase levels in human smokers, *J. Neurosci.* 27 (2007) 1964–1972.
- [9] H.R. Hsu, T.Y. Chen, M.H. Chan, H.H. Chen, Acute effects of nicotine on restraint stress-induced anxiety-like behavior, c-Fos expression, and corticosterone release in mice, *Eur. J. Pharmacol.* 566 (2007) 124–131.
- [10] S.L. King, B.J. Caldarone, M.R. Picciotto, Beta2-subunit-containing nicotinic acetylcholine receptors are critical for dopamine-dependent locomotor activation following repeated nicotine administration, *Neuropharmacology* 47 (Suppl. 1) (2004) 132–139.
- [11] S.G. Matta, D.J. Balfour, N.L. Benowitz, R.T. Boyd, J.J. Buccafusco, A.R. Caggiula, C.R. Craig, A.C. Collins, M.I. Damaj, E.C. Donny, P.S. Gardner, S.R. Grady, U. Heberlein, S.S. Leonard, E.D. Levin, R.J. Lukas, A. Markou, M.J. Marks, S.E. McCallum, N. Parameswaran, K.A. Perkins, M.R. Picciotto, M. Quik, J.E. Rose, A. Rothenfluh, W.R. Schafer, I.P. Stolerman, R.F. Tyndale, J.M. Wehner, J.M. Zirger, Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research, *Psychopharmacology (Berl)* 190 (2007) 269–319.
- [12] Y.S. Mineur, C. Belzung, W.E. Crusio, Effects of unpredictable chronic mild stress on anxiety and depression-like behavior in mice, *Behav. Brain Res.* 175 (2006) 43–50.
- [13] Y.S. Mineur, C. Belzung, W.E. Crusio, Functional implications of decreases in neurogenesis following chronic mild stress in mice, *Neuroscience* 150 (2007) 251–259.
- [14] Y.S. Mineur, O. Somenzi, M.R. Picciotto, Cytisine, a partial agonist of high-affinity nicotinic acetylcholine receptors, has antidepressant-like properties in male C57BL/6J mice, *Neuropharmacology* 52 (2007) 1256–1262.
- [15] E.J. Nestler, G.K. Aghajanian, Molecular and cellular basis of addiction, *Science* 278 (1997) 58–63.
- [16] E.J. Nestler, Molecular neurobiology of addiction, *Am. J. Addict.* 10 (2001) 201–217.
- [17] E.J. Nestler, Common molecular and cellular substrates of addiction and memory, *Neurobiol. Learn. Mem.* 78 (2002) 637–647.
- [18] S. Nuutinen, L. Ahtee, R.K. Tuominen, Time and brain region specific up-regulation of low affinity neuronal nicotinic receptors during chronic nicotine administration in mice, *Eur. J. Pharmacol.* 515 (2005) 83–89.
- [19] J.S. Pakkanen, E. Jokitalo, R.K. Tuominen, Up-regulation of beta2 and alpha7 subunit containing nicotinic acetylcholine receptors in mouse striatum at cellular level, *Eur. J. Neurosci.* 21 (2005) 2681–2691.
- [20] K. Pekonen, C. Karlsson, I. Laakso, L. Ahtee, Plasma nicotine and cotinine concentrations in mice after chronic oral nicotine administration and challenge doses, *Eur. J. Pharm. Sci.* 1 (1993) 13–18.
- [21] M.R. Picciotto, Common aspects of the action of nicotine and other drugs of abuse, *Drug Alcohol Depend.* 51 (1998) 165–172.
- [22] M.R. Picciotto, M. Zoli, C. Lena, A. Bessis, Y. Lallemant, N. Le Novere, P. Vincent, E.M. Pich, P. Brulet, J.P. Changeux, Abnormal avoidance learning in mice lacking functional high-affinity nicotine receptor in the brain, *Nature* 374 (1995) 65–67.
- [23] A.M. Pliakas, R.R. Carlson, R.L. Neve, C. Konradi, E.J. Nestler, W.A. Carlezon Jr., Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens, *J. Neurosci.* 21 (2001) 7397–7403.
- [24] R.J. Rodgers, J.C. Cole, K. Aboualfa, L.H. Stephenson, Ethopharmacological analysis of the effects of putative ‘anxiogenic’ agents in the mouse elevated plus-maze, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 52 (1995) 805–813.
- [25] C.J. Slawecki, A. Gilder, J. Roth, C.L. Ehlers, Increased anxiety-like behavior in adult rats exposed to nicotine as adolescents, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75 (2003) 355–361.
- [26] J.A. Sparks, J.R. Pauly, Effects of continuous oral nicotine administration on brain nicotinic receptors and responsiveness to nicotine in C57Bl/6 mice, *Psychopharmacology (Berl)* 141 (1999) 145–153.
- [27] M.A. Sutton, E.F. Schmidt, K.H. Choi, C.A. Schad, K. Whisler, D. Simmons, D.A. Karanian, L.M. Monteggia, R.L. Neve, D.W. Self, Extinction-induced upregulation in AMPA receptors reduces cocaine-seeking behaviour, *Nature* 421 (2003) 70–75.
- [28] C.L. Walters, J.N. Cleck, Y.C. Kuo, J.A. Blendy, Mu-opioid receptor and CREB activation are required for nicotine reward, *Neuron* 46 (2005) 933–943.
- [29] D.G. Winder, R.E. Egli, N.L. Schramm, R.T. Matthews, Synaptic plasticity in drug reward circuitry, *Curr. Mol. Med.* 2 (2002) 667–676.

ANEXO II

Acción de la nicotina como antidepresivo y regulador del sueño en sujetos deprimidos

Patricia Vieyra-Reyes¹, Arturo Venebra-Muñoz², Bruno Rivas-Santiago³, René Drucker-Colín¹, Fabio García-García²

Institución:

¹Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Interior, Ciudad Universitaria, México D.F., C.P. 04510, México.

²Departamento de Biomedicina, Laboratorio de Biología de Sueño, Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, C.P. 91190, México.

³Unidad de Investigación Médica Zacatecas, Instituto Mexicano del Seguro Social, Zacatecas, Zacatecas, C. P. 98000, México.

Palabras clave: depresión, receptor nicotínico, nicotina, serotonina, dopamina antidepresivo, sueño

Autor responsable de la correspondencia: Dr. René Drucker-Colín.

Depto. de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, Ciudad Universitaria, Circuito Interior, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF, CP 04510 México. Tel: +52 55 5622 4182; Fax: +52 55 56 22 5607; e-mail: drucker@servidor.unam.mx

Objetivo: Describir las principales evidencias que han mostrado que la nicotina tiene propiedades antidepresivas, además de mejorar la calidad de sueño en pacientes deprimidos

Desarrollo: Se ha observado que la mayoría de los sujetos deprimidos son fumadores y presentan disturbios del sueño, sin embargo, al fumar o administrar nicotina revierten los síntomas depresivos y alarga la latencia al primer periodo de sueño de movimientos oculares rápidos en sujetos deprimidos. Estos hallazgos junto con otros que se presentan en el manuscrito apoyan fuertemente que la nicotina puede ser utilizada como tratamiento antidepresivo. A continuación se presentan estas evidencias en el siguiente orden: 1.- Farmacología de la nicotina (a: Metabolismo; b: Receptores Nicotínicos) 2.- Mecanismo de interacción de la nicotina en los desórdenes depresivos; 3.- Nicotina y regulación del sueño.

Conclusiones: El mecanismo antidepresivo sugerido para la nicotina involucra una acción directa sobre la actividad dopaminérgica por una parte, pero también sobre la actividad serotoninérgica, sin embargo más estudios son necesarios para esclarecer el mecanismo adecuado.

Tabla de Contenido

Introducción

Aspectos Generales de la Nicotina

Farmacología

Metabolismo

Receptores Nicotínicos

Mecanismos de interacción de la nicotina en los desordenes depresivos

Nicotina y Regulación del Sueño

Referencias

Introducción

La nicotina es un alcaloide y el principal agente psicoactivo del tabaco, su efecto sobre el Sistema Nervioso Central resulta de la interacción con los receptores nicotínicos de la acetilcolina. La acetilcolina es uno de los principales neurotransmisores del cerebro y se ha relacionado con una multitud de funciones entre las que destacan la regulación del apetito, la motilidad muscular, el ciclo vigila-sueño y recientemente con los trastornos depresivos.

La depresión es un desorden heterogéneo crónico que a menudo se manifiesta con síntomas psicológicos, conductuales y fisiológicos. Este desorden psiquiátrico afecta a más del 21% de la población a nivel mundial [86] por lo que se considera un problema mayor de salud pública. Las características bioquímicas que a menudo se observan en pacientes deprimidos son: cambios en la actividad tanto en el sistema noradrenérgico como serotoninérgico, así como altos niveles de cortisol plasmático [50], sin embargo las causas de estas alteraciones bioquímicas aun no son claras.

Actualmente se ha sugerido que la nicotina puede jugar un papel importante como antidepresivo [28, 34, 35, 71, 72] ya que en estudios recientes se ha visto que individuos deprimidos tienden a fumar más que los no deprimidos [14, 16] y la interrupción de este hábito produce una depresión mayor que se revierte con el uso de antidepresivos [17] y además genera una latencia corta en el sueño de movimientos oculares rápidos (MOR), el cual es caracterizado por presencia de atonía muscular y ensoñaciones. Por otro lado se ha observado que el uso de parches transdermales de nicotina mejora el carácter según la escala de Hamilton en pacientes deprimidos no fumadores [35, 71] e incrementa el tiempo de sueño MOR después de la aplicación del parche cada 24 hrs [27]. En modelos animales de depresión la nicotina también ha mostrado efectos antidepresivos [23, 25, 54, 73, 77, 81] y reguladores del sueño [84].

A pesar de que la base neurobiológica de esta asociación “nicotina-depresión” no es clara, se ha sugerido que el fumar es la automedicación hecha por el individuo deprimido para aliviar algunos de sus síntomas depresivos entre ellos los desórdenes de sueño usando nicotina [14, 53].

Con base en estos hallazgos y para entender algunos aspectos de dicha asociación, se describen en la primer parte del trabajo los aspectos básicos de la farmacología de la

nicotina y su posible mecanismo antidepresivo; en la segunda parte, el efecto de la nicotina como regulador de sueño en pacientes deprimidos.

Aspectos Generales de la Nicotina

Farmacología

Cuando el tabaco es fumado la nicotina es absorbida rápidamente aunque la cantidad absorbida depende del volumen e intensidad de succión, la dilución con el aire y la profundidad de la inhalación. Después de la bocanada, altos niveles de nicotina alcanzan el cerebro en 10 o 20 s, mas rápido que con administración intravenosa [6]. Las concentraciones de nicotina en la sangre arterial después de fumar un cigarro son usualmente entre 20 y 60 ng/ml y las concentraciones después de la primer bocanada son 7 ng/ml [49].

La absorción de nicotina a través de las membranas biológicas depende del pH. La absorción es rápida en pulmones presumiblemente por la amplia área que presentan los alveolos y el pH pulmonar (7.4). Cerca de 1 mg (0.3 – 2 mg) de nicotina es absorbido al momento de fumar [30, 43].

Las terapias de reemplazo de nicotina (TRN), tales como la goma de mascar, parches transdermales, spray nasal y tabletas sublinguales tienen pH alcalino para facilitar la absorción de nicotina a través de las membranas biológicas, sin embargo la absorción es baja e incrementa los niveles de nicotina mas gradualmente que con el fumar .

Posterior a su absorción, la nicotina entra en el torrente sanguíneo donde a un pH de 7.4 el 69% es ionizada, el 31% es desionizada y el 5% se une a proteínas plasmáticas [11]. Evidencias de estudios animales muestran que los tejidos con mas afinidad para la nicotina son el riñón, hígado, pulmón, cerebro y corazón en este orden; el músculo esquelético tiene moderada afinidad para la nicotina y el tejido adiposo tiene la mas baja afinidad [7]. Sin embargo, basados en muestras de autopsias de fumadores, la nicotina tiene mayor afinidad por el hígado, seguida por riñón, bazo o esplenio y pulmones y la mas baja afinidad es por el tejido adiposo [80] denotando que la afinidad depende de la vía de administración.

Con la administración de nicotina transdermal las concentraciones de esta sustancia en jugo gástrico son 60 veces mas altas que en plasma y en saliva son 11 veces mas altas que en plasma, sin embargo con la administración de nicotina al fumar, las concentraciones en

jugo gástrico son 53 veces más altas que en plasma y 87 veces más altas en saliva. [46]. La nicotina tiene un bajo volumen de absorción en estómago porque es ionizada en el jugo gástrico pero es mejor absorbida en intestino delgado porque tiene un pH más alcalino y posee una gran superficie de absorción.

La nicotina también se acumula en la leche materna, además de que cruza la barrera placentaria fácilmente y existe evidencia de acumulación de nicotina en suero fetal y líquido amniótico en concentraciones mayores que en el suero materno [21].

Metabolismo

La nicotina es metabolizada por el hígado y seis metabolitos primarios han sido identificados siendo cuantitativamente el más importante la cotinina. En humanos del 70 al 80 % de nicotina es convertida en cotinina [10]. La nicotina es excretada vía renal por filtración glomerular y tubular con variable reabsorción dependiendo del pH de la orina. En orina ácida la nicotina es ionizada y la reabsorción tubular minimizada, en orina alcalina una mayor cantidad de nicotina es desionizada seguida por la reabsorción tubular. La excreción de cotinina es poco influenciada por el pH urinario debido a que es más básica y además es dependiente de la tasa de flujo urinario [9]. Un estudio demostró por medio de radiactividad que la nicotina también puede ser excretada en heces [3], 72 hrs. después de fumar se estimó que el 1% de dosis de nicotina fue excretada por esta vía. La cotinina pero no nicotina es detectada en meconio (primer material fecal excretada por el recién nacido) de niños cuyas madres son fumadoras o expuestas a un ambiente con humo de cigarro [22]. Se ha observado que mayores cantidades de nicotina que de cotinina son excretada en el sudor de fumadores [41], sin embargo las cantidades no han sido contabilizadas.

Se especula que el continuo consumo de cigarro adicional al uso de TRN pueden provocar una sobredosis incluyendo náusea, vómito y posiblemente la muerte, sin embargo no existe evidencia de efectos tóxicos serios cuando se combina cualquier TRN o varias TRN juntas (uso de múltiples parches por ejemplo) [8]. Los niveles más altos de nicotina en sangre se alcanzan al terminar de fumar un cigarro y declinan rápidamente en los siguientes 20 min por la amplia distribución en los tejidos corporales; el volumen de distribución en humanos es 2.6 veces el peso corporal. [69].

La nicotina en spray nasal principalmente es absorbida por la mucosa nasal y en 1 o 2 minutos se encuentra en sangre arterial, la bio-disponibilidad del spray es del 50 al 75 % [38]. Después de administrar 1.0 mg de nicotina (0.5 mg / spray X 2 sprays), el pico (umbral) de nicotina arterial es de 10 ng ml^{-1} en 5 min y los niveles en venas 4 ng ml^{-1} después de 20-25 min [31]. El equilibrio arteriovenoso se logra a los 30 min post-administración. En cuanto a la absorción de la nicotina por medio de parches, esta dependerá del tipo de parche y la nicotina podrá ser liberada continuamente por 16 o 24 hrs, si el parche libera rápidamente la dosis inicial, los niveles pico se alcanzan a las 4 hrs post-administración aunque en general se requiere de 6 a 9 hrs [29]. Por medio de la goma de mascar los niveles de nicotina se incrementan gradualmente en 15 o 30 min. y aproximadamente la mitad del contenido de la goma de mascar es absorbido, por ejemplo de una goma de mascar con un contenido de 2 mg de nicotina se absorben 1 mg [74] aunque para una mejor absorción se deben evitar bebidas ácidas.

Receptores Nicotínicos

Los receptores nicotínicos son receptores pre-sinápticos en su mayoría pero también los hay post-sinápticos, son de tipo canal, de naturaleza catiónica (Na^+ o Ca^{++}) [47] y de conformación pentamérica con al menos dos sitios de unión-ligando en la interfase entre las subunidades [19, 60]. Al unirse la acetilcolina o nicotina a estos sitios generan un cambio conformacional del receptor y apertura del canal lo que conlleva a un flujo de iones dentro y fuera de la célula y la liberación de neurotransmisores tales como dopamina [65, 66], GABA (ácido gama aminobutírico) [39], Glutamato [56], serotonina [68] y péptidos opioides [13, 64]. Los genes que codifican para dichas subunidades han sido identificados y clonados en mamíferos ($\alpha 1$ - $\alpha 10$; $\beta 1$ - $\beta 9$) y varias de estas subunidades han sido encontradas en el sistema nervioso central ($\alpha 2$ - $\alpha 7$; $\beta 2$ - $\beta 4$). El arreglo o ensamble de estas subunidades determina diferentes subtipos de receptores nicotínicos (heteropentámeros) que difieren en sus propiedades farmacológicas y biofísicas (Fig 1 C). Las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$, γ , δ y ϵ se considera representan el receptor muscular; $\alpha 2$ - $\alpha 6$ y $\beta 2$ - $\beta 4$ representan el receptor neuronal y $\alpha 7$ - $\alpha 10$ representan el receptor neuronal homopentamérico (Fig 1 B).

Los receptores nicotínicos no solo se encuentran en el cuerpo neuronal y dendritas, también se encuentran en las terminales axónicas [2] y están distribuidos en varias regiones del cerebro, los principales hallazgos provienen de estudios de inmunohistoquímica, de la utilización de ligandos radioactivos (binding) y de hibridación *in situ*. De estos estudios se ha derivado que el subtipo de receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$ es uno de los más abundantes en el cerebro y está asociado a desórdenes conductuales como la depresión y adicción a nicotina (Figura 1).

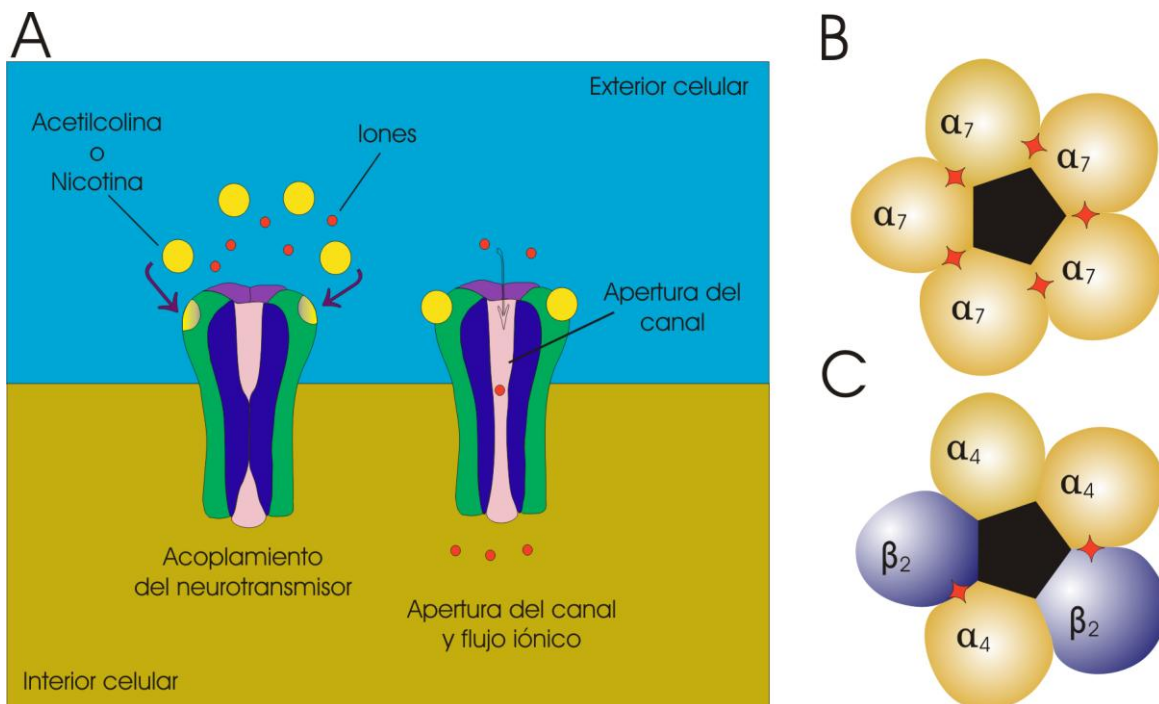


Figura 1. Esquema que representa un receptor nicotínico. El panel A muestra el mecanismo de acción del receptor nicotínico tipo canal ante el acoplamiento de nicotina o de acetilcolina. En el panel B se muestra un esquema de un receptor nicotínico homopentamérico ($\alpha 7$), con cinco sitios de unión para acetilcolina o nicotina. En el panel C se ilustra un receptor heteropentamérico ($\alpha 4\beta 2$), con dos sitios de unión. Las estrellas señalan los sitios de unión.

Las principales regiones de distribución de este receptor se encuentran en la corteza, el estriado y el hipocampo, además de la retina y los ganglios cervicales superiores [26, 44, 62]. El subtipo $\alpha 6$ y $\beta 3$ están presentes en el locus ceruleus y en las neuronas dopaminérgicas de la vía mesoestriatal, donde regulan la liberación de dopamina. El subtipo $\alpha 7$ se localiza principalmente en el hipocampo, hipotálamo, corteza y en algunos núcleos motores (Tabla I).

Tabla I. Distribución de subtipos de nAChRs en el cerebro

ÁREA CEREBRAL	SUBUNIDADES
Corteza cerebral	$\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$
Hipocampo	$\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$
Cuerpo Estriado	$\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 6\beta 2$, $\alpha 4\alpha 6$
Núcleo del rafe dorsal	$\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$
Hábenula	$\alpha 3\beta 4$
Locus coeruleus	$\alpha 3\beta 4$
Cerebelo	$\alpha 3\beta 4$
Núcleo acumbens	$\alpha 4\beta 2$, $\alpha 6\beta 2$
Núcleo interpeduncular	$\alpha 3\beta 4$
Hipotálamo	$\alpha 7$
Septum	$\alpha 7$
Substancia negra	$\alpha 4\beta 2$, $\alpha 6\beta 2$
Tracto óptico	$\alpha 3\beta 4$

Mecanismo de interacción de la Nicotina en los desordenes depresivos:

Como se mencionó anteriormente sujetos deprimidos presentan cambios en la actividad tanto en el sistema noradrenérgico como serotoninérgico, así como altos niveles de cortisol plasmático [50], sin embargo las causas de estas alteraciones bioquímicas no son claras.

Actualmente existe evidencia suficiente de que la nicotina es capaz de incrementar la liberación de serotonina (5-HT) en varias regiones del cerebro entre las cuales podemos citar: corteza, hipocampo, estriado, septum lateral, núcleo dorsal del rafe (nRD) y médula

espinal [33, 57, 68, 85]. El efecto fisiológico que tiene la 5-HT liberada por nicotina dependerá del tipo de receptor serotoninérgico que se estimula así como de la región cerebral donde se liberó [20, 52, 75]. Varios estudios han reportado las propiedades antidepresivas de la nicotina tanto en humanos [59, 70] como en modelos animales de depresión [73, 77, 81] e inclusive en ratas normales [82].

Resultados experimentales señalan que existen receptores nicotínicos localizados en la terminal pre-sináptica de las neuronas serotoninérgicas. Por ejemplo, en estudios *in vitro* se ha observado que las neuronas del nRD al ser estimuladas con nicotina (10-300 μ M) disminuyen su frecuencia de disparo pero simultáneamente se incrementa la liberación de 5-HT en el medio [58]. De hecho se ha sugerido que la nicotina actúa sobre las neuronas serotoninérgicas de dos maneras: la primera, utilizando un mecanismo directo de tipo excitatorio y un mecanismo indirecto de naturaleza inhibitoria, ambos mecanismos actúan en las neuronas del nDR y tienen efectos fisiológicos opuestos [45, 58]. Además se ha demostrado que la nicotina actúa sobre receptores tipo 5-HT_{2C} [76] y se ha sugerido que ésta modula la expresión de receptores 5HT_{2C} localizados en ciertas regiones corticales y límbicas envueltas en la etiología de la depresión [40] [55]

De ahí se puede sugerir que uno de los mecanismos antidepresivo de la nicotina sea estimulando la liberación de 5-HT de las terminales pre-sinápticas del nDR tal como lo hacen los antidepresivos tricíclicos como la fluoxetina, uno de los antidepresivos más usados actualmente. Este mecanismo de liberación de 5-HT podría estar mediado no solamente por la acción de la nicotina administrada exógenamente, sino también de manera endógena por la estimulación que proviene de las fibras colinérgicas del núcleo laterodorsal (LDTg) y pedúnculo pontino tegmental (PPT) del tallo cerebral.

Se ha sugerido que la administración de nicotina puede tener influencia positiva en el tratamiento con agentes serotoninérgicos ya que se ha demostrado que nicotina y fluoxetina pueden tener efectos sinérgicos en tratamientos agudos pero no en tratamientos crónicos [81]. Experimentos usando microdialisis *in vivo* han reportado que una sola inyección de fluoxetina induce un paulatino incremento de 5HT extracelular mientras repetida administración incrementa los niveles base de 5HT [42]. En adición, la administración crónica de fluoxetina induce incremento en la desensibilización de receptores 5HT_{2C} [76,

88]. Recientemente se reporto que el efecto antidepresivo de la nicotina es inmediato desde la primera administración. Lo cual no se observa con la administración de fluoxetina ya que el efecto antidepresivo se observa cuando es administrado de manera crónica [81].

Se ha observado que inhibidores de la recaptura de 5HT aumentan la respuesta postsináptica a dopamina (DA) en las terminales del sistema mesolímbico [1, 15] al igual que la nicotina [37, 61], lo que da pie junto con otros hallazgos a sugerir otro mecanismo de acción antidepresivo de la nicotina relacionado con el sistema dopaminérgico. Neuronas dopaminérgicas expresan una gran variedad de subunidades de receptores nicotínicos, los cuales se ha propuesto, regulan la neurotransmisión dopaminérgica en estriado.

Neuronas dopaminérgicas en sustancia negra pars compacta (SNc) y área tegmental ventral (VTA) de roedores expresan mRNAs para las subunidades $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 2$ y $\beta 3$ así como bajos niveles de $\alpha 3$, $\alpha 7$ y $\beta 4$ [4]. Esta diversidad de expresión de subunidades da una gran variedad de pentámeros en regiones somatodendríticas (VTA/SNc) y axón terminales (estriado) y como consecuencia una diversidad de funciones, entre ellas, los efectos de refuerzo o adictivos [32, 51, 79]. Los 2 pares α/β que forman los sitios de unión- ligando en axones dopaminérgicos de estriado se sugiere son principalmente $\alpha 4/\beta 2$ o $\alpha 6/\beta 2$ ($\alpha 3/\beta 2$ en primates) [48, 67]. La quinta subunidad en el pentámero puede consistir de cualquier otra subunidad incluyendo $\alpha 5$ o $\beta 3$. Existen diferencias entre las subunidades presentes en cada región, mientras $\alpha 7$ y $\beta 4$ están presentes en VTA/SNc [18, 67], la subunidad $\alpha 7$ ha sido expresada en estriado por neuronas no dopaminérgicas [5].

Las subunidades $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 2$ y $\beta 3$ (y $\alpha 3$ en primates) son encontradas en alta densidad en terminales axónicas dopaminérgicas, sin embargo, es carente la subunidad $\alpha 3$ en estriado de roedores pero no en primates [18, 67, 87].

Evidencia electrofisiológica muestra que receptores nicotínicos expresados en neuronas que secretan dopamina en VTA pueden ser desensitizados por prolongada exposición a nicotina a dosis comúnmente encontradas en plasma de fumadores [63]. Esta observación es consistente con resultados de estudios de microdialisis *in vivo* que han mostrado que los efectos estimulantes de la inyección de nicotina en la liberación de dopamina en NAc son extinguidos en ratas a las que se les administra nicotina a una tasa que mantiene la concentración de nicotina plasmática en un rango encontrado en fumadores habituales [12].

La administración de antagonistas de receptores nicotínicos a animales crónicamente expuestos a nicotina precipita cambios conductuales en el síndrome de abstinencia de nicotina y decremента el flujo de DA en NAc [36]. Los cambios en el flujo de dopamina han sido interpretados como un correlato neuronal de la anhedonia o disforia experimentada por fumadores cuando intentan dejar este hábito. Epping-Jordan y colaboradores [24] han reportado que la abstinencia de nicotina siguiendo un periodo de administración constante decremента los efectos gratificantes de la auto-estimulación intracraneal. Los resultados implican que siguiendo un periodo de constante exposición a la droga, neuronas DA de mesoacumbens pueden volverse dependientes de la nicotina para mantener sus niveles normales de actividad [5].

Estos datos soportan la hipótesis de que reducciones en la concentración de nicotina plasmática siguiendo un periodo de exposición crónica pueden provocar un estado anhedónico que el fumador trata de evitar por lo que continúa fumando.

Nicotina y Regulación del Sueño

En la actualidad existe una gran cantidad de evidencia que demuestra que la nicotina y los nAChRs tienen una participación muy importante en la regulación del ciclo vigilia-sueño. Una manera de definir el sueño de forma simple es decir que es un estado conductual reversible, de disociación perceptual y de baja respuesta hacia los estímulos ambientales. El sueño está dividido en dos etapas: el sueño de ondas lentas (SOL) y el sueño de movimientos oculares rápidos (MOR). El patrón del SOL en humanos se constituye de cuatro periodos (1-4), siendo los últimos dos los estados más profundos del sueño. A nivel del registro electroencefalográfico (EEG) el SOL se caracteriza por presentar una actividad eléctrica cerebral sincrónica, con dominancia de ondas lentas de baja frecuencia (0.5-2.0 Hz) y alto voltaje ($>200 \mu\text{V}$). Aparecen ondas denominadas complejo K, que son ondas de alto voltaje $>100 \mu\text{V}$ y de 0.5 s de duración, se presentan durante el estado 2 del SOL y también aparece en respuesta a un estímulo auditivo. En contraste la etapa de sueño MOR se caracteriza por la presencia una actividad desincronizada en el registro de EEG muy parecida a la que ocurre en la vigilia, las frecuencias son rápidas y de alto voltaje, una característica de esta etapa en la presencia de atonía muscular y los movimientos oculares

rápidos. En gatos la actividad cortical durante el MOR es tipificada por descargas del núcleo ponto-geniculo-occipital u ondas ponto-geniculo-occipitales (PGO), las cuales están acompañadas principalmente por movimientos rápidos de los ojos, contracciones rápidas de los músculos dístales y actividad del músculo medio de la oreja. La actividad mental y los movimientos rápidos de los ojos en el sueño MOR en humanos está asociada con las ensoñaciones.

Por otra parte, se ha demostrado que la administración subcutánea, intravenosa o por microinyección directa en la formación reticular pontina (mPRF) de nicotina incrementa el sueño MOR en gatos [84]. En contraste, la administración transdermal de nicotina en sujetos normales no fumadores produce también un aumento en el tiempo total de sueño MOR, sin embargo el efecto es dependiente de la dosis administrada. [27]. Además, se ha demostrado que en gatos las ondas PGO se suprimen por la administración transdermal de nicotina en dosis de 17.5, 35 y 52.5 mg; existiendo efectos menores en el sueño y un incremento general en la vigilia [83]. También se ha reportado que existe un incremento en el tiempo de sueño MOR después de la aplicación transdermal de 17.5 mg de nicotina cada 24 horas [70]. Resultados similares han sido obtenidos utilizando la misma dosis de nicotina cuando es administrada por largos periodos de tiempo (seis meses) en pacientes que presentaban depresión mayor [35].

Estudios realizados en ratas han revelado que cuando se administra nicotina subcutánea (0.1 mg/kg) se incrementa en un 362.61% la frecuencia de descarga de las neuronas serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe (NDR) durante el periodo de MOR sin afectar al SOL o a la vigilia. Estos resultados sugieren en conjunto que la nicotina induce la supresión de las ondas PGO durante la etapa de sueño MOR aumentando la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR [33]. Este efecto quizás es debido a la inhibición provocada por las neuronas serotoninérgicas del NDR sobre las neuronas colinérgicas del núcleo pedúnculo-pontino (PPT) y laterodorsal-tegmental (LDT), las cuales son las generadoras en parte por las ondas PGO. Para poder probar esta hipótesis, se han diseñado experimentos con cortes cerebrales *in vitro*. En estos experimentos se administró nicotina (2mM) en cortes de NDR y se observó que la nicotina incrementa la frecuencia de disparo de las neuronas del NDR en un 81.1%, además de incrementar la liberación de serotonina, simultáneamente, disminuyó en un 80.8% la frecuencia de disparo de las neuronas del LDT y un 81.8% en las

neuronas del PPT. La inhibición de las neuronas del LDT fue bloqueada por la administración de WAY-100635 (140 nm), el cual es un antagonista del receptor de serotonina 5HT_{1A}. Estos resultados indican que la nicotina inhibe la actividad de las neuronas en el LDT y PPT y por consecuencia la supresión de las ondas PGO mediante la activación de neuronas serotoninérgicas en el NDR [57] (Fig. 2).

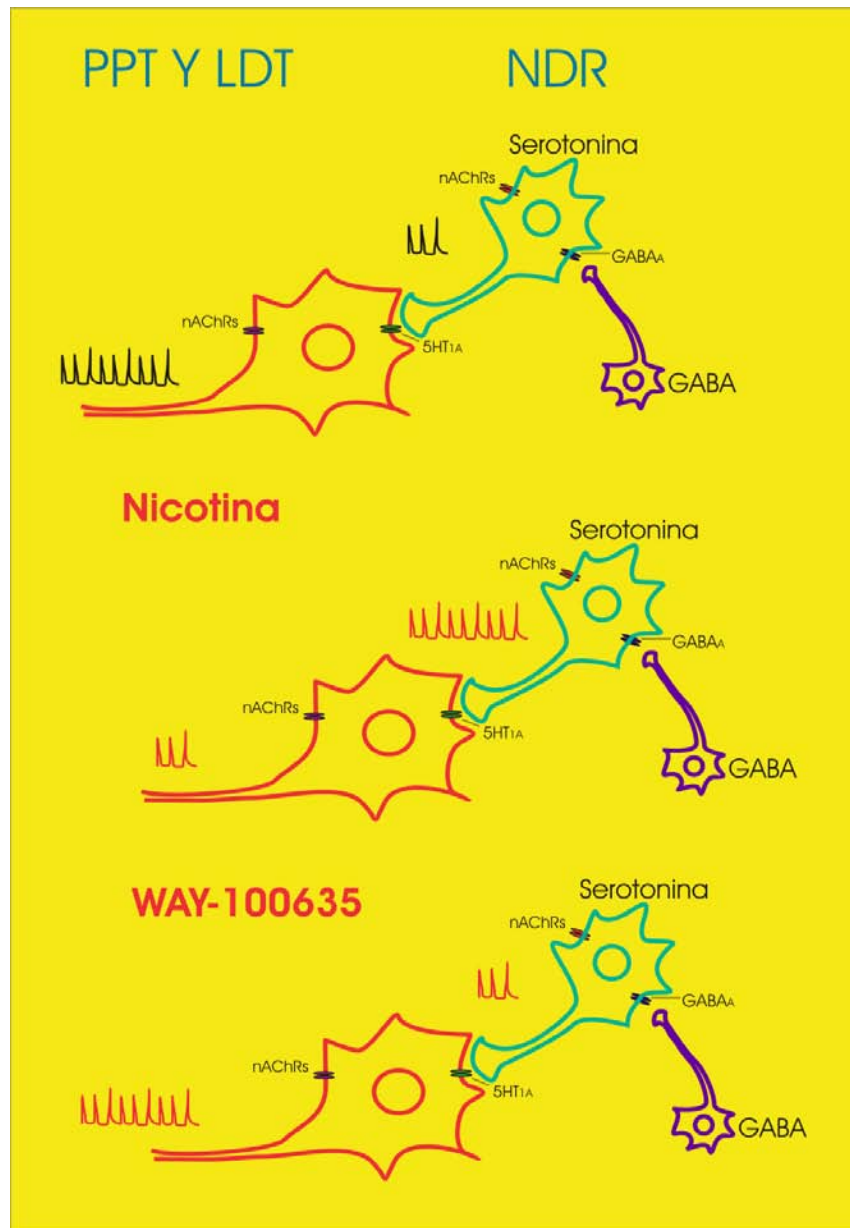


Figura 2. Inhibición de neuronas en el LTD Y PPT por nicotina, la nicotina además incrementa el rango de disparo de neuronas serotoninérgicas en el NDR. La inhibición de las neuronas en el LTD y PPT fue eliminada cuando se añade WAY-100635 un antagonista del receptor 5HT_{1A}.

Por otra parte, se ha reportado que sujetos fumadores en abstinencia pueden llegar a deprimirse y presentar una latencia corta a la aparición del primero periodo de sueño MOR [59, 70], signo característico de un paciente con depresión. Se ha reportado que la administración transdermal crónica de nicotina (mayor a un mes) y la administración oral de fluoxetina en pacientes no fumadores y con trastornos depresivos mejora su estado de animo según la Escala de Hamilton [34]; la evaluación de los registros de sueño en estos pacientes mostró que la administración de nicotina disminuye la vigilia y la etapa 1 de SOL e incrementa la latencia al primer periodo de MOR, mientras que la administración de fluoxetina induce el efecto opuesto sobre la vigilia y la etapa 1 del sueño lento, sin embargo la latencia al primer periodo de sueño MOR se mantiene alargada [78]. Estas discrepancias observadas entre las etapas del ciclo de sueño después del tratamiento con ambas sustancias sugieren la existencia de mecanismos de acción independientes pero que al final convergen con un mismo efecto, en este caso sobre su naturaleza antidepresiva [49].

Estos resultados podrían ser explicados en términos de que la nicotina pueda estar actuando sobre el sistema dopaminérgico directamente y de manera indirecta sobre el sistema serotoninérgico [35] además soportan los posibles efectos terapéuticos de la administración de nicotina en forma transdermal sobre la calidad del sueño y la mejora en el humor.

Referencias

- [1] K. Ainsworth, S.E. Smith, T.S. Zetterstrom, Q. Pei, M. Franklin, T. Sharp, Effect of antidepressant drugs on dopamine D1 and D2 receptor expression and dopamine release in the nucleus accumbens of the rat. *Psychopharmacology (Berl)*. 140 (1998) 470-477.
- [2] H. Araki, K. Suemaru, Y. Gomita, Neuronal nicotinic receptor and psychiatric disorders: functional and behavioral effects of nicotine. *Jpn J Pharmacol*. 88 (2002) 133-138.
- [3] A.K. Armitage, C.T. Dollery, C.F. George, T.H. Houseman, P.J. Lewis, D.M. Turner, Absorption and metabolism of nicotine from cigarettes. *Br Med J*. 4 (1975) 313-316.
- [4] L. Azam, U.H. Winzer-Serhan, Y. Chen, F.M. Leslie, Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within midbrain dopamine neurons. *J Comp Neurol*. 444 (2002) 260-274.
- [5] D.J. Balfour, D.L. Ridley, The effects of nicotine on neural pathways implicated in depression: a factor in nicotine addiction? *Pharmacol Biochem Behav*. 66 (2000) 79-85.
- [6] N.L. Benowitz, Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 36 (1996) 597-613.
- [7] N.L. Benowitz, Clinical pharmacology of inhaled drugs of abuse: implications in understanding nicotine dependence. *NIDA Res Monogr*. 99 (1990) 12-29.
- [8] N.L. Benowitz, S.G. Gourlay, Cardiovascular toxicity of nicotine: implications for nicotine replacement therapy. *J Am Coll Cardiol*. 29 (1997) 1422-1431.
- [9] N.L. Benowitz, P. Jacob, 3rd, Trans-3'-hydroxycotinine: disposition kinetics, effects and plasma levels during cigarette smoking. *Br J Clin Pharmacol*. 51 (2001) 53-59.
- [10] N.L. Benowitz, P. Jacob, 3rd, Metabolism of nicotine to cotinine studied by a dual stable isotope method. *Clin Pharmacol Ther*. 56 (1994) 483-493.
- [11] N.L. Benowitz, P. Jacob, 3rd, R.T. Jones, J. Rosenberg, Interindividual variability in the metabolism and cardiovascular effects of nicotine in man. *J Pharmacol Exp Ther*. 221 (1982) 368-372.
- [12] M.E. Benwell, D.J. Balfour, C.E. Birrell, Desensitization of the nicotine-induced mesolimbic dopamine responses during constant infusion with nicotine. *Br J Pharmacol*. 114 (1995) 454-460.
- [13] N.I. Boyadjieva, D.K. Sarkar, The secretory response of hypothalamic beta-endorphin neurons to acute and chronic nicotine treatments and following nicotine withdrawal. *Life Sci*. 61 (1997) PL59-66.
- [14] N. Breslau, E.L. Peterson, L.R. Schultz, H.D. Chilcoat, P. Andreski, Major depression and stages of smoking. A longitudinal investigation. *Arch Gen Psychiatry*. 55 (1998) 161-166.
- [15] M. Collu, A.S. Poggiu, P. Devoto, G. Serra, Behavioural sensitization of mesolimbic dopamine D2 receptors in chronic fluoxetine-treated rats. *Eur J Pharmacol*. 322 (1997) 123-127.
- [16] L.S. Covey, Tobacco cessation among patients with depression. *Prim Care*. 26 (1999) 691-706.
- [17] L.S. Covey, A.H. Glassman, F. Stetner, Major depression following smoking cessation. *Am J Psychiatry*. 154 (1997) 263-265.
- [18] N. Champtiaux, C. Gotti, M. Cordero-Erausquin, D.J. David, C. Przybylski, C. Lena, F. Clementi, M. Moretti, F.M. Rossi, N. Le Novere, J.M.

-
- McIntosh, A.M. Gardier, J.P. Changeux, Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *J Neurosci.* 23 (2003) 7820-7829.
- [19] J.P. Changeux, D. Bertrand, P.J. Corringer, S. Dehaene, S. Edelman, C. Lena, N. Le Novère, L. Marubio, M. Picciotto, M. Zoli, Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement. *Brain Res Brain Res Rev.* 26 (1998) 198-216.
- [20] S. Cheeta, E.E. Irvine, S. Tucci, J. Sandhu, S.E. File, In adolescence, female rats are more sensitive to the anxiolytic effect of nicotine than are male rats. *Neuropsychopharmacology.* 25 (2001) 601-607.
- [21] D.A. Dempsey, N.L. Benowitz, Risks and benefits of nicotine to aid smoking cessation in pregnancy. *Drug Saf.* 24 (2001) 277-322.
- [22] C. Derauf, A.R. Katz, D. Easa, Agreement between maternal self-reported ethanol intake and tobacco use during pregnancy and meconium assays for fatty acid ethyl esters and cotinine. *Am J Epidemiol.* 158 (2003) 705-709.
- [23] V.J. Djuric, E. Dunn, D.H. Overstreet, A. Dragomir, M. Steiner, Antidepressant effect of ingested nicotine in female rats of Flinders resistant and sensitive lines. *Physiol Behav.* 67 (1999) 533-537.
- [24] M.P. Epping-Jordan, S.S. Watkins, G.F. Koob, A. Markou, Dramatic decreases in brain reward function during nicotine withdrawal. *Nature.* 393 (1998) 76-79.
- [25] S.M. Ferguson, J.D. Brodtkin, G.K. Lloyd, F. Menzaghi, Antidepressant-like effects of the subtype-selective nicotinic acetylcholine receptor agonist, SIB-1508Y, in the learned helplessness rat model of depression. *Psychopharmacology (Berl).* 152 (2000) 295-303.
- [26] M. Ferreira, S.N. Ebert, D.C. Perry, R.P. Yasuda, C.M. Baker, M.I. Davila-Garcia, K.J. Kellar, R.A. Gillis, Evidence of a functional $\alpha 7$ -neuronal nicotinic receptor subtype located on motoneurons of the dorsal motor nucleus of the vagus. *J Pharmacol Exp Ther.* 296 (2001) 260-269.
- [27] J.C. Gillin, M. Lardon, C. Ruiz, S. Golshan, R. Salin-Pascual, Dose-dependent effects of transdermal nicotine on early morning awakening and rapid eye movement sleep time in nonsmoking normal volunteers. *J Clin Psychopharmacol.* 14 (1994) 264-267.
- [28] A.H. Glassman, J.E. Helzer, L.S. Covey, L.B. Cottler, F. Stetner, J.E. Tipp, J. Johnson, Smoking, smoking cessation, and major depression. *JAMA.* 264 (1990) 1546-1549.
- [29] A.V. Gore, Y.W. Chien, The nicotine transdermal system. *Clin Dermatol.* 16 (1998) 599-615.
- [30] G.B. Gori, C.J. Lynch, Analytical cigarette yields as predictors of smoke bioavailability. *Regul Toxicol Pharmacol.* 5 (1985) 314-326.
- [31] S.G. Gourlay, N.L. Benowitz, A. Forbes, J.J. McNeil, Determinants of plasma concentrations of nicotine and cotinine during cigarette smoking and transdermal nicotine treatment. *Eur J Clin Pharmacol.* 51 (1997) 407-414.
- [32] J. Grenhoff, G. Aston-Jones, T.H. Svensson, Nicotinic effects on the firing pattern of midbrain dopamine neurons. *Acta Physiol Scand.* 128 (1986) 351-358.
- [33] R. Guzman-Marin, M.N. Alam, S. Mihailescu, R. Szymusiak, D. McGinty, R. Drucker-Colin, Subcutaneous administration of nicotine changes dorsal raphe serotonergic neurons discharge rate during REM sleep. *Brain Res.* 888 (2001) 321-325.
- [34] R. Haro, R. Drucker-Colin, A two-year study on the effects of nicotine and
-

-
- its withdrawal on mood and sleep. *Pharmacopsychiatry*. 37 (2004) 221-227.
- [35] R. Haro, R. Drucker-Colin, Effects of long-term administration of nicotine and fluoxetine on sleep in depressed patients. *Arch Med Res*. 35 (2004) 499-506.
- [36] B.E. Hildebrand, G.G. Nomikos, P. Hertel, B. Schilstrom, T.H. Svensson, Reduced dopamine output in the nucleus accumbens but not in the medial prefrontal cortex in rats displaying a mecamylamine-precipitated nicotine withdrawal syndrome. *Brain Res*. 779 (1998) 214-225.
- [37] A. Imperato, A. Mulas, G. Di Chiara, Nicotine preferentially stimulates dopamine release in the limbic system of freely moving rats. *Eur J Pharmacol*. 132 (1986) 337-338.
- [38] C.J. Johansson, P. Olsson, M. Bende, T. Carlsson, P.O. Gunnarsson, Absolute bioavailability of nicotine applied to different nasal regions. *Eur J Clin Pharmacol*. 41 (1991) 585-588.
- [39] P.W. Kalivas, L. Churchill, M.A. Klitenick, GABA and enkephalin projection from the nucleus accumbens and ventral pallidum to the ventral tegmental area. *Neuroscience*. 57 (1993) 1047-1060.
- [40] S.H. Kennedy, K.R. Evans, S. Kruger, H.S. Mayberg, J.H. Meyer, S. McCann, A.I. Arifuzzman, S. Houle, F.J. Vaccarino, Changes in regional brain glucose metabolism measured with positron emission tomography after paroxetine treatment of major depression. *Am J Psychiatry*. 158 (2001) 899-905.
- [41] P. Kintz, A. Henrich, V. Cirimele, B. Ludes, Nicotine monitoring in sweat with a sweat patch. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 705 (1998) 357-361.
- [42] D.S. Kreiss, I. Lucki, Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine measured in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*. 274 (1995) 866-876.
- [43] E.M. Lee, J.L. Malson, E.T. Moolchan, W.B. Pickworth, Quantitative comparisons between a nicotine delivery device (Eclipse) and conventional cigarette smoking. *Nicotine Tob Res*. 6 (2004) 95-102.
- [44] C. Lena, A. de Kerchove D'Exaerde, M. Cordero-Erausquin, N. Le Novere, M. del Mar Arroyo-Jimenez, J.P. Changeux, Diversity and distribution of nicotinic acetylcholine receptors in the locus ceruleus neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96 (1999) 12126-12131.
- [45] X. Li, D.G. Rainnie, R.W. McCarley, R.W. Greene, Presynaptic nicotinic receptors facilitate monoaminergic transmission. *J Neurosci*. 18 (1998) 1904-1912.
- [46] G. Lindell, E. Lunell, H. Graffner, Transdermally administered nicotine accumulates in gastric juice. *Eur J Clin Pharmacol*. 51 (1996) 315-318.
- [47] J.M. Lindstrom, Acetylcholine receptors and myasthenia. *Muscle Nerve*. 23 (2000) 453-477.
- [48] C.W. Luetje, Getting past the asterisk: the subunit composition of presynaptic nicotinic receptors that modulate striatal dopamine release. *Mol Pharmacol*. 65 (2004) 1333-1335.
- [49] E. Lunell, L. Molander, K. Ekberg, J. Wahren, Site of nicotine absorption from a vapour inhaler--comparison with cigarette smoking. *Eur J Clin Pharmacol*. 55 (2000) 737-741.
- [50] M. Maes, H.Y. Meltzer, P. D'Hondt, P. Cosyns, P. Blockx, Effects of serotonin precursors on the negative feedback effects of glucocorticoids on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in depression. *Psychoneuroendocrinology*. 20 (1995) 149-167.
- [51] M. Mameli-Engvall, A. Evrard, S. Pons, U. Maskos, T.H. Svensson, J.P.
-

-
- Changeux, P. Faure, Hierarchical control of dopamine neuron-firing patterns by nicotinic receptors. *Neuron*. 50 (2006) 911-921.
- [52] C. Mannucci, M. Tedesco, M. Bellomo, A.P. Caputi, G. Calapai, Long-term effects of nicotine on the forced swimming test in mice: an experimental model for the study of depression caused by smoke. *Neurochem Int*. 49 (2006) 481-486.
- [53] A. Markou, T.R. Kosten, G.F. Koob, Neurobiological similarities in depression and drug dependence: a self-medication hypothesis. *Neuropsychopharmacology*. 18 (1998) 135-174.
- [54] D. Martinez-Gonzalez, O. Prospero-Garcia, S. Mihailescu, R. Drucker-Colin, Effects of nicotine on alcohol intake in a rat model of depression. *Pharmacol Biochem Behav*. 72 (2002) 355-364.
- [55] H.S. Mayberg, S.K. Brannan, J.L. Tekell, J.A. Silva, R.K. Mahurin, S. McGinnis, P.A. Jerabek, Regional metabolic effects of fluoxetine in major depression: serial changes and relationship to clinical response. *Biol Psychiatry*. 48 (2000) 830-843.
- [56] D.S. McGehee, M.J. Heath, S. Gelber, P. Devay, L.W. Role, Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science*. 269 (1995) 1692-1696.
- [57] S. Mihailescu, R. Guzman-Marin, R. Drucker-Colin, Nicotine stimulation of dorsal raphe neurons: effects on laterodorsal and pedunculopontine neurons. *Eur Neuropsychopharmacol*. 11 (2001) 359-366.
- [58] S. Mihailescu, M. Palomero-Rivero, P. Meade-Huerta, A. Maza-Flores, R. Drucker-Colin, Effects of nicotine and mecamylamine on rat dorsal raphe neurons. *Eur J Pharmacol*. 360 (1998) 31-36.
- [59] A. Moreno-Coutino, C. Calderon-Ezquerro, R. Drucker-Colin, Long-term changes in sleep and depressive symptoms of smokers in abstinence. *Nicotine Tob Res*. 9 (2007) 389-396.
- [60] M. Noda, H. Takahashi, T. Tanabe, M. Toyosato, S. Kikyotani, T. Hirose, M. Asai, H. Takashima, S. Inayama, T. Miyata, S. Numa, Primary structures of beta- and delta-subunit precursors of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences. *Nature*. 301 (1983) 251-255.
- [61] G.G. Nomikos, G. Damsma, D. Wenkstern, H.C. Fibiger, Chronic desipramine enhances amphetamine-induced increases in interstitial concentrations of dopamine in the nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol*. 195 (1991) 63-73.
- [62] D.C. Perry, Y. Xiao, H.N. Nguyen, J.L. Musachio, M.I. Davila-Garcia, K.J. Kellar, Measuring nicotinic receptors with characteristics of alpha4beta2, alpha3beta2 and alpha3beta4 subtypes in rat tissues by autoradiography. *J Neurochem*. 82 (2002) 468-481.
- [63] V.I. Pidoplichko, M. DeBiasi, J.T. Williams, J.A. Dani, Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature*. 390 (1997) 401-404.
- [64] K. Pierzchala, A.A. Houdi, G.R. Van Loon, Nicotine-induced alterations in brain regional concentrations of native and cryptic Met- and Leu-enkephalin. *Peptides*. 8 (1987) 1035-1043.
- [65] F.E. Pontieri, F. Passarelli, L. Calo, B. Caronti, Functional correlates of nicotine administration: similarity with drugs of abuse. *J Mol Med*. 76 (1998) 193-201.
- [66] F.E. Pontieri, G. Tanda, F. Orzi, G. Di Chiara, Effects of nicotine on the
-

nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nature*. 382 (1996) 255-257.

[67] M. Quik, S. Vailati, T. Bordia, J.M. Kulak, H. Fan, J.M. McIntosh, F. Clementi, C. Gotti, Subunit composition of nicotinic receptors in monkey striatum: effect of treatments with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine or L-DOPA. *Mol Pharmacol*. 67 (2005) 32-41.

[68] E.B. Ribeiro, R.L. Bettiker, M. Bogdanov, R.J. Wurtman, Effects of systemic nicotine on serotonin release in rat brain. *Brain Res*. 621 (1993) 311-318.

[69] J.E. Rose, F.M. Behm, E.C. Westman, R.E. Coleman, Arterial nicotine kinetics during cigarette smoking and intravenous nicotine administration: implications for addiction. *Drug Alcohol Depend*. 56 (1999) 99-107.

[70] R.J. Salin-Pascual, J.R. de la Fuente, L. Galicia-Polo, R. Drucker-Colin, Effects of transdermal nicotine on mood and sleep in nonsmoking major depressed patients. *Psychopharmacology (Berl)*. 121 (1995) 476-479.

[71] R.J. Salin-Pascual, R. Drucker-Colin, A novel effect of nicotine on mood and sleep in major depression. *Neuroreport*. 9 (1998) 57-60.

[72] R.J. Salin-Pascual, M. Rosas, A. Jimenez-Genchi, B.L. Rivera-Meza, V. Delgado-Parra, Antidepressant effect of transdermal nicotine patches in nonsmoking patients with major depression. *J Clin Psychiatry*. 57 (1996) 387-389.

[73] J. Semba, C. Mataka, S. Yamada, M. Nankai, M. Toru, Antidepressantlike effects of chronic nicotine on learned helplessness paradigm in rats. *Biol Psychiatry*. 43 (1998) 389-391.

[74] S. Shiffman, J.R. Hughes, M.E. Di Marino, C.T. Sweeney, Patterns of over-the-counter nicotine gum use: persistent use and concurrent smoking. *Addiction*. 98 (2003) 1747-1753.

[75] T.A. Slotkin, C.A. Tate, M.M. Cousins, F.J. Seidler, Prenatal nicotine exposure alters the responses to subsequent nicotine administration and withdrawal in adolescence: Serotonin receptors and cell signaling. *Neuropsychopharmacology*. 31 (2006) 2462-2475.

[76] K. Suemaru, H. Araki, Y. Kitamura, K. Yasuda, Y. Gomita, Cessation of chronic nicotine administration enhances wet-dog shake responses to 5-HT₂ receptor stimulation in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 159 (2001) 38-41.

[77] Y. Tizabi, D.H. Overstreet, A.H. Rezvani, V.A. Louis, E. Clark, Jr., D.S. Janowsky, M.A. Kling, Antidepressant effects of nicotine in an animal model of depression. *Psychopharmacology (Berl)*. 142 (1999) 193-199.

[78] M.H. Trivedi, A.J. Rush, R. Armitage, C.M. Gullion, B.D. Grannemann, P.J. Orsulak, H.P. Roffwarg, Effects of fluoxetine on the polysomnogram in outpatients with major depression. *Neuropsychopharmacology*. 20 (1999) 447-459.

[79] M.A. Ungless, S.J. Cragg, A choreography of nicotinic receptors directs the dopamine neuron routine. *Neuron*. 50 (2006) 815-816.

[80] N. Urakawa, T. Nagata, K. Kudo, K. Kimura, T. Imamura, Simultaneous determination of nicotine and cotinine in various human tissues using capillary gas chromatography/mass spectrometry. *Int J Legal Med*. 106 (1994) 232-236.

[81] G. Vazquez-Palacios, H. Bonilla-Jaime, J. Velazquez-Moctezuma, Antidepressant effects of nicotine and fluoxetine in an animal model of depression induced by neonatal treatment with clomipramine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 29 (2005) 39-46.

-
- [82] G. Vazquez-Palacios, H. Bonilla-Jaime, J. Velazquez-Moctezuma, Antidepressant-like effects of the acute and chronic administration of nicotine in the rat forced swimming test and its interaction with fluoxetine [correction of flouxetine]. *Pharmacol Biochem Behav.* 78 (2004) 165-169.
- [83] J. Vazquez, R. Guzman-Marin, R.J. Salin-Pascual, R. Drucker-Colin, Transdermal nicotine on sleep and PGO spikes. *Brain Res.* 737 (1996) 317-320.
- [84] J. Velazquez-Moctezuma, M.D. Shalauta, J.C. Gillin, P.J. Shiromani, Microinjections of nicotine in the medial pontine reticular formation elicits REM sleep. *Neurosci Lett.* 115 (1990) 265-268.
- [85] T.C. Westfall, H. Grant, H. Perry, Release of dopamine and 5-hydroxytryptamine from rat striatal slices following activation of nicotinic cholinergic receptors. *Gen Pharmacol.* 14 (1983) 321-325.
- [86] M.L. Wong, J. Licinio, Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci.* 2 (2001) 343-351.
- [87] S. Wonnacott, S. Kaiser, A. Mogg, L. Soliakov, I.W. Jones, Presynaptic nicotinic receptors modulating dopamine release in the rat striatum. *Eur J Pharmacol.* 393 (2000) 51-58.
- [88] K. Yasuda, K. Suemaru, H. Araki, Y. Gomita, Effect of nicotine cessation on the central serotonergic systems in mice: involvement of 5-HT(2) receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 366 (2002) 276-281.

REFERENCIAS

- [1] American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders American Psychiatric Press. 4^a edition (1994).
- [2] W. Adriani, G. Laviola, Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. *Behav Pharmacol.* 15 (2004) 341-352.
- [3] W. Adriani, S. Macri, R. Pacifici, G. Laviola, Peculiar vulnerability to nicotine oral self-administration in mice during early adolescence. *Neuropsychopharmacology.* 27 (2002) 212-224.
- [4] K. Ainsworth, S.E. Smith, T.S. Zetterstrom, Q. Pei, M. Franklin, T. Sharp, Effect of antidepressant drugs on dopamine D1 and D2 receptor expression and dopamine release in the nucleus accumbens of the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 140 (1998) 470-477.
- [5] J. Angst, F. Angst, H.H. Stassen, Suicide risk in patients with major depressive disorder. *J Clin Psychiatry.* 60 Suppl 2 (1999) 57-62; discussion 75-56, 113-116.
- [6] H. Araki, K. Suemaru, Y. Gomita, Neuronal nicotinic receptor and psychiatric disorders: functional and behavioral effects of nicotine. *Jpn J Pharmacol.* 88 (2002) 133-138.
- [7] L. Arborelius, M.J. Owens, P.M. Plotsky, C.B. Nemeroff, The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol.* 160 (1999) 1-12.
- [8] A. Armario, A. Gavaldà, J. Martí, Comparison of the behavioural and endocrine response to forced swimming stress in five inbred strains of rats. *Psychoneuroendocrinology.* 20 (1995) 879-890.
- [9] R.C. Arora, H.Y. Meltzer, Increased serotonin₂ (5-HT₂) receptor binding as measured by 3H-lysergic acid diethylamide (3H-LSD) in the blood platelets of depressed patients. *Life Sci.* 44 (1989) 725-734.
- [10] L. Azam, U.H. Winzer-Serhan, Y. Chen, F.M. Leslie, Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within midbrain dopamine neurons. *J Comp Neurol.* 444 (2002) 260-274.
- [11] D.J. Balfour, D.L. Ridley, The effects of nicotine on neural pathways implicated in depression: a factor in nicotine addiction? *Pharmacol Biochem Behav.* 66 (2000) 79-85.
- [12] R.H. Belmaker, N. Grisaru, Magnetic stimulation of the brain in animal depression models responsive to ECS. *J ECT.* 14 (1998) 194-205.
- [13] D. Ben-Shachar, R.H. Belmaker, N. Grisaru, E. Klein, Transcranial magnetic stimulation induces alterations in brain monoamines. *J Neural Transm.* 104 (1997) 191-197.
- [14] N.L. Benowitz, Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 36 (1996) 597-613.
- [15] N.L. Benowitz, Clinical pharmacology of inhaled drugs of abuse: implications in understanding nicotine dependence. *NIDA Res Monogr.* 99 (1990) 12-29.
- [16] N.L. Benowitz, P. Jacob, 3rd, R.T. Jones, J. Rosenberg, Interindividual variability in the metabolism and cardiovascular effects of nicotine in man. *J Pharmacol Exp Ther.* 221 (1982) 368-372.
- [17] M.E. Benwell, D.J. Balfour, Effects of nicotine administration and its withdrawal on plasma corticosterone and brain 5-hydroxyindoles. *Psychopharmacology (Berl).* 63 (1979) 7-11.

-
- [18] M.E. Benwell, D.J. Balfour, C.E. Birrell, Desensitization of the nicotine-induced mesolimbic dopamine responses during constant infusion with nicotine. *Br J Pharmacol.* 114 (1995) 454-460.
- [19] F. Bojsen-Moller, Demonstration of terminalis, olfactory, trigeminal and perivascular nerves in the rat nasal septum. *J Comp Neurol.* 159 (1975) 245-256.
- [20] B. Borrelli, R. Niaura, N.J. Keuthen, M.G. Goldstein, J.D. DePue, C. Murphy, D.B. Abrams, Development of major depressive disorder during smoking-cessation treatment. *J Clin Psychiatry.* 57 (1996) 534-538.
- [21] N.I. Boyadjieva, D.K. Sarkar, The secretory response of hypothalamic beta-endorphin neurons to acute and chronic nicotine treatments and following nicotine withdrawal. *Life Sci.* 61 (1997) PL59-66.
- [22] J.D. Bremner, M. Narayan, E.R. Anderson, L.H. Staib, H.L. Miller, D.S. Charney, Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry.* 157 (2000) 115-118.
- [23] N. Breslau, M. Kilbey, P. Andreski, Nicotine dependence, major depression, and anxiety in young adults. *Arch Gen Psychiatry.* 48 (1991) 1069-1074.
- [24] N. Breslau, E.L. Peterson, Smoking cessation in young adults: age at initiation of cigarette smoking and other suspected influences. *Am J Public Health.* 86 (1996) 214-220.
- [25] N. Breslau, E.L. Peterson, L.R. Schultz, H.D. Chilcoat, P. Andreski, Major depression and stages of smoking. A longitudinal investigation. *Arch Gen Psychiatry.* 55 (1998) 161-166.
- [26] P.C. Brunjes, Lessons from lesions: the effects of olfactory bulbectomy. *Chem. Senses.* 17 (1992) 729-763.
- [27] D.P. Cain, The role of the olfactory bulb in limbic mechanisms. *Psychol Bull.* 81 (1974) 654-671.
- [28] A.J. Cleare, R.M. Murray, V. O'Keane, Do noradrenergic reuptake inhibitors affect serotonergic function in depression? *Psychopharmacology (Berl).* 134 (1997) 406-410.
- [29] M. Collu, A.S. Poggiu, P. Devoto, G. Serra, Behavioural sensitization of mesolimbic dopamine D2 receptors in chronic fluoxetine-treated rats. *Eur J Pharmacol.* 322 (1997) 123-127.
- [30] W.A. Corrigall, K.M. Coen, Nicotine maintains robust self-administration in rats on a limited-access schedule. *Psychopharmacology (Berl).* 99 (1989) 473-478.
- [31] B. Costall, M.E. Kelly, R.J. Naylor, E.S. Onaivi, The actions of nicotine and cocaine in a mouse model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 33 (1989) 197-203.
- [32] L.S. Covey, Tobacco cessation among patients with depression. *Prim Care.* 26 (1999) 691-706.
- [33] L.S. Covey, A.H. Glassman, F. Stetner, Major depression following smoking cessation. *Am J Psychiatry.* 154 (1997) 263-265.
- [34] B.M. Cox, A. Goldstein, W.T. Nelson, Nicotine self-administration in rats. *Br J Pharmacol.* 83 (1984) 49-55.
- [35] B. Cusack, A. Nelson, E. Richelson, Binding of antidepressants to human brain receptors: focus on newer generation compounds. *Psychopharmacology (Berl).* 114 (1994) 559-565.
- [36] N. Champiaux, C. Gotti, M. Cordero-Erausquin, D.J. David, C. Przybylski, C. Lena, F. Clementi, M. Moretti, F.M. Rossi, N. Le Novere, J.M. McIntosh, A.M. Gardier, J.P. Changeux, Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *J Neurosci.* 23 (2003) 7820-7829.
-

-
- [37] J.P. Changeux, D. Bertrand, P.J. Corringer, S. Dehaene, S. Edelstein, C. Lena, N. Le Novere, L. Marubio, M. Picciotto, M. Zoli, Brain nicotinic receptors: structure and regulation, role in learning and reinforcement. *Brain Res Brain Res Rev.* 26 (1998) 198-216.
- [38] F.A. Dajas-Bailador, P.A. Lima, S. Wonnacott, The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor subtype mediates nicotine protection against NMDA excitotoxicity in primary hippocampal cultures through a Ca^{2+} dependent mechanism. *Neuropharmacology.* 39 (2000) 2799-2807.
- [39] P.L. Delgado, D.S. Charney, L.H. Price, H. Landis, G.R. Heninger, Neuroendocrine and behavioral effects of dietary tryptophan restriction in healthy subjects. *Life Sci.* 45 (1989) 2323-2332.
- [40] D.A. Dempsey, N.L. Benowitz, Risks and benefits of nicotine to aid smoking cessation in pregnancy. *Drug Saf.* 24 (2001) 277-322.
- [41] J.R. DiFranza, N.A. Rigotti, A.D. McNeill, J.K. Ockene, J.A. Savageau, D. St Cyr, M. Coleman, Initial symptoms of nicotine dependence in adolescents. *Tob Control.* 9 (2000) 313-319.
- [42] V.J. Djuric, E. Dunn, D.H. Overstreet, A. Dragomir, M. Steiner, Antidepressant effect of ingested nicotine in female rats of Flinders resistant and sensitive lines. *Physiol Behav.* 67 (1999) 533-537.
- [43] R.S. Duman, J. Malberg, S. Nakagawa, Regulation of adult neurogenesis by psychotropic drugs and stress. *J Pharmacol Exp Ther.* 299 (2001) 401-407.
- [44] R.S. Duman, S. Nakagawa, J. Malberg, Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment. *Neuropsychopharmacology.* 25 (2001) 836-844.
- [45] M.P. Epping-Jordan, S.S. Watkins, G.F. Koob, A. Markou, Dramatic decreases in brain reward function during nicotine withdrawal. *Nature.* 393 (1998) 76-79.
- [46] M.M. Faraday, B.M. Elliott, N.E. Grunberg, Adult vs. adolescent rats differ in biobehavioral responses to chronic nicotine administration. *Pharmacol Biochem Behav.* 70 (2001) 475-489.
- [47] M. Fava, K.S. Kendler, Major depressive disorder. *Neuron.* 28 (2000) 335-341.
- [48] S.M. Ferguson, J.D. Brodtkin, G.K. Lloyd, F. Menzaghi, Antidepressant-like effects of the subtype-selective nicotinic acetylcholine receptor agonist, SIB-1508Y, in the learned helplessness rat model of depression. *Psychopharmacology (Berl).* 152 (2000) 295-303.
- [49] C.F. Ferris, K. Shtiegman, J.A. King, Voluntary ethanol consumption in male adolescent hamsters increases testosterone and aggression. *Physiol Behav.* 63 (1998) 739-744.
- [50] A.S. Fleming, J.S. Rosenblatt, Olfactory regulation of maternal behavior in rats. I. Effects of olfactory bulb removal in experienced and inexperienced lactating and cycling females. *J Comp Physiol Psychol.* 86 (1974) 221-232.
- [51] G.L. Gerdeman, J.G. Partridge, C.R. Lupica, D.M. Lovinger, It could be habit forming: drugs of abuse and striatal synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 26 (2003) 184-192.
- [52] W.J. Giardino, R.J. Radek, Effects of imipramine on the nocturnal behavior of bilateral olfactory bulbectomized rats. *Biol Psychiatry.* 29 (1991) 1200-1208.
- [53] A.H. Glassman, J.E. Helzer, L.S. Covey, L.B. Cottler, F. Stetner, J.E. Tipp, J. Johnson, Smoking, smoking cessation, and major depression. *JAMA.* 264 (1990) 1546-1549.
-

-
- [54] S.D. Glick, K.E. Visker, I.M. Maisonneuve, An oral self-administration model of nicotine preference in rats: effects of mecamylamine. *Psychopharmacology (Berl)*. 128 (1996) 426-431.
- [55] S.R. Goldberg, R.D. Spealman, Suppression of behavior by intravenous injections of nicotine or by electric shocks in squirrel monkeys: effects of chlordiazepoxide and mecamylamine. *J Pharmacol Exp Ther*. 224 (1983) 334-340.
- [56] G.B. Gori, C.J. Lynch, Analytical cigarette yields as predictors of smoke bioavailability. *Regul Toxicol Pharmacol*. 5 (1985) 314-326.
- [57] J. Grenhoff, G. Aston-Jones, T.H. Svensson, Nicotinic effects on the firing pattern of midbrain dopamine neurons. *Acta Physiol Scand*. 128 (1986) 351-358.
- [58] N. Grisaru, M. Amir, H. Cohen, Z. Kaplan, Effect of transcranial magnetic stimulation in posttraumatic stress disorder: a preliminary study. *Biol Psychiatry*. 44 (1998) 52-55.
- [59] N.E. Grunberg, D.J. Bowen, S.E. Winders, Effects of nicotine on body weight and food consumption in female rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 90 (1986) 101-105.
- [60] R. Guzman-Marin, M.N. Alam, S. Mihailescu, R. Szymusiak, D. McGinty, R. Drucker-Colin, Subcutaneous administration of nicotine changes dorsal raphe serotonergic neurons discharge rate during REM sleep. *Brain Res*. 888 (2001) 321-325.
- [61] R.D. Hall, F. Macrides, Olfactory bulbectomy impairs the rat's radial-maze behavior. *Physiol Behav*. 30 (1983) 797-803.
- [62] H.M. Hanson, C.A. Ivester, B.R. Morton, Nicotine self-administration in rats. *NIDA Res Monogr*. (1979) 70-90.
- [63] R. Haro, R. Drucker-Colin, A two-year study on the effects of nicotine and its withdrawal on mood and sleep. *Pharmacopsychiatry*. 37 (2004) 221-227.
- [64] C.M. Harris, M.W. Emmett-Oglesby, N.G. Robinson, H. Lal, Withdrawal from chronic nicotine substitutes partially for the interoceptive stimulus produced by pentylentetrazol (PTZ). *Psychopharmacology (Berl)*. 90 (1986) 85-89.
- [65] D.K. Hatsukami, J.R. Hughes, R.W. Pickens, D. Svikis, Tobacco withdrawal symptoms: an experimental analysis. *Psychopharmacology (Berl)*. 84 (1984) 231-236.
- [66] D.W. Hedges, C. Massari, D.L. Salyer, T.D. Lund, J.L. Hellewell, A.C. Johnson, E.D. Lephart, Duration of transcranial magnetic stimulation effects on the neuroendocrine stress response and coping behavior of adult male rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 27 (2003) 633-638.
- [67] G.R. Heninger, P.L. Delgado, D.S. Charney, L.H. Price, G.K. Aghajanian, Tryptophan-deficient diet and amino acid drink deplete plasma tryptophan and induce a relapse of depression in susceptible patients. *J Chem Neuroanat*. 5 (1992) 347-348.
- [68] B.E. Hildebrand, G.G. Nomikos, C. Bondjers, M. Nisell, T.H. Svensson, Behavioral manifestations of the nicotine abstinence syndrome in the rat: peripheral versus central mechanisms. *Psychopharmacology (Berl)*. 129 (1997) 348-356.
- [69] B.E. Hildebrand, G.G. Nomikos, P. Hertel, B. Schilstrom, T.H. Svensson, Reduced dopamine output in the nucleus accumbens but not in the medial prefrontal cortex in rats displaying a mecamylamine-precipitated nicotine withdrawal syndrome. *Brain Res*. 779 (1998) 214-225.
- [70] J.D. Hirsch, Opiate and muscarinic ligand binding in five limbic areas after bilateral olfactory bulbectomy. *Brain Res*. 198 (1980) 271-283.
-

-
- [71] R.E. Hoffman, N.N. Boutros, S. Hu, R.M. Berman, J.H. Krystal, D.S. Charney, Transcranial magnetic stimulation and auditory hallucinations in schizophrenia. *Lancet*. 355 (2000) 1073-1075.
- [72] F. Holsboer, Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *J Affect Disord*. 62 (2001) 77-91.
- [73] A. Imperato, A. Mulas, G. Di Chiara, Nicotine preferentially stimulates dopamine release in the limbic system of freely moving rats. *Eur J Pharmacol*. 132 (1986) 337-338.
- [74] E.T. Iwamoto, E.C. Williamson, Nicotine-induced taste aversion: characterization and preexposure effects in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 21 (1984) 527-532.
- [75] S.M. Jancsar, B.E. Leonard, Changes in neurotransmitter metabolism following olfactory bulbectomy in the rat. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 8 (1984) 263-269.
- [76] P.W. Kalivas, L. Churchill, M.A. Klitenick, GABA and enkephalin projection from the nucleus accumbens and ventral pallidum to the ventral tegmental area. *Neuroscience*. 57 (1993) 1047-1060.
- [77] M.E. Keck, I. Sillaber, K. Ebner, T. Welt, N. Toschi, S.T. Kaehler, N. Singewald, A. Philippu, G.K. Elbel, C.T. Wotjak, F. Holsboer, R. Landgraf, M. Engelmann, Acute transcranial magnetic stimulation of frontal brain regions selectively modulates the release of vasopressin, biogenic amines and amino acids in the rat brain. *Eur J Neurosci*. 12 (2000) 3713-3720.
- [78] J.P. Kelly, B.E. Leonard, An investigation of the antidepressant properties of lofepramine and its desmethylated metabolites in the forced swim and olfactory bulbectomized rat models of depression. *Eur Neuropsychopharmacol*. 9 (1999) 101-105.
- [79] J.P. Kelly, A.S. Wynn, B.E. Leonard, The olfactory bulbectomized rat as a model of depression: an update. *Pharmacol Ther*. 74 (1997) 299-316.
- [80] S.H. Kennedy, K.R. Evans, S. Kruger, H.S. Mayberg, J.H. Meyer, S. McCann, A.I. Arifuzzman, S. Houle, F.J. Vaccarino, Changes in regional brain glucose metabolism measured with positron emission tomography after paroxetine treatment of major depression. *Am J Psychiatry*. 158 (2001) 899-905.
- [81] R.C. Kessler, K.A. McGonagle, S. Zhao, C.B. Nelson, M. Hughes, S. Eshleman, H.U. Wittchen, K.S. Kendler, Lifetime and 12-month prevalence of DSM-III-R psychiatric disorders in the United States. Results from the National Comorbidity Survey. *Arch Gen Psychiatry*. 51 (1994) 8-19.
- [82] D. Klein, T.S. Brown, Exploratory behavior and spontaneous alternation in blind and anosmic rats. *J Comp Physiol Psychol*. 68 (1969) 107-110.
- [83] D.S. Kreiss, I. Lucki, Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine measured in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*. 274 (1995) 866-876.
- [84] K. Larsson, Impaired mating performances in male rats after anosmia induced peripherally or centrally. *Brain Behav Evol*. 4 (1971) 463-471.
- [85] E.M. Lee, J.L. Malson, E.T. Moolchan, W.B. Pickworth, Quantitative comparisons between a nicotine delivery device (Eclipse) and conventional cigarette smoking. *Nicotine Tob Res*. 6 (2004) 95-102.
- [86] Y. Levkovitz, N. Grisaru, M. Segal, Transcranial magnetic stimulation and antidepressive drugs share similar cellular effects in rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology*. 24 (2001) 608-616.
-

-
- [87] X. Li, D.G. Rainnie, R.W. McCarley, R.W. Greene, Presynaptic nicotinic receptors facilitate monoaminergic transmission. *J Neurosci.* 18 (1998) 1904-1912.
- [88] G. Lindell, E. Lunell, H. Graffner, Transdermally administered nicotine accumulates in gastric juice. *Eur J Clin Pharmacol.* 51 (1996) 315-318.
- [89] J. Lindstrom, Neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Ion Channels.* 4 (1996) 377-450.
- [90] J.M. Lindstrom, Acetylcholine receptors and myasthenia. *Muscle Nerve.* 23 (2000) 453-477.
- [91] C.W. Luetje, Getting past the asterisk: the subunit composition of presynaptic nicotinic receptors that modulate striatal dopamine release. *Mol Pharmacol.* 65 (2004) 1333-1335.
- [92] E. Lunell, L. Molander, K. Ekberg, J. Wahren, Site of nicotine absorption from a vapour inhaler--comparison with cigarette smoking. *Eur J Clin Pharmacol.* 55 (2000) 737-741.
- [93] R. Maehler, M. Dadmarz, W.H. Vogel, Determinants of the voluntary consumption of nicotine by rats. *Neuropsychobiology.* 41 (2000) 200-204.
- [94] M. Maes, H.Y. Meltzer, P. D'Hondt, P. Cosyns, P. Blockx, Effects of serotonin precursors on the negative feedback effects of glucocorticoids on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function in depression. *Psychoneuroendocrinology.* 20 (1995) 149-167.
- [95] D.H. Malin, Nicotine dependence: studies with a laboratory model. *Pharmacol Biochem Behav.* 70 (2001) 551-559.
- [96] D.H. Malin, J.R. Lake, V.A. Carter, J.S. Cunningham, K.M. Hebert, D.L. Conrad, O.B. Wilson, The nicotinic antagonist mecamylamine precipitates nicotine abstinence syndrome in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 115 (1994) 180-184.
- [97] D.H. Malin, J.R. Lake, P. Newlin-Maultsby, L.K. Roberts, J.G. Lanier, V.A. Carter, J.S. Cunningham, O.B. Wilson, Rodent model of nicotine abstinence syndrome. *Pharmacol Biochem Behav.* 43 (1992) 779-784.
- [98] D.H. Malin, J.R. Lake, C.K. Schopen, J.W. Kirk, E.E. Sailer, B.A. Lawless, T.P. Upchurch, M. Sheno, N. Rajan, Nicotine abstinence syndrome precipitated by central but not peripheral hexamethonium. *Pharmacol Biochem Behav.* 58 (1997) 695-699.
- [99] M. Mameli-Engvall, A. Evrard, S. Pons, U. Maskos, T.H. Svensson, J.P. Changeux, P. Faure, Hierarchical control of dopamine neuron-firing patterns by nicotinic receptors. *Neuron.* 50 (2006) 911-921.
- [100] H.D. Mansvelder, J.R. Keath, D.S. McGehee, Synaptic mechanisms underlie nicotine-induced excitability of brain reward areas. *Neuron.* 33 (2002) 905-919.
- [101] A. Mar, E. Spreekmeester, J. Rochford, Antidepressants preferentially enhance habituation to novelty in the olfactory bulbectomized rat. *Psychopharmacology (Berl).* 150 (2000) 52-60.
- [102] A. Markou, T.R. Kosten, G.F. Koob, Neurobiological similarities in depression and drug dependence: a self-medication hypothesis. *Neuropsychopharmacology.* 18 (1998) 135-174.
- [103] D. Martinez-Gonzalez, O. Prospero-Garcia, S. Mihailescu, R. Drucker-Colin, Effects of nicotine on alcohol intake in a rat model of depression. *Pharmacol Biochem Behav.* 72 (2002) 355-364.
- [104] H.S. Mayberg, S.K. Brannan, J.L. Tekell, J.A. Silva, R.K. Mahurin, S. McGinnis, P.A. Jerabek, Regional metabolic effects of fluoxetine in major depression: serial changes and relationship to clinical response. *Biol Psychiatry.* 48 (2000) 830-843.
-

-
- [105] D.S. McGehee, M.J. Heath, S. Gelber, P. Devay, L.W. Role, Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science*. 269 (1995) 1692-1696.
- [106] L.R. Meyerson, L.P. Wennogle, M.S. Abel, J. Coupet, A.S. Lippa, C.E. Rauh, B. Beer, Human brain receptor alterations in suicide victims. *Pharmacol Biochem Behav*. 17 (1982) 159-163.
- [107] S. Mihailescu, R. Guzman-Marin, C. Dominguez Mdel, R. Drucker-Colin, Mechanisms of nicotine actions on dorsal raphe serotonergic neurons. *Eur J Pharmacol*. 452 (2002) 77-82.
- [108] S. Mihailescu, R. Guzman-Marin, R. Drucker-Colin, Nicotine stimulation of dorsal raphe neurons: effects on laterodorsal and pedunculopontine neurons. *Eur Neuropsychopharmacol*. 11 (2001) 359-366.
- [109] S. Mihailescu, M. Palomero-Rivero, P. Meade-Huerta, A. Maza-Flores, R. Drucker-Colin, Effects of nicotine and mecamylamine on rat dorsal raphe neurons. *Eur J Pharmacol*. 360 (1998) 31-36.
- [110] M. Mikuni, A. Kagaya, K. Takahashi, H.Y. Meltzer, Serotonin but not norepinephrine-induced calcium mobilization of platelets is enhanced in affective disorders. *Psychopharmacology (Berl)*. 106 (1992) 311-314.
- [111] R. Mongeau, P. Blier, C. de Montigny, The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments. *Brain Res Brain Res Rev*. 23 (1997) 145-195.
- [112] A. Moreno-Coutino, C. Calderon-Ezquerro, R. Drucker-Colin, Long-term changes in sleep and depressive symptoms of smokers in abstinence. *Nicotine Tob Res*. 9 (2007) 389-396.
- [113] E.J. Nestler, G.K. Aghajanian, Molecular and cellular basis of addiction. *Science*. 278 (1997) 58-63.
- [114] E.J. Nestler, M. Barrot, R.J. DiLeone, A.J. Eisch, S.J. Gold, L.M. Monteggia, Neurobiology of depression. *Neuron*. 34 (2002) 13-25.
- [115] M. Noda, H. Takahashi, T. Tanabe, M. Toyosato, S. Kikyotani, T. Hirose, M. Asai, H. Takashima, S. Inayama, T. Miyata, S. Numa, Primary structures of beta- and delta-subunit precursors of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences. *Nature*. 301 (1983) 251-255.
- [116] G.G. Nomikos, G. Damsma, D. Wenkstern, H.C. Fibiger, Chronic desipramine enhances amphetamine-induced increases in interstitial concentrations of dopamine in the nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol*. 195 (1991) 63-73.
- [117] D.H. Overstreet, R.W. Russell, Selective breeding for diisopropyl fluorophosphate-sensitivity: behavioural effects of cholinergic agonists and antagonists. *Psychopharmacology (Berl)*. 78 (1982) 150-155.
- [118] T. Paus, J. Barrett, Transcranial magnetic stimulation (TMS) of the human frontal cortex: implications for repetitive TMS treatment of depression. *J Psychiatry Neurosci*. 29 (2004) 268-279.
- [119] M.R. Picciotto, M. Zoli, C. Lena, A. Bessis, Y. Lallemand, N. Le Novere, P. Vincent, E.M. Pich, P. Brulet, J.P. Changeux, Abnormal avoidance learning in mice lacking functional high-affinity nicotine receptor in the brain. *Nature*. 374 (1995) 65-67.
- [120] M.R. Picciotto, M. Zoli, R. Rimondini, C. Lena, L.M. Marubio, E.M. Pich, K. Fuxe, J.P. Changeux, Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature*. 391 (1998) 173-177.
-

-
- [121] V.I. Pidoplichko, M. DeBiasi, J.T. Williams, J.A. Dani, Nicotine activates and desensitizes midbrain dopamine neurons. *Nature*. 390 (1997) 401-404.
- [122] K. Pierzchala, A.A. Houdi, G.R. Van Loon, Nicotine-induced alterations in brain regional concentrations of native and cryptic Met- and Leu-enkephalin. *Peptides*. 8 (1987) 1035-1043.
- [123] F.E. Pontieri, F. Passarelli, L. Calo, B. Caronti, Functional correlates of nicotine administration: similarity with drugs of abuse. *J Mol Med*. 76 (1998) 193-201.
- [124] F.E. Pontieri, G. Tanda, F. Orzi, G. Di Chiara, Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nature*. 382 (1996) 255-257.
- [125] R.D. Porsolt, Animal models of depression: utility for transgenic research. *Rev Neurosci*. 11 (2000) 53-58.
- [126] M. Quik, S. Vailati, T. Bordia, J.M. Kulak, H. Fan, J.M. McIntosh, F. Clementi, C. Gotti, Subunit composition of nicotinic receptors in monkey striatum: effect of treatments with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine or L-DOPA. *Mol Pharmacol*. 67 (2005) 32-41.
- [127] A.M. Redmond, J.P. Kelly, B.E. Leonard, Behavioural and neurochemical effects of dizocilpine in the olfactory bulbectomized rat model of depression. *Pharmacol Biochem Behav*. 58 (1997) 355-359.
- [128] K.J. Ressler, C.B. Nemeroff, Role of norepinephrine in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders. *CNS Spectr*. 6 (2001) 663-666, 670.
- [129] E.B. Ribeiro, R.L. Bettiker, M. Bogdanov, R.J. Wurtman, Effects of systemic nicotine on serotonin release in rat brain. *Brain Res*. 621 (1993) 311-318.
- [130] M.E. Risner, S.R. Goldberg, A comparison of nicotine and cocaine self-administration in the dog: fixed-ratio and progressive-ratio schedules of intravenous drug infusion. *J Pharmacol Exp Ther*. 224 (1983) 319-326.
- [131] T.W. Robbins, B.J. Everitt, Limbic-striatal memory systems and drug addiction. *Neurobiol Learn Mem*. 78 (2002) 625-636.
- [132] T.W. Robbins, B.J. Everitt, Comparative functions of the central noradrenergic, dopaminergic and cholinergic systems. *Neuropharmacology*. 26 (1987) 893-901.
- [133] E.J. Sachar, M. Baron, The biology of affective disorders. *Annu Rev Neurosci*. 2 (1979) 505-517.
- [134] P.S. Sachdev, R. McBride, C. Loo, P.M. Mitchell, G.S. Malhi, V. Croker, Effects of different frequencies of transcranial magnetic stimulation (TMS) on the forced swim test model of depression in rats. *Biol Psychiatry*. 51 (2002) 474-479.
- [135] R.J. Salin-Pascual, J.R. de la Fuente, L. Galicia-Polo, R. Drucker-Colin, Effects of transdermal nicotine on mood and sleep in nonsmoking major depressed patients. *Psychopharmacology (Berl)*. 121 (1995) 476-479.
- [136] R.J. Salin-Pascual, R. Drucker-Colin, A novel effect of nicotine on mood and sleep in major depression. *Neuroreport*. 9 (1998) 57-60.
- [137] R.J. Salin-Pascual, M. Rosas, A. Jimenez-Genchi, B.L. Rivera-Meza, V. Delgado-Parra, Antidepressant effect of transdermal nicotine patches in nonsmoking patients with major depression. *J Clin Psychiatry*. 57 (1996) 387-389.
- [138] G. Scherer, Smoking behaviour and compensation: a review of the literature. *Psychopharmacology (Berl)*. 145 (1999) 1-20.
- [139] J. Semba, C. Mataka, S. Yamada, M. Nankai, M. Toru, Antidepressantlike effects of chronic nicotine on learned helplessness paradigm in rats. *Biol Psychiatry*. 43 (1998) 389-391.
-

-
- [140] Y.I. Sheline, M. Sanghavi, M.A. Mintun, M.H. Gado, Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *J Neurosci.* 19 (1999) 5034-5043.
- [141] M. Shoaib, C.W. Schindler, S.R. Goldberg, Nicotine self-administration in rats: strain and nicotine pre-exposure effects on acquisition. *Psychopharmacology (Berl)*. 129 (1997) 35-43.
- [142] M. Shoaib, I.P. Stolerman, R.C. Kumar, Nicotine-induced place preferences following prior nicotine exposure in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 113 (1994) 445-452.
- [143] M.H. Sieck, The role of the olfactory system in avoidance learning and activity. *Physiol Behav.* 8 (1972) 705-710.
- [144] T.A. Slotkin, C.A. Tate, M.M. Cousins, F.J. Seidler, Prenatal nicotine exposure alters the responses to subsequent nicotine administration and withdrawal in adolescence: Serotonin receptors and cell signaling. *Neuropsychopharmacology.* 31 (2006) 2462-2475.
- [145] C. Song, B.E. Leonard, The olfactory bulbectomized rat as a model of depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 29 (2005) 627-647.
- [146] L.P. Spear, S.C. Brake, Periadolescence: age-dependent behavior and psychopharmacological responsivity in rats. *Dev Psychobiol.* 16 (1983) 83-109.
- [147] K.B. Stage, A.H. Glassman, L.S. Covey, Depression after smoking cessation: case reports. *J Clin Psychiatry.* 57 (1996) 467-469.
- [148] H.S. Stock, K. Ford, M.A. Wilson, Gender and gonadal hormone effects in the olfactory bulbectomy animal model of depression. *Pharmacol Biochem Behav.* 67 (2000) 183-191.
- [149] I.P. Stolerman, N.R. Mirza, M. Shoaib, Nicotine psychopharmacology: addiction, cognition and neuroadaptation. *Med Res Rev.* 15 (1995) 47-72.
- [150] K. Suemaru, H. Araki, Y. Kitamura, K. Yasuda, Y. Gomita, Cessation of chronic nicotine administration enhances wet-dog shake responses to 5-HT₂ receptor stimulation in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 159 (2001) 38-41.
- [151] J. Taylor, N. Harris, W.H. Vogel, Voluntary alcohol and cocaine consumption in "low" and "high" stress plasma catecholamine responding rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 37 (1990) 359-363.
- [152] M.H. Teicher, S.L. Andersen, J.C. Hostetter, Jr., Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. *Brain Res Dev Brain Res.* 89 (1995) 167-172.
- [153] G.H. Thompson, D.A. Hunter, Nicotine replacement therapy. *Ann Pharmacother.* 32 (1998) 1067-1075.
- [154] B.M. Thorne, M. Aaron, E.E. Latham, Effects of olfactory bulb ablation upon emotionality and muricidal behavior in four rat strains. *J Comp Physiol Psychol.* 84 (1973) 339-344.
- [155] Y. Tizabi, D.H. Overstreet, A.H. Rezvani, V.A. Louis, E. Clark, Jr., D.S. Janowsky, M.A. Kling, Antidepressant effects of nicotine in an animal model of depression. *Psychopharmacology (Berl)*. 142 (1999) 193-199.
- [156] Y. Tizabi, A.H. Rezvani, L.T. Russell, K.Y. Tyler, D.H. Overstreet, Depressive characteristics of FSL rats: involvement of central nicotinic receptors. *Pharmacol Biochem Behav.* 66 (2000) 73-77.
- [157] M.A. Ungless, S.J. Cragg, A choreography of nicotinic receptors directs the dopamine neuron routine. *Neuron.* 50 (2006) 815-816.
-

-
- [158] N. Urakawa, T. Nagata, K. Kudo, K. Kimura, T. Imamura, Simultaneous determination of nicotine and cotinine in various human tissues using capillary gas chromatography/mass spectrometry. *Int J Legal Med.* 106 (1994) 232-236.
- [159] R.J. Valentino, S.L. Foote, M.E. Page, The locus coeruleus as a site for integrating corticotropin-releasing factor and noradrenergic mediation of stress responses. *Ann N Y Acad Sci.* 697 (1993) 173-188.
- [160] H. van Riezen, B.E. Leonard, Effects of psychotropic drugs on the behavior and neurochemistry of olfactory bulbectomized rats. *Pharmacol Ther.* 47 (1990) 21-34.
- [161] I.M. van Rijzingen, W.H. Gispen, B.M. Spruijt, Olfactory bulbectomy temporarily impairs Morris maze performance: an ACTH(4-9) analog accelerates return of function. *Physiol Behav.* 58 (1995) 147-152.
- [162] G. Vazquez-Palacios, H. Bonilla-Jaime, J. Velazquez-Moctezuma, Antidepressant-like effects of the acute and chronic administration of nicotine in the rat forced swimming test and its interaction with fluoxetine [correction of flouxetine]. *Pharmacol Biochem Behav.* 78 (2004) 165-169.
- [163] G. Vazquez-Palacios, H. Bonilla-Jaime, J. Velazquez-Moctezuma, Antidepressant effects of nicotine and fluoxetine in an animal model of depression induced by neonatal treatment with clomipramine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 29 (2005) 39-46.
- [164] P. Vieyra-Reyes, M.R. Picciotto, Y.S. Mineur, Voluntary oral nicotine intake in mice down-regulates GluR2 but does not modulate depression-like behaviors. *Neurosci Lett.* 434 (2008) 18-22.
- [165] G. Vogel, D. Neill, M. Hagler, D. Kors, A new animal model of endogenous depression: a summary of present findings. *Neurosci Biobehav Rev.* 14 (1990) 85-91.
- [166] J.B. Watson, Kinaesthetic and organic sensations: their role in the reactions of the white rat to the maze. *Psychol. Rev.* 8 (1907) 43-142.
- [167] R.J. West, M.A. Russell, M.J. Jarvis, C. Feyerabend, Does switching to an ultra-low nicotine cigarette induce nicotine withdrawal effects? *Psychopharmacology (Berl).* 84 (1984) 120-123.
- [168] P. Willner, P.J. Mitchell, The validity of animal models of predisposition to depression. *Behav Pharmacol.* 13 (2002) 169-188.
- [169] T.A. Wills, D. Vaccaro, G. McNamara, Novelty seeking, risk taking, and related constructs as predictors of adolescent substance use: an application of Cloninger's theory. *J Subst Abuse.* 6 (1994) 1-20.
- [170] M.L. Wong, J. Licinio, Research and treatment approaches to depression. *Nat Rev Neurosci.* 2 (2001) 343-351.
- [171] S. Wonnacott, S. Kaiser, A. Mogg, L. Soliakov, I.W. Jones, Presynaptic nicotinic receptors modulating dopamine release in the rat striatum. *Eur J Pharmacol.* 393 (2000) 51-58.
- [172] G. Yadid, R. Nakash, I. Deri, G. Tamar, N. Kinor, I. Gispan, A. Zangen, Elucidation of the neurobiology of depression: insights from a novel genetic animal model. *Prog Neurobiol.* 62 (2000) 353-378.
- [173] K. Yasuda, K. Suemaru, H. Araki, Y. Gomita, Effect of nicotine cessation on the central serotonergic systems in mice: involvement of 5-HT(2) receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 366 (2002) 276-281.
-