UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

ADAPTACIONES DE SISTEMAS EMOCIONALES CEREBRALES CAUSADAS POR LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A NICOTINA Y SU RETIRADA PROLONGADA

Carlos Eduardo Novoa Paloma

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Humanas

Departamento de Psicología

Bogotá D.C., Colombia

2020

ADAPTACIONES DE SISTEMAS EMOCIONALES CEREBRALES CAUSADAS POR LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A NICOTINA Y SU RETIRADA PROLONGADA

Carlos Eduardo Novoa Paloma

Tesis para optar por el título de Magíster en Psicología con énfasis en la línea:

Efectos del estrés sobre el aprendizaje con modelos experimentales

Directora:

Marisol Lamprea Rodríguez, MSc, Ph.D.

Universidad Nacional de Colombia

Codirector:

Leonardo Augusto Ortega, MSc, Ph.D.

Fundación Universitaria Konrad Lorenz

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Humanas

Departamento de Psicología

Bogotá D.C., Colombia

2020

Agradecimientos

A mis padres, quienes a pesar de la distancia siempre me han acompañado en el desarrollo de mis proyectos y me han motivado a trabajar por mis ambiciones.

A la profesora Marisol Lamprea, por su inspiradora labor como docente e investigadora, por su compromiso y rigor que han ejercido una fuerte influencia en mi desarrollo profesional y personal, y por su orientación en el desarrollo de este proyecto. Al profesor Leonardo Ortega, por su orientación en el desarrollo de este proyecto y habernos introducido al campo de estudio de las drogas con potencial de abuso.

A los integrantes del Laboratorio de Neurociencias, por sus contribuciones individuales en las discusiones de los últimos seis años, su disposición para colaborar y su curiosidad, pues esto ha servido como catalizador para mi ejercicio investigativo. Particularmente a José Solano, por su compañía y compromiso durante tantas horas de trabajo y discusión que han permitido el desarrollo de este proyecto.

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

A la Universidad Nacional de Colombia por su apoyo y financiación a través de la Dirección de Investigación y Extensión de la sede Bogotá con la “Convocatoria nacional para el apoyo a proyectos de investigación y creación artística de la Universidad Nacional de Colombia 2017-2018” Código 41776.

Resumen

Múltiples sistemas de aprendizaje y memoria interactúan para producir respuestas ajustadas a las exigencias del ambiente. Sin embargo, estas interacciones pueden resultar en patrones de respuesta anormales cuando eventos que controlan procesos de organización cerebral favorecen a un sistema sobre los demás. En este sentido, el potencial de las drogas de abuso para generar adaptaciones comportamentales de largo plazo podría radicar en su capacidad para promover procesos de reorganización neural que afectan funciones cerebrales fundamentales (e.g. refuerzo y respuesta de estrés) y la sensibilidad individual a diferentes estímulos y a las situaciones de aprendizaje. En el presente estudio se examinó la adaptación a largo plazo de sistemas emocionales cerebrales y su modulación de procesos de aprendizaje y memoria espacial, durante un periodo de retirada prolongada posterior a la exposición crónica a nicotina. Para esto se realizaron dos experimentos. En el primer experimento 22 ratas Wistar macho fueron tratadas con nicotina (0.14 mg/kg base libre) o vehículo (solución salina 0.9%), suministrados por medio de una inyección diaria por vía subcutánea (s.c.) por un periodo de 21 días. Posteriormente, el tratamiento fue suspendido por un periodo de 30 días y después los animales fueron entrenados y evaluados en la tarea espacial del laberinto circular de Barnes (LCB). En el segundo experimento 22 ratas Wistar recibieron el mismo tratamiento descrito anteriormente y fueron entrenadas bajo las mismas condiciones; a diferencia del primer experimento, los animales del segundo experimento fueron desafiados con un evento de estrés agudo por restricción de movimientos antes de la prueba de recobro en el LCB. Inmediatamente después de la prueba de recobro se recolectaron muestras de tejido cerebral y se determinaron los niveles de inducción de la proteína c-Fos en respuesta al estrés agudo por medio de un ensayo de inmunohistoquímica. Los resultados mostraron que: 1) a corto plazo la nicotina crónica indujo sensibilización de la actividad locomotriz; 2) a largo plazo la nicotina crónica no

afectó la adquisición en el LCB, pero mejoró el desempeño durante el recobro bajo condiciones estándar; 3) en contraste, a largo plazo la nicotina crónica deterioró el desempeño durante el recobro en el LCB bajo los efectos del estrés y 4) incrementó selectivamente la inducción de la proteína c-Fos en respuesta al estrés agudo en regiones de sistemas emocionales cerebrales. En conjunto, estos resultados podrían sugerir que la nicotina ejerce acciones moduladoras de los procesos de aprendizaje y memoria gracias a la remodelación de regiones implicadas en el procesamiento emocional, sacando provecho de mecanismos moleculares reclutados durante la exposición crónica a la droga.

Palabras clave: Múltiples sistema de memoria, nicotina crónica, retirada prolongada, estrés, proteína c-Fos.

Abstract

Multiple learning and memory systems interact to produce adapted responses to environmental demands. However, these interactions can result in abnormal response patterns when events that control brain organization favor one system over the others. In this sense, the potential of drugs of abuse to generate long-term behavioral adaptations could lie in their ability to promote neural reorganization processes that alter fundamental brain functions (e.g. reinforcement and stress response) and, consequently, individual sensitivity to different stimuli and learning situations. The present study examined the long-term adaptation of brain emotional systems and their modulation of learning processes and spatial memory, during a period of protracted withdrawal after chronic exposure to nicotine. Two experiments were performed. For the first experiment 22 male Wistar rats were treated with nicotine (0.14 mg/kg free base) or vehicle (0.9% saline solution), administered by one subcutaneous (s.c.) injection per day for a period of 21 days. Following this, the treatment was suspended for a period of 30 days and then the animals were trained and evaluated on a spatial task using the Barnes maze (LCB). For the second experiment 22 Wistar rats received the same treatment described above and were trained under the same conditions; unlike the first experiment, the animals of the second experiment were challenged with an acute stress event using movement restriction before the recovery test in the LCB. Immediately after the recovery test, brain tissue samples were collected and the induction of the c-Fos protein in response to acute stress was determined by means of an immunohistochemical assay. The results showed that: 1) for the short term, chronic nicotine induced sensitization of locomotor activity; 2) for the long term, chronic nicotine did not affect acquisition in the LCB, but improved performance during the recovery test under standard conditions; 3) in contrast, for the long term, chronic nicotine impaired recovery performance in the LCB under the effects of stress, and 4) selectively increased

the induction of the c-Fos protein in response to acute stress in regions of brain emotional systems. Together, these results may suggest that nicotine exerts modulatory actions on learning and memory processes thanks to the remodeling of regions involved in emotional processing, taking advantage of molecular mechanisms recruited during chronic exposure to the drug.

Keywords: Multiple memory system, chronic nicotine, protracted withdrawal, stress, c-Fos protein.

Contenido

Agradecimientos I

Resumen II

Abstract IV

Contenido VI

Lista de Figuras IX

Lista de Abreviaturas XI

Introducción 1

Múltiples sistemas cerebrales de aprendizaje y memoria 2

Interacción de múltiples sistemas de aprendizaje y memoria 7

Psicofarmacología de la nicotina 9

Acciones moduladoras de la nicotina sobre el comportamiento 11

Acciones moduladoras de la respuesta de estrés en el cerebro, el aprendizaje y la memoria 14

Justificación 19

Hipótesis 20

Objetivos 22

Objetivo general 22

Objetivos específicos 22

Métodos 23

Sujetos 23

Diseño 23

Materiales y Equipos 25

Instrumentos 26

Fármacos. 29

Equipos. 30

Software. 30

Bases de datos. 31

Procedimientos 32

Fase 1: Validación del tratamiento farmacológico. 32

Fase 2: Evaluación del aprendizaje y la memoria espacial. 35

Fase 3: Obtención y procesamiento de muestras de tejido cerebral. 37

Análisis estadísticos 38

Consideraciones Éticas 40

Resultados 41

Experimento 1: Efectos comportamentales de la nicotina crónica y su retirada prolongada ... 41

A corto plazo la nicotina crónica indujo sensibilización de la actividad locomotriz..... 41

A largo plazo la nicotina crónica no afectó la adquisición en el laberinto circular de Barnes (LCB). 42

A largo plazo la nicotina crónica mejoró el desempeño durante el recobro en el LCB. 48

Experimento 2: Respuesta a un estresor agudo durante la retirada prolongada de la nicotina crónica 52

Los efectos de la nicotina sobre la actividad locomotriz y la memoria espacial fueron parcialmente replicados. 52

A largo plazo la nicotina crónica deterioró el desempeño durante el recobro en el LCB bajo los efectos del estrés..... 56

A largo plazo la nicotina crónica incrementó selectivamente la inducción de la proteína c-Fos en respuesta al estrés agudo en regiones de sistemas emocionales cerebrales. 59

Discusión..... 62

Efectividad del tratamiento farmacológico..... 62

Estructura multivariada del laberinto circular de Barnes..... 65

Consecuencias a largo plazo de la exposición crónica a nicotina..... 69

Consideraciones metodológicas y perspectivas futuras..... 77

Referencias..... 81

Anexos 97

Anexo 1. Protocolo de cuantificación de fotografías de inmunohistoquímica. 97

Anexo 2. Script para análisis de componentes principales en lenguaje R..... 99

Anexo 3. Script para función de cambio en lenguaje R..... 107

Anexo 4. Salida de datos SPSS, pruebas sobre datos comportamentales..... 109

Anexo 5. Protocolo de inmunohistoquímica..... 131

Anexo 6. Información suplementaria..... 133

Lista de Figuras

Figura 1. Triple disociación de funciones de memoria 5

Figura 2. Efectos del estrés sobre la memoria 16

Figura 3. Diseño experimental 25

Figura 4. Campo Abierto 26

Figura 5. Laberinto Circular de Barnes 28

Figura 6. Restrictor de movimientos 29

Figura 7. Procedimientos para evaluación de actividad locomotriz 34

Figura 8. Procedimientos para evaluación del aprendizaje y la memoria espacial 36

Figura 9. Actividad horizontal en campo abierto – experimento 1 42

Figura 10. Gráficos de sedimentación 43

Figura 11. Matrices de correlación variable – componente 44

Figura 12. Contribución de variables por componente 45

Figura 13. Adquisición tarea espacial laberinto de Barnes– componente 1, experimento 1 47

Figura 14. Adquisición tarea espacial laberinto de Barnes – componente 2, experimento 1 48

Figura 15. Recobro tarea espacial laberinto de Barnes – componente 1, experimento 1 50

Figura 16. Recobro tarea espacial laberinto de Barnes – componente 2, experimento 1 51

Figura 17. Actividad horizontal en campo abierto – experimento 2 53

Figura 18. Adquisición tarea espacial laberinto de Barnes – componente 1, experimento 2 54

Figura 19. Adquisición tarea espacial laberinto de Barnes – componente 2, experimento 2 55

Figura 20. Recobro tarea espacial laberinto de Barnes – componente 1, experimento 2 57

Figura 21. Recobro tarea espacial laberinto de Barnes – componente 2, experimento 2 58

Figura 22. Ensayo de inmunohistoquímica para c-Fos 59

Figura 23. Inducción de c-Fos en respuesta a desafío con estrés agudo 69

Figura 25. Resumen gráfico 77

Lista de Abreviaturas

A1 – A8	Adquisición 1 – Adquisición 8
AcbSh	Región *Shell* del núcleo accumbens
ACP	Análisis de componente principales
ACTH	Hormona adrenocorticótropa
ADQ LCB	Adquisición laberinto circular de Barnes
CA	Campo abierto
CIP	Células inmuno-positivas
CRF	Factor liberador de corticotropina
Dist.	Distancia recorrida
DPN	Día posnatal
EPR	Errores ponderados rectos
Err.	Errores
HDAC	Deacetilasa de histonas
HPA	Hipotálamo pituitario adrenal
IC	Intervalo de confianza
IEG	Genes de expresión temprana
KMO	Índice Kaiser-Meyer-Olkin
LAM	Laberinto acuático de Morris
Lat.	Latencia de llegada al agujero meta
LCB	Laberinto circular de Barnes
LpA.	Latencia de exploración del primer agujero
NAcb	Núcleo accumbens

Nic	Grupo nicotina
PCC	Prueba con caja
PLP	Potenciación a largo plazo
PSC LCB	Prueba sin caja laberinto circular de Barnes
PVN	Núcleo paraventricular del hipotálamo
RCN	Receptores colinérgicos nicotínicos
s.c.	subcutánea
Veh	Grupo vehículo
Vel.	Velocidad media
VTA	Área tegmental ventral

Introducción

Existen varias teorías sobre los mecanismos neuronales del consumo de drogas. Una visión popular es que las drogas estimulan la liberación de dopamina desde el área tegmental ventral hacia el núcleo accumbens y esto produce una experiencia placentera que motiva su consumo subsiguiente (Wise & Rompre, 1989). Sin embargo, también se ha descrito que las drogas afectan diferentes regiones corticales, de manera que, también podrían afectar otros procesos comportamentales (McDonald et al., 2004). De hecho, los sustratos neuronales de la memoria y el aprendizaje se encuentran entre los principales circuitos que sufren adaptaciones neurales aberrantes en respuesta a la exposición crónica a drogas (Koob & Volkow, 2010). Por ejemplo, se ha mostrado que la nicotina favorece procesos de plasticidad neural importantes para el aprendizaje y la memoria (Fujii et al., 1999); sin embargo, los efectos de la nicotina en el aprendizaje y la memoria no son concluyentes (Kutlu & Gould, 2015). Aún más, los efectos de la nicotina parecen tener una relación estrecha con sistemas cerebrales de estrés (Chen et al., 2008; Koob & Schulkin, 2019); sin embargo, estas relaciones también permanecen sin aclarar. Dado el importante papel del estrés en la modulación del aprendizaje y la memoria (McEwen et al., 2016; Tasker & Joëls, 2015), así como su hipotética contribución a los desórdenes mentales (de Kloet et al., 2005); el estudio de las relaciones entre el estrés, las drogas y su influencia sobre el aprendizaje y la memoria podría contribuir a describir consecuencias a largo plazo del uso de esta droga que han sido inadvertidas.

En el presente trabajo se estudiaron las adaptaciones comportamentales de corto y largo plazo inducidas por la exposición crónica a la nicotina y su retirada prolongada, haciendo uso de la prueba de campo abierto y de una tarea de memoria espacial en el laberinto circular de Barnes (LCB). Igualmente, se evaluó la interacción de estos tratamientos con la exposición a una situación

de estrés experimental tanto en los indicadores comportamentales del recobro de la tarea espacial, como en la respuesta cerebral en regiones relacionadas con el procesamiento emocional.

En las siguientes secciones: 1) se realiza una introducción al marco de múltiples sistemas de aprendizaje y memoria, 2) se presenta la hipótesis de interacción entre múltiples sistemas de aprendizaje y memoria como un mecanismo involucrado en las adaptaciones comportamentales al uso de drogas, 3) se describen mecanismos de acción de la nicotina y 4) sus efectos sobre procesos de aprendizaje y memoria; finalmente, 5) se exponen acciones moduladoras de la respuesta de estrés en el cerebro, el aprendizaje y la memoria y se comenta su posible relación con los efectos a largo plazo de la nicotina crónica.

Múltiples sistemas cerebrales de aprendizaje y memoria

Es ampliamente aceptado que diferentes aspectos del aprendizaje y la memoria involucran diversos sistemas de memoria en el cerebro (Thompson & Kim, 1996). Esto se deriva de la identificación de disociaciones funcionales observadas en casos clínicos con pacientes amnésicos y de los resultados obtenidos en la investigación básica con modelos animales en los que se realizan lesiones cerebrales localizadas. Los diferentes sistemas de memoria del cerebro se distinguen con relación a los tipos de información que procesan y los principios bajo los que operan (Squire, 2004).

Al respecto, McDonald y White (1993) mostraron que el hipocampo, la amígdala y el estriado dorso-lateral contribuyen de manera independiente al aprendizaje y la memoria. En ese estudio se propuso una triple disociación funcional a partir de los resultados obtenidos en una serie de experimentos en el laberinto radial (Figura 1). Para esto, se comparó el desempeño de ratas con lesión cerebral localizada en la formación hipocampal, la amígdala lateral o el estriado dorsal en

tres tareas con diferentes requerimientos. En la primera tarea (paradigma *win-shift*) cada uno de los ocho brazos del laberinto fue cebado con una pieza de un reforzador alimenticio. En cada ensayo a los animales se les permitió entrar a los brazos hasta recolectar todos los reforzadores. Cada vez que el animal regresaba al centro del laberinto, después de haber colectado un reforzador, las compuertas de todos los brazos se cerraban por un periodo de diez segundos, después del cual los animales podían volver a escoger. La hipótesis en esta tarea era que los animales aprendían la localización de los brazos visitados respecto a claves espaciales externas al laberinto y conseguían un mejor desempeño evitando los brazos visitados previamente. En el estudio, los animales con lesión de la amígdala y el estriado dorsal tuvieron un desempeño equivalente al de los animales control; sin embargo, los animales con lesión en la formación hipocampal cometieron más errores a lo largo del entrenamiento y no alcanzaron los niveles de desempeño de los demás grupos.

En la segunda tarea (paradigma *win-stay*) al inico de cada ensayo se seleccionaron aleatoriamente cuatro brazos que fueron señalados con una luz en la entrada y cebados con una pieza de reforzador alimenticio. Durante cada ensayo no se impusieron restricciones en la circulación dentro del laberinto y los reforzadores fueron reemplazados en las mismas posiciones cada vez que el animal los consumía; además, se limitó el acceso a claves externas al laberinto con el uso de cortinas. La hipótesis en esta tarea era que los animales aprendían una relación de tipo estímulo - respuesta: ingresar al brazo con una luz en su entrada. En el estudio, los animales con lesión de la amígdala y la formación hipocampal tuvieron un desempeño equivalente al de los animales control; sin embargo, los animales con lesión en el estriado dorsal tuvieron un menor porcentaje de respuestas correctas y no alcanzaron los niveles de desempeño de los demás grupos.

En la tercera tarea (paradigma de preferencia de clave condicionada) se asignaron dos brazos para cada animal y se definieron dos tipos de ensayo: pareados y no pareados. En los

ensayos pareados los animales fueron confinados en uno de los brazos y este se mantuvo iluminado; adicionalmente, en este brazo se dejaron múltiples piezas de un reforzador alimenticio que el animal podía consumir durante el confinamiento. En los ensayos no pareados los animales fueron confinados en el otro brazo y este se mantuvo sin iluminación y sin acceso al reforzador. Estos tipos de ensayos se alternaron durante el entrenamiento. Durante una sesión de prueba se permitió que los animales exploraran libremente ambos brazos con las mismas condiciones de iluminación del entrenamiento, pero sin acceso a los reforzadores. La hipótesis en esta tarea era que durante el entrenamiento se desarrollaba una asociación entre el valor apetitivo de la comida y los estímulos lumínicos presentes en cada brazo y se esperaba que esta asociación se expresara como una preferencia por el brazo iluminado durante el ensayo de prueba. En el estudio, los animales con lesión de la formación hipocampal y el estriado dorso lateral mostraron una preferencia equivalente a la de los animales control; sin embargo, los animales con lesión en la amígdala lateral gastaron el mismo tiempo en ambos brazos, mostrando ausencia de una preferencia.

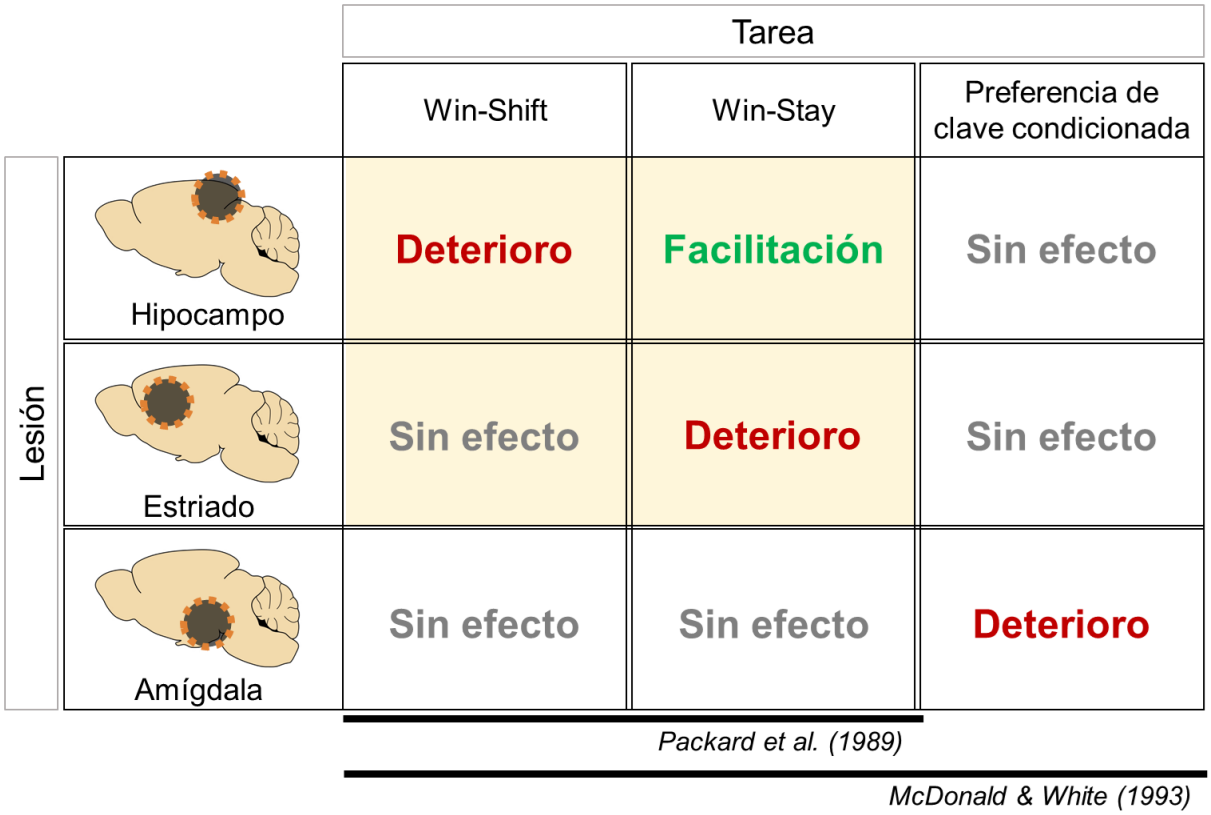


Figura 1. Triple disociación de funciones de memoria. Se presenta un resumen gráfico del estudio de McDonald & White (1993). En este trabajo animales lesionados en tres regiones cerebrales relacionadas con procesos de aprendizaje y memoria fueron evaluados en tres tareas con diferentes requerimientos en el laberinto radial. Los recuadros resaltados en la parte superior izquierda del diagrama representan el resumen gráfico del estudio de Packard et al. (1989). Estos resultados soportan la coexistencia de múltiples sistemas de memoria paralelos. Adaptado de McDonald et al. (2017).

Con relación a estos resultados, la teoría de múltiples sistemas paralelos de memoria sugiere que las tres estructuras intervenidas en el estudio de triple disociación son centrales a tres diferentes sistemas de memoria. Estos sistemas se encuentran activos en cada situación de aprendizaje, codifican y almacenan información que es relevante de estas situaciones, pero el tipo de información procesada por cada uno es diferente en su naturaleza y por tanto, su contribución al comportamiento basado en la memoria de cada tarea es diferencial (McDonald et al., 2017). La formación hipocampal posee una compleja arquitectura que le confiere propiedades funcionales

especiales para la codificación de relaciones espaciales entre elementos del entorno que, hipotéticamente, generan representaciones contextuales complejas, útiles para la solución de tareas de memoria espacial (Danjo et al., 2018; Moser et al., 2017). El estriado dorso lateral posee relaciones anatómicas estrechas con el sistema motor que facilitan el establecimiento de asociaciones de tipo estímulo - respuesta donde secuencias de movimiento que llevan al acceso a reforzadores son puestas bajo el control de estímulos en la situación de aprendizaje (Burton et al., 2015). La amígdala es una estructura cerebral clásicamente relacionada con procesos de respuesta emocional que es inervada de manera extensa por estructuras corticales y subcorticales de procesamiento sensorial; por esto, la amígdala está implicada en el establecimiento de asociaciones entre estímulos neutros y estímulos reforzantes o aversivos (Li et al., 2013; Shabel & Janak, 2009).

Desarrollos posteriores a estas observaciones han permitido describir las relaciones del sistema dependiente de la amígdala con estructuras como el estriado ventral, el hipocampo ventral y la corteza prefrontal (Gruber & McDonald, 2012). Estas estructuras están relacionadas con la regulación de la respuesta emocional (McEwen et al., 2016). En conjunto, estas estructuras conformarían un sistema de memoria emocional que, clasifica las respuestas a estímulos de acuerdo con sus resultados afectivos asociados y ejerce acciones moduladoras sobre la formación de diferentes tipos de memoria (Gruber & McDonald, 2012; McGaugh & Roozendaal, 2017).

La acción coordinada de estos sistemas es responsable de la producción de respuestas ajustadas a las exigencias ambientales y requiere un delicado equilibrio (McDonald et al., 2017). Diferentes estímulos pueden alterar el equilibrio de estos sistemas y conducir a patrones de comportamiento ‘anormales’(McDonald et al., 2004).

Interacción de múltiples sistemas de aprendizaje y memoria

Los sistemas de aprendizaje y memoria paralelos cumplen funciones altamente especializadas que pueden ser disociadas en estudios con las manipulaciones indicadas; sin embargo, estas disociaciones no son esperables en condiciones naturales: en su contexto habitual los organismos se enfrentan con situaciones complejas en las cuales es difícil identificar la contribución individual de los sistemas de memoria. En cambio, se plantea que estos sistemas forman una red de circuitos responsable por comportamientos basados en memoria, funcionando de manera independiente, pero interactuando para producir respuestas coherentes en circunstancias particulares (White et al., 2013). Estas interacciones pueden ser de carácter cooperativo o competitivo. El resultado de estas interacciones es un comportamiento ajustado a las exigencias del contexto. Sin embargo, en circunstancias particulares, en las que se propicia un desbalance en la interacción de estos sistemas, el resultado son patrones de respuesta considerados anormales (McDonald et al., 2004).

Evidencia inicial en favor de la hipótesis de interacción entre sistemas de memoria fue presentada en un trabajo temprano de Packard et al., (1989). En dicho trabajo se evaluó la doble disociación funcional de la formación hipocampal y el estriado dorsal con dos tareas en el laberinto radial, similares a las descritas previamente (Figura 1). Como era esperado, los animales con lesión en la formación hipocampal presentaron deterioro del desempeño en la tarea de carácter espacial, mientras que los animales con lesión en el estriado dorso lateral presentaron un desempeño equivalente al de animales control. Por otro lado, en la tarea de carácter estímulo - respuesta, los animales con lesión en el estriado dorsal presentaron un desempeño peor respecto a los animales control, pero los animales con lesión en la formación hipocampal curiosamente mostraron un desempeño mejor respecto a animales control. Interpretaciones posteriores sobre estos resultados

señalan que la información codificada por el hipocampo (relaciones espaciales), puede resultar poco útil para resolver la tarea de carácter estímulo - respuesta, pues en esta la localización de los brazos cebados cambia en cada ensayo y las relaciones espaciales entre los mismos no se mantienen; de este modo, la información espacial interfiere con la solución de la terea y esto explica por qué la lesión en el hipocampo tiene un efecto facilitador en su adquisición (McDonald et al., 2017). En favor de esa interpretación, un efecto similar al de la lesión del hipocampo se consiguió con animales sin lesión, en un arreglo experimental en que las claves visuales externas al laberinto fueron ocluidas con el uso de cortinas; esas claves visuales constituyen los elementos sobre los cuales el sistema dependiente del hipocampo genera una representación del contexto, entonces se supone que, al ocluir las claves con las cortinas, se dificulta la actividad del sistema dependiente del hipocampo y se reduce su interferencia en la tarea de estímulo - respuesta (White et al., 2013).

Un aspecto esencial de la hipótesis de la interacción de sistemas de memoria es que plantea que patrones anormales de comportamiento son el resultado del desbalance en la actividad de estos sistemas. Al respecto, procesos de organización cerebral a lo largo del desarrollo juegan un papel crucial en la manera en que interactúan los sistemas de memoria; y por tanto, factores genéticos y de la experiencia individual, importantes para procesos de organización cerebral, tienen un carácter determinante en las funciones cognitivas (Bale, 2015; Kolb & Gibb, 2014; McDonald et al., 2004). En este sentido, los procesos de aprendizaje y memoria constituyen funciones esenciales para el control del comportamiento organizado en el ambiente y son susceptibles a la influencia de eventos con el potencial para alterar el balance en la actividad de múltiples sistemas cerebrales que, normalmente funcionan de manera coordinada. Al respecto, se ha propuesto que el estrés, la dieta y el uso de drogas son eventos con dicho potencial (McDonald et al., 2004).

Psicofarmacología de la nicotina

La nicotina es el principal componente en productos derivados del tabaco responsable por los efectos fisiológicos conducentes al consumo abusivo de estos productos (Brown & Gill, 2019; Rupprecht et al., 2015). Las principales dianas de la nicotina en el cerebro son los receptores colinérgicos nicotínicos (RCN) (Kutlu & Gould, 2015; Picciotto et al., 2002). Estos receptores se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebro y su activación ejerce un efecto modulador de carácter excitatorio sobre la actividad neuronal (Kenney & Gould, 2008; Kohlmeier, 2019).

Se cree que estos efectos moduladores a nivel de la función cerebral son los responsables de las diversas respuestas frente a la nicotina (T. J. Gould, 2010; Renthal & Nestler, 2008; Volkow, 2011). Por ejemplo, la nicotina tiene un marcado impacto en la actividad dopaminérgica y se ha propuesto que esto está relacionado con el carácter adictivo de la droga (Nisell et al., 1994). Se ha mostrado que la nicotina estimula RCN en el área tegmental ventral (VTA, por su siglas en inglés) y esto promueve un incremento de la transmisión dopaminérgica hacia el núcleo accumbens que, teóricamente codifica el valor subjetivo del reforzador (NAcb, también denominado estriado ventral) (Balfour, 2015).

Por otro lado, se ha reportado que la nicotina crónica lleva a una remodelación de largo plazo en el NAcb, con adaptaciones que incluyen: disminución de la eficacia sináptica, incremento de las espinas dendríticas en las células principales e incremento de la transmisión dopaminérgica (Burton et al., 2015; Morud et al., 2016, 2018). Estos efectos son importantes considerando el papel protagónico que se le ha asignado a la transmisión dopaminérgica desde el VTA hacia el NAcb en procesos de aprendizaje. Se ha sugerido que la transmisión dopaminérgica en este circuito señaliza el valor motivacional de consecuencias esperadas y esto es crítico para procesos de

refuerzo y el control del comportamiento orientado a metas (Burton et al., 2015; Day & Carelli, 2007).

Adicionalmente, se ha sugerido que al formar parte de un sistema cerebral emocional, el NAcb contribuye a la coordinación entre sistemas de memoria, favoreciendo la producción de respuestas basadas en la valencia de los estímulos en un contexto y promoviendo la selección de conductas recompensantes (Gruber & McDonald, 2012).

Con relación a lo anterior, importantes líneas de investigación se han enfocado en las adaptaciones moleculares frente a la exposición crónica a la nicotina que se mantienen durante su retirada. Una suposición detrás de estas investigaciones es que dichas adaptaciones moleculares son responsables de cambios persistentes en funciones cerebrales (e.g. refuerzo, respuesta de estrés), que ejercen un papel determinante en procesos como el aprendizaje y la memoria (Hyman, 2005; Koob & Schulkin, 2019; Volkow, 2011). Sobre esto, se ha reportado que la nicotina suprime la actividad de las proteínas deacetilasas de histonas (HDAC por sus siglas en inglés) (Levine et al., 2011). Las HDAC regulan el nivel de acetilación de la cromatina controlando el acceso al ADN para su transcripción (para una revisión ver Faillace & Bernabeu, 2019) y podrían representar un mecanismo para la remodelación de estructuras cerebrales en respuesta a la exposición crónica a la nicotina (Volkow, 2011). De hecho, se ha reportado que la supresión de HDAC mejora procesos de plasticidad neural y favorece la consolidación de la memoria espacial en el laberinto circular de Barnes (Vargas-López, 2017).

En otro ejemplo de estas investigaciones, Becker et al. (2017) describieron adaptaciones comportamentales y de la actividad de genes de expresión temprana (IEG, por sus siglas en inglés) durante la retirada prolongada de la nicotina y otras drogas. En ese estudio, ratones macho fueron

tratados con nicotina por un periodo inferior a una semana; posterior a esto, la droga fue retirada por cuatro semanas y enseguida se evaluaron diferentes dimensiones comportamentales. Los animales pretratados con nicotina mostraron déficits en la interacción social, mayores estereotipias motoras y conductas de ansiedad exacerbadas. Adicionalmente, se observó una mayor inducción de inmmunoreactividad para la proteína c-Fos en estructuras relacionadas con la respuesta emocional, después de la exposición a una tarea en la cual los animales debían explorar un ambiente novedoso para obtener alimento. La inmmunoreactividad para la proteína c-Fos ha sido utilizada como un marcador de activación postsináptica (Marttila et al., 2006). Debido al incremento de conductas de ansiedad y de la reactividad de c-Fos en regiones de procesamiento emocional, se sugirió que las adaptaciones comportamentales durante la retirada prolongada de la nicotina estarían potencialmente relacionadas con la adaptación de la respuesta emocional.

Acciones moduladoras de la nicotina sobre el comportamiento

Uno de los elementos comportamentales más evidentes de la respuesta a la nicotina crónica es el efecto de sensibilización de la actividad locomotriz. Este fenómeno consiste en incremento de la actividad locomotriz producida por la misma droga aplicada de manera repetida (Balfour, 2015). De manera aguda en individuos sin experiencia con la droga, la nicotina ejerce efectos inhibitorios de carácter transitorio sobre la actividad locomotriz; sin embargo, tras la exposición repetida, la aplicación de una misma dosis resulta en un rápido incremento de la actividad locomotriz que se ha explicado como un fenómeno de tolerancia a los efectos inhibitorios tempranos de esta droga (Balfour, 2015; DiFranza & Wellman, 2007). Este efecto se ha relacionado con adaptaciones de la función sináptica y la transmisión dopaminérgica en el núcleo accumbens. Por ejemplo, Morud et al. (2016) reportaron un proceso de sensibilización de la actividad locomotriz en respuesta a un tratamiento con inyecciones s.c. de nicotina (0.36 mg/kg)

por tres semanas. En ese estudio, se realizaron registros electrofisiológicos en tajadas de cerebros extraídos de los animales pretratados con nicotina (*ex vivo)* a partir de los cuales, se pudo determinar una reducción en la eficacia sináptica de las regiones *Shell* y *Core* del núcleo accumbens, hasta siete meses después de la retirada de la droga. Adicionalmente, observaron que la nicotina aplicada en estos mismos tejidos tuvo un efecto facilitador sobre la eficacia sináptica en el núcleo accumbens y que el agonista dopaminérgico Quimpirol emuló el efecto facilitador sobre la eficacia sináptica que tuvo la nicotina, de manera selectiva en la región *Shell* del núcleo accumbens (AcbSh). Estos resultados resaltan el papel central del NAcb en la adaptación neural a la nicotina crónica y llaman la atención sobre su posible participación en efectos que se mantienen en ausencia de la droga.

La sensibilización locomotriz persiste durante la retirada de la nicotina y por tanto se ha sugerido que hace parte de las adaptaciones comportamentales responsables de fenómenos de consumo propios de este periodo (Baker et al., 2013; DiFranza & Wellman, 2007). Estas observaciones son comunes en la literatura y se han sugerido como un paradigma para el estudio de procesos de plasticidad neural en la adaptación a las drogas (DiFranza & Wellman, 2007; Volkow, 2011)

Por otro lado, aunque menos estudiados, también se han reportado efectos de la nicotina sobre la memoria espacial. Estos resultados son mixtos (Kutlu & Gould, 2015). En un estudio con ratas Sprague-Dawley sometidas a inyecciones s.c. de nicotina (2 mg/kg) por diez días antes de la evaluación comportamental, se reportó una facilitación del aprendizaje en el laberinto acuático de Morris que se relacionó con un incremento en el número de RCN en el hipocampo y la corteza entorrinal (Abdulla et al., 1996). En contraste, en un estudio con ratas de la misma cepa a las que se les implantaron mini bombas osmóticas s.c. con nicotina (4 mg/kg) por diez días se reportó un

deterioro del aprendizaje en el laberinto acuático de Morris, así como una reducción en la proliferación celular en la circunvolución dentada del hipocampo (Scerri et al., 2006). Las diferencias entre estos estudios resaltan la relevancia de factores como la dosis, los esquemas de administración, los procedimientos de evaluación comportamental y la relación temporal entre el tratamiento y las situaciones de aprendizaje para el estudio de los efectos de la nicotina sobre la memoria espacial (Kutlu & Gould, 2015).

En este mismo contexto, se han descrito importantes relaciones entre la nicotina y procesos de potenciación a largo plazo (PLP), un mecanismo putativo para la formación de la memoria (Kenney & Gould, 2008; McGaugh, 2000). Por ejemplo, se ha mostrado que la activación de RCN ejerce efectos facilitadores de la PLP en múltiples componentes de la formación hipocampal considerados importantes para el aprendizaje y la memoria (Fujii et al., 1999). Además, se ha reportado que la nicotina suprime la actividad de las proteínas deacetilasas de histonas (HDAC por sus siglas en inglés) (Levine et al., 2011), un resultado importante considerando que dicha supresión mejora procesos de PLP y favorece la consolidación de la memoria espacial en el laberinto circular de Barnes (Vargas-López, 2017).

Hasta aquí, se han comentado variados efectos de la nicotina a nivel cerebral. Entre estos, se ha mencionado su capacidad para alterar de manera crónica la estructura y función de regiones cerebrales como el NAcb (Morud et al., 2016, 2018) y se ha mencionado su relación con un mecanismo epigenético (inhibición de las HDAC), que podría dar pie a dichas modificaciones (Volkow, 2011). Además se señaló su capacidad para afectar procesos de memoria espacial y en el marco de los múltiples sistemas de aprendizaje y memoria paralelos, se mencionó el papel de estructuras como el NAcb en la coordinación entre diferentes sistemas de memoria (Gruber & McDonald, 2012). Considerando que, de manera adicional, la región *Shell* del núcleo accumbens

(AcbSh) hace parte de un complejo anatómico denominado amígdala extendida (Alheid, 2006; Koob & Schulkin, 2019) y que este complejo junto con el eje Hipotálamo-Pituitario-Adrenal (HPA) controlan la respuesta de estrés, el miedo y la ansiedad, en el presente trabajo se hipotetizó que al sufrir las remodelaciones provocadas por la droga, la adaptación de los sistemas emocionales cerebrales (i.e. amígdala extendida y eje HPA) podría resultar en una modificación de las acciones moduladoras de la respuesta de estrés sobre el aprendizaje y la memoria.

Acciones moduladoras de la respuesta de estrés en el cerebro, el aprendizaje y la memoria

La respuesta de estrés consiste en un conjunto de reacciones fisiológicas coordinadas que ocurren frente a amenazas a la integridad del organismo, ya sean reales o potenciales; esta respuesta está integrada principalmente por los componentes autónomo y neuroendocrino (Lupien et al., 2009; Tasker & Joëls, 2015). El componente autónomo implica la activación de la médula de la glándula adrenal que resulta en la liberación de adrenalina en el torrente sanguíneo (Kvetnansky et al., 2009). Por su parte, el componente neuroendocrino implica la activación del eje HPA y resulta en la liberación de corticosteroides en el torrente sanguíneo; la respuesta de este componente inicia con la estimulación de células neurosecretoras en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) que producen el factor liberador de corticotropina (CRF por sus siglas en inglés); a su vez el CRF liberado estimula células en el lóbulo anterior de la glándula pituitaria que liberan la hormona adrenocorticótropa (ACTH) la cual alcanza la corteza de las glándulas adrenales y estimula la liberación de hormonas corticosteroides en el torrente sanguíneo (Spencer & Deak, 2017). Estas hormonas ejercen efectos en múltiples sistemas a través de la modulación de funciones orgánicas esenciales (Chrousos, 1992; Tasker & Joëls, 2015).

Los efectos de las hormonas corticosteroides están mediados por la actividad de sus receptores. Estos están ampliamente distribuidos en el organismo y su presencia en el cerebro es importante, pues allí cumplen principalmente dos funciones: 1) proporcionar un mecanismo de retroalimentación negativa para la actividad del eje HPA, para suprimir la respuesta del componente neuroendocrino que activada por tiempos prolongados podría tener un efecto deletéreo a nivel orgánico y 2) ejercer una acción moduladora en la actividad de estructuras cerebrales centrales en la regulación del comportamiento como el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal (McEwen et al., 2016; Spencer & Deak, 2017; Tasker & Joëls, 2015). Al respecto, se han descrito dos tipos de mecanismos de acción que explican los efectos de los corticosteroides según la escala temporal en la que actúan: 1) mecanismos rápidos o no genómicos, posiblemente relacionados con acciones a nivel de receptores localizados en la membrana celular y 2) mecanismos tardíos o genómicos, relacionados con la regulación de procesos de síntesis de nuevas proteínas por medio del control de la trascripción del ADN en el núcleo de las células (McEwen et al., 2015; Stahn & Buttgereit, 2008).

Por otra parte, la influencia del estrés sobre el aprendizaje y la memoria ha sido descrita extensamente. Los efectos observados son dependientes de varios factores, entre esos, el momento en que ocurran los eventos estresantes con relación a la situación de aprendizaje y el tipo de tarea evaluada (Schwabe & Wolf, 2013) (Figura 2). Por ejemplo, Troncoso et al. (2010) describieron un efecto de interferencia del estrés sobre la evocación de la memoria espacial en el laberinto circular de Barnes (LCB). En ese estudio ratas entrenadas en la tarea espacial fueron sometidas a estrés por restricción de movimientos antes de la prueba de recobro, como resultado, los animales gastaron más tiempo en encontrar la caja de escape y cometieron más errores en la exploración del laberinto; curiosamente, en ese mismo estudio se observó un efecto opuesto en otro proceso relacionado con

el aprendizaje y la memoria espacial: la extinción. En ese caso, el estrés tuvo un efecto facilitador sobre la extinción de la memoria espacial, en términos de una menor persistencia en la exploración del agujero meta.

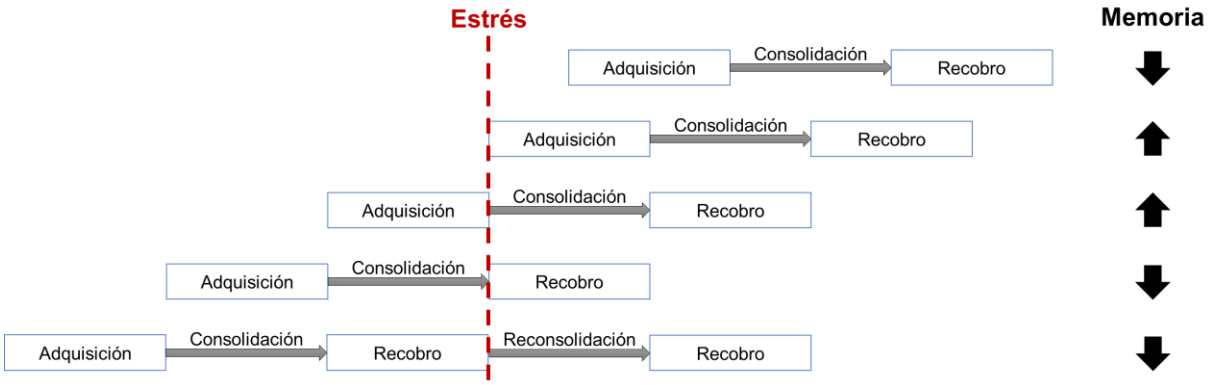


Figura 2. Efectos del estrés sobre la memoria. Se presenta un resumen de los efectos del estrés sobre la memoria, cuando el estrés ocurre en diferentes momentos de tareas tradicionalmente consideradas dependientes de hipocampo. Adaptado de (Schwabe & Wolf, 2013).

Desde una perspectiva funcional, una propiedad fundamental de los sistemas de estrés es su susceptibilidad a la influencia ambiental y su adaptabilidad (de Kloet et al., 2005; Tasker & Joëls, 2015). Existe considerable evidencia sobre procesos de plasticidad dependientes de la experiencia en el eje HPA y las estructuras que regulan su actividad (Matthews & McGowan, 2019; Spencer & Deak, 2017). No obstante, el énfasis fundamental de esta literatura ha sido mostrar que el estrés en periodos críticos del desarrollo conlleva a adaptaciones en la sensibilidad de los sistemas de estrés (Eiland & Romeo, 2013), pero se supone que el estrés continúa teniendo un impacto considerable en el funcionamiento cerebral a lo largo del ciclo vital (Lupien et al., 2009). Esto, resalta la importancia de estudiar las relaciones del estrés con el funcionamiento cerebral en contextos menos explorados.

Por último, la respuesta de estrés parece tener una contribución importante en los trastornos mentales (de Kloet et al., 2005). Por ejemplo, se ha mostrado que el estrés es un factor de riesgo para el consumo abusivo de sustancias (Mukhara et al., 2018; Sinha, 2008). De hecho, se ha mostrado que la autoadministración de drogas estimulantes es dependiente de los niveles de corticosteroides circulantes; por ejemplo, la autoadministración de cocaína fue suprimida en ratas adrenalectomizadas y este efecto fue revertido de manera dosis dependiente por un tratamiento con corticosteroides (Marinelli et al., 1997). Sin embargo, esta relación no es simple. En un estudio de autoadministración de nicotina con ratas Chen et al. (2008) mostraron que de manera aguda esta droga ejerce un efecto estimulante en la actividad del eje HPA; sin embargo, ante la exposición repetida la respuesta del eje HPA se vio atenuada frente la droga, pero se incrementó la sensibilidad frente a un estresor agudo novedoso. En ese estudio se encontró un incremento en los niveles de hormona adrenocorticótropa (ACTH) y de la corticosterona cerca de 30 minutos después de la primera autoadministración de nicotina, este efecto desapareció después del tercer día de autoadministración, pero después de 20 días de autoadministración, la nicotina indujo sensibilización de la respuesta de ACTH y corticosterona ante una descarga eléctrica leve. Al respecto se ha sugerido que las adaptaciones de sistemas cerebrales implicados en la respuesta de estrés y de aquellos implicados en las funciones de refuerzo juegan un papel importante en los trastornos por abuso de sustancias; de este modo, el estudio de las relaciones anatómicas y funcionales entre estos sistemas sería importante para resolver las presuntas interacciones entre el uso de sustancias y el estrés (Koob & Schulkin, 2019).

A manera de resumen, múltiples sistemas de aprendizaje y memoria interactúan para producir respuestas ajustadas a las exigencias del ambiente (White et al., 2013). Sin embargo,

dichas interacciones pueden resultar en patrones de respuesta anormales cuando se encuentran bajo la influencia de eventos que afectan la organización cerebral (McDonald et al., 2004). En este sentido, las adaptaciones comportamentales que ocurren en respuesta a las drogas se podrían estudiar desde el marco de múltiples sistemas de memoria paralelos (McDonald et al., 2017). Según este marco de referencia, las drogas tendrían el potencial para reclutar mecanismos de reorganización cerebral importantes para la formación de la memoria y en situaciones de aprendizaje, generarían un desbalance en la interacción que existe entre estos diferentes sistemas (Hyman, 2005; Kelley, 2004; McDonald et al., 2017). El potencial de las drogas para generar adaptaciones comportamentales de largo plazo radica en su capacidad para promover procesos de reorganización neural, que afectan funciones cerebrales fundamentales (e.g. refuerzo y respuesta de estrés) y en consecuencia, la sensibilidad individual a diferentes estímulos y a las situaciones de aprendizaje (Hyman, 2005; Volkow, 2011). En el presente estudio se examinó la adaptación a largo plazo de sistemas emocionales cerebrales y su modulación de procesos de aprendizaje y memoria espacial, durante un periodo de retirada prolongada posterior a la exposición crónica a nicotina.

Justificación

Las adaptaciones comportamentales inducidas por la nicotina han sido ampliamente examinadas y existe considerable evidencia para señalar que la nicotina favorece procesos de plasticidad neural importantes para el aprendizaje y la memoria (Fujii et al., 1999); sin embargo, el énfasis en el estudio de esta droga ha sido mayor en sus efectos sobre comportamientos de búsqueda y consumo, o en la influencia de esta droga sobre la motivación por otros reforzadores, de modo que los efectos de la aplicación sistémica de la nicotina en el aprendizaje y la memoria no son concluyentes (Kutlu & Gould, 2015). Aún más, drogas como la nicotina y sus efectos comportamentales parecen tener una relación estrecha con sistemas cerebrales de estrés (Chen et al., 2008; Koob & Schulkin, 2019); sin embargo, estas relaciones también permanecen sin aclarar. Dado el importante papel del estrés en la modulación del aprendizaje y la memoria (McEwen et al., 2016; Tasker & Joëls, 2015), así como su hipotética contribución a los desórdenes mentales (de Kloet et al., 2005); el estudio de las relaciones entre el estrés, las drogas y su influencia sobre el aprendizaje y la memoria constituye un campo interesante para el estudio de las consecuencias a largo plazo del uso de sustancias con potencial de abuso.

Además, este campo no sólo representa un desafío llamativo para la investigación básica, sino que se enmarca en el contexto de uno de los problemas de salud pública más relevantes en la actualidad. La nicotina se considera responsable del consumo abusivo de tabaco (Brown & Gill, 2019). Esta práctica resulta en millones de muertes prematuras prevenibles al año alrededor del mundo y este es un problema con mayor impacto en países en vía de desarrollo (WHO, 2020). En últimas, el estudio de las relaciones sugeridas en este trabajo podría contribuir a la iniciativa de la organización mundial de la salud de advertir acerca de los riesgos del consumo de tabaco.

Hipótesis

La evidencia respecto a los efectos de la nicotina en el aprendizaje y la memoria espacial no es conclusiva; sin embargo, la evidencia revisada permite señalar que la nicotina tiene el potencial para producir adaptaciones de la función cerebral a largo plazo (Becker et al., 2017; Morud et al., 2018). Por una parte, estas adaptaciones podrían implicar el reclutamiento de sistemas cerebrales de aprendizaje y memoria, produciendo efectos globales sobre estos procesos y podrían ser observados directamente a través del desempeño en pruebas de memoria, incluso en ausencia de la droga. Por otra parte, estas adaptaciones podrían implicar el reclutamiento de sistemas cerebrales con acciones moduladoras sobre el aprendizaje y la memoria, en este caso, las consecuencias de la exposición a la nicotina serían observadas en respuesta a desafíos con agentes moduladores del desempeño en tareas de memoria, posterior a la retirada de la droga.

Se esperaría que el tratamiento crónico con nicotina genere adaptaciones comportamentales de largo plazo. Estas deberían ser observables desde etapas tempranas del tratamiento y por tanto, con el diseño utilizado en este trabajo se espera reproducir el efecto de sensibilización locomotriz comúnmente reportado en la literatura (Morud et al., 2016). A largo plazo, no se encontró literatura específica que permitiera predecir el efecto de la nicotina en la memoria espacial en una ventana temporal de 30 días; sin embargo, considerando los efectos a largo plazo de la nicotina sobre conductas de ansiedad y la posibilidad de que el aprendizaje y la memoria espacial sean modulados por dicho proceso, se esperaría observar un efecto modulador de la nicotina en la tarea espacial del laberinto de Barnes (Becker et al., 2017; Harrison et al., 2006; Morud et al., 2018); al respecto, no se encontró suficiente información para predecir la dirección de dicha modulación.

Por otro lado, con relación a los efectos del estrés sobre el recobro de la tarea espacial en el laberinto de Barnes, se esperaría reproducir el efecto deletéreo reportado por Troncoso et a. (2010). En cuanto al efecto del estrés posterior al pretratamiento con nicotina, considerando que se ha reportado que esta droga incrementa las conductas de ansiedad (Becker et al., 2017), se esperaría que esto resulte en una mayor respuesta neuronal en regiones relacionadas con la respuesta de estrés, al igual que en un mayor deterioro del recobro de la memoria.

Objetivos

Objetivo general

Examinar las adaptaciones a largo plazo de sistemas emocionales cerebrales y su modulación de procesos de aprendizaje y memoria espacial, durante un periodo de retirada prolongada posterior a la exposición crónica a nicotina.

Objetivos específicos

1. Analizar el efecto de la nicotina crónica sobre la actividad locomotriz en el campo abierto a lo largo del tratamiento farmacológico.
2. Evaluar los efectos a largo plazo de la nicotina crónica sobre el aprendizaje y el recobro de una tarea de memoria espacial durante un periodo de retirada prolongada.
3. Evaluar los efectos del estrés agudo sobre el recobro de una tarea de memoria espacial, durante un periodo de retirada prolongada posterior a la exposición crónica a nicotina.
4. Estimar la actividad neuronal frente al estrés en regiones cerebrales relacionadas con la respuesta emocional durante un periodo de retirada prolongada posterior a la exposición crónica a nicotina.

Métodos

Sujetos

Se utilizaron 48 ratas Wistar macho suministradas por el Instituto Nacional de Salud en Bogotá D.C. Los sujetos fueron albergados grupalmente en el bioterio de mantenimiento del Laboratorio de Neurociencias del Departamento de Psicología de la Universidad Nacional de Colombia, desde el día posnatal (DPN) 63 hasta el DPN 123. Durante este periodo, los animales permanecieron bajo condiciones de temperatura controlada (20 ± 1 °C), un ciclo de luz-oscuridad de 12-12h (inicio: 7:00 am), en cajas de polietileno (ancho: 34 cm, largo: 41 cm, alto: 16 cm), en grupos de tres animales con acceso libre a agua y comida y con encamado de viruta de madera cambiado periódicamente (cada dos días).

Diseño

Se utilizó un diseño experimental mixto compuesto por dos experimentos (Figura 3). El primer experimento tuvo como propósito evaluar los efectos comportamentales de la nicotina crónica y su retirada prolongada. Para esto se implementó un diseño de un factor con dos niveles: vehículo (n=11) y nicotina (n=11). El primer experimento se compuso de dos fases: validación del tratamiento farmacológico y evaluación del aprendizaje y la memoria espacial. En la primera fase se analizaron las variables dependientes: distancia total recorrida y distancia recorrida en el centro del campo abierto. En la primera fase se analizaron las variables dependientes: latencia al agujero meta, errores ponderados hasta la primera exploración del agujero meta, latencia al primer agujero y velocidad hasta la primera exploración del agujero meta en el laberinto circular de Barnes.

El segundo experimento tuvo como propósitos evaluar la replicabilidad de los resultados del primer experimento y examinar los efectos del estrés agudo sobre el recobro de la tarea espacial en el laberinto circular de Barnes (LCB) durante la retirada prolongada de la nicotina crónica. Para esto se implementó un diseño de un factor con dos niveles: vehículo (n=11) y nicotina (n=11). El segundo experimento se compuso de tres fases: validación del tratamiento farmacológico, evaluación del aprendizaje y la memoria espacial y recolección y procesamiento de muestras de tejido cerebral. En la primera fase se analizaron las variables dependientes: distancia total recorrida y distancia recorrida en el centro del campo abierto. En la primera fase se analizaron las variables dependientes: latencia al agujero meta, errores ponderados hasta la primera exploración del agujero meta, latencia al primer agujero y velocidad hasta la primera exploración del agujero meta en el laberinto circular de Barnes. En la tercera fase se analizó la variable dependiente: número de células inmunopositivas para la proteína c-Fos en dos regiones cerebrales (núcleo paraventricular del hipotálamo y región *Shell* del núcleo accumbens).

Adicionalmente, en el segundo experimento se utilizó un grupo adicional de cuatro animales para determinar los niveles basales de expresión de la proteína c-Fos. Estos animales fueron albergados en el bioterio durante un periodo equivalente al de los procedimientos experimentales y fueron sacrificados para la obtención de muestras en la misma edad que los animales con tratamiento.

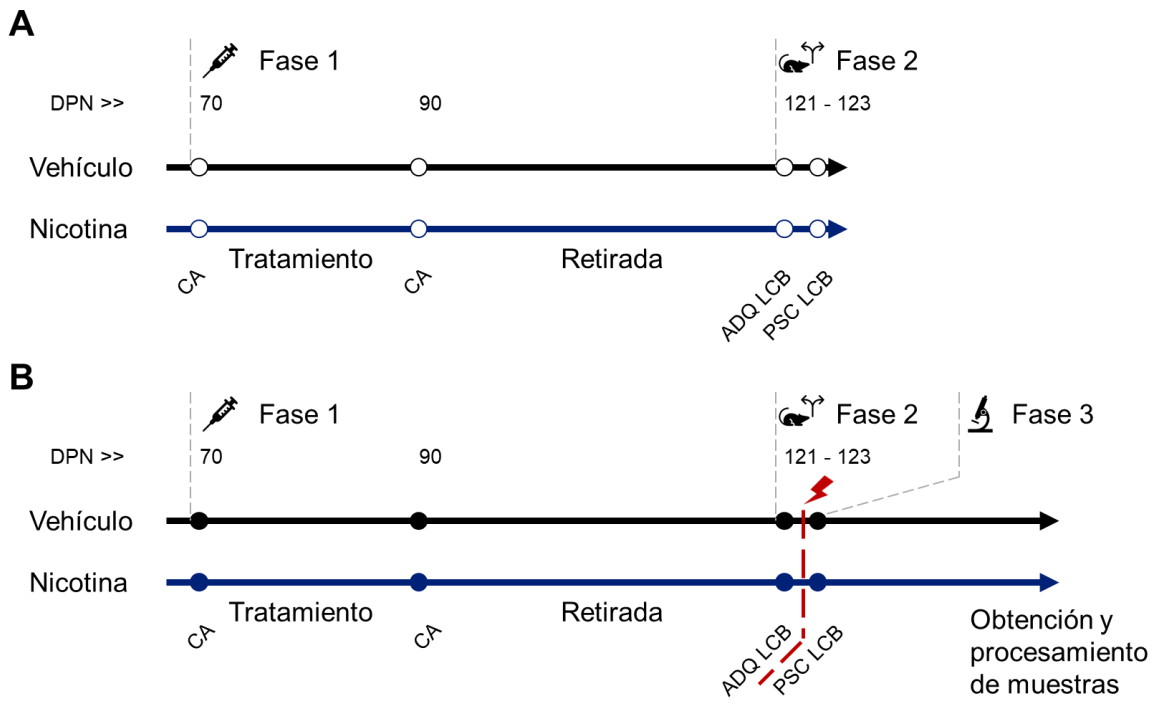


Figura 3. Diseño experimental. **A**. Esquema del primer experimento. Se señala la edad en días posnatales (DPN) en el momento de las pruebas de campo abierto (CA), la adquisición de la tarea espacial y la prueba de recobro en el laberinto circular de Barnes (ADQ LCB y PSC LCB, respectivamente). **B**. Esquema del segundo experimento. Se señala la edad en días posnatales (DPN) en el momento de las pruebas de campo abierto (CA), la adquisición de la tarea espacial y la prueba de recobro en el laberinto circular de Barnes (ADQ LCB y PSC LCB, respectivamente). Además, el marcador rojo señala la exposición al estresor antes de la PSC LCB.

Materiales y Equipos

Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Neurociencias del Departamento de Psicología de la Universidad Nacional de Colombia. El laboratorio de Neurociencias proporcionó los elementos de protección personal a los investigadores, los insumos para el mantenimiento de los animales experimentales, los materiales para la conservación y procesamiento de muestras de tejido cerebral y los equipos para la obtención y procesamiento de los datos. La Fundación Universitaria Konrad Lorenz proporcionó los animales experimentales e insumos para el tratamiento farmacológico. El seccionamiento de las muestras

de tejido cerebral se realizó en las instalaciones del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

Instrumentos.

Campo abierto (CA). Consiste en una plataforma rectangular de acrílico negro opaco (ancho: 60 cm, largo: 60 cm), rodeada por paredes del mismo material (alto: 60 cm). El instrumento es iluminado homogéneamente (50 ± 2 lx) por una fuente de luz incandescente amarilla (potencia: 70 W) instalada en el techo de la cabina junto a una cámara de video. Esta plataforma es dividida virtualmente en dos regiones: centro y periferia. El centro corresponde a la porción rectangular de 20 x 20 cm ubicada en el centro de la plataforma; la periferia corresponde al área restante de la plataforma (Figura 4). Las sesiones experimentales son grabadas por medio de un circuito cerrado de televisión.

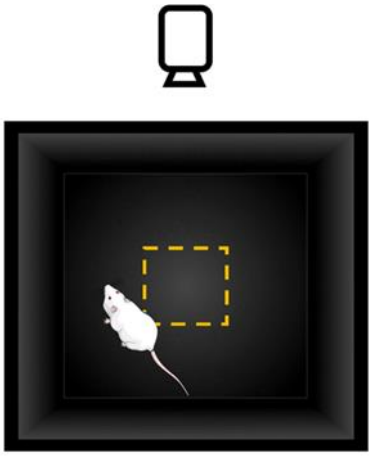


Figura 4. Campo Abierto. Se representa la delimitación virtual de las regiones del campo, en centro se encuentra rodeado por la línea punteada amarilla, la periferia corresponde al área restante.

Laberinto Circular de Barnes (LCB). Consiste en una plataforma circular de acrílico negro (diámetro: 122 cm), elevada del suelo (altura: 80 cm) y ubicada en el centro de una cabina experimental. En la periferia de la plataforma hay 18 agujeros circulares (diámetro: 9.5 cm) ubicados equidistantemente entre sí (ángulo: 20°) y desde el borde de la plataforma (distancia: 10 cm) (Figura 5).

El instrumento cuenta con una caja de salida y una caja de escape. La caja de salida consiste en una caja cilíndrica de acrílico blanco (diámetro: 25 cm, alto 10 cm) que se ubica sobre el centro de la plataforma al inicio de cada ensayo y puede ser movida libremente por el experimentador por medio de una manija. La caja de escape consiste en una caja rectangular (ancho: 8.75 cm, largo: 25 cm, alto: 10 cm) que puede ser emplazada debajo de cualquiera de los agujeros de la plataforma.

La cabina experimental se encuentra aislada del ruido ambiental. En el techo de la cabina están instaladas una cámara de vídeo, una fuente de ruido blanco (volumen: 75 dB) y una fuente de luz fluorescente blanca (potencia: 300 W), alineadas con el centro de la plataforma. En una de las cuatro paredes de la cabina experimental se encuentra una fuente de luz incandescente roja (potencia: 60 W); esta luz es alternada con la luz blanca a través de un circuito controlado por el experimentador. En las tres paredes restantes de la cabina experimental se encuentran claves visuo-espaciales extra-laberínticas. Dichas claves se mantienen en una ubicación fija y a una distancia media de 45 cm desde el borde de la plataforma. Adicionalmente, en la cabina experimental se encuentra una caja de consolidación, que consiste en una caja rectangular de polipropileno (ancho: 32 cm, largo: 42 cm, alto: 31 cm), esta caja se utiliza para ubicar a los animales durante los intervalos inter-ensayo. Las sesiones experimentales son grabadas por medio de un circuito cerrado de televisión.

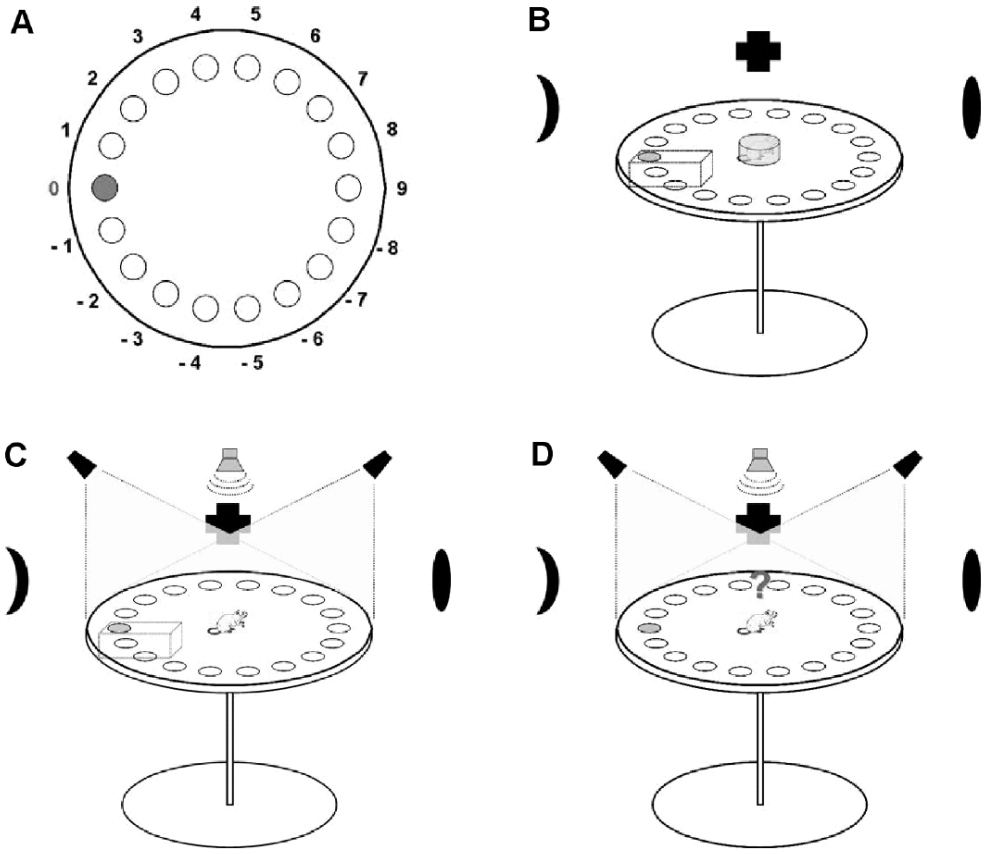


Figura 5. Laberinto Circular de Barnes. **A**. Representación en vista superior del LCB, se destaca la ubicación del agujero meta en gris (Agujero 0) y la posición de los demás agujeros respecto a este (Agujeros 1 a 9 y -1 a -8). **B**. Representación del inicio de cada ensayo, el animal es ubicado debajo de la caja de salida por 30 segundos. **C**. Representación de los ensayos de adquisición, la caja de escape se emplaza debajo de uno de los agujeros y al animal se le permite explorar hasta cuatro minutos, mientras tanto la luz y ruido blancos permanecen encendidos. **D**. Representación de la prueba sin caja, al animal se le permite explorar hasta cuatro minutos, mientras tanto la luz y ruido blancos permanecen encendidos, sin la caja de escape emplazada en el laberinto. Tomado de Troncoso et al. (2010).

Restrictor de movimiento para ratas. Consiste en un cilindro de PVC (diámetro: 6 cm, largo 17 cm), con tapas removibles en los extremos y agujeros que permiten la entrada de aire y la salida de la cola del animal. Este instrumento limita el desplazamiento y la rotación fronto-caudal de los animales sin interferir con su respiración (Troncoso et al., 2010)(Figura 6).

Figura 6. Restrictor de movimientos. El animal es ubicado en el interior del restrictor por una hora.

Fármacos.

Nicotina. Se utilizó hidrógeno tartrato de nicotina disuelta en solución salina 0.9% como tratamiento farmacológico (dosis: 0.14mg/kg base libre). La solución de nicotina se niveló a pH 7.4 utilizando NaOH 1M. El esquema del tratamiento farmacológico se describe en la sección de procedimientos. Código del producto: GL9693, Glentham Life Sciences.

Uretano. Se utilizó Uretano disuelto en agua destilada como agente anestésico previo a la perfusión transcardiaca (dosis: 1.25 g/kg). Código del producto: U 2500, Sigma-Aldrich Corporation.

Equipos.

Criostato. Se utilizó un criostato Leica CM1850 para obtener cortes coronales de las muestras de tejido cerebral (grosor: 30 µm).

Microscopio. Se utilizó un microscopio de transmisión de luz Zeiss Axiostar Plus con cámara digital Zeiss AxioCam ERc5s, para el examen de las muestras procesadas por inmunohistoquímica y la obtención de microfotografías.

Software.

ANY-maze. Se utilizó el software ANY-maze v.5.11 para registrar el desplazamiento horizontal de los animales durante las pruebas de actividad locomotriz y la tarea espacial de Barnes; de manera simultánea, se registraron manualmente otros comportamientos de exploración.

ImageJ. Se implementó un protocolo de cuantificación automática con el software ImageJ, para determinar el número células inmunopositivas para la proteína c-Fos en diferentes estructuras cerebrales. Brevemente, las microfotografías obtenidas del ensayo de inmunohistoquímica fueron procesadas por medio del software para obtener imágenes binarias basadas en intensidad óptica supraumbral, después de esta transformación, las imágenes fueron procesadas por medio de la función Analyze Particles, disponible en la versión por defecto del software. Los parámetros de cuantificación fueron optimizados con una submuestra aleatoria de fotografías por cada estructura cerebral. Posteriormente se aplicó el protocolo de manera simultánea a las fotografías de cada región con la función batch. El protocolo se presenta en el Anexo 1.

R Studio. Se utilizó el programa estadístico R Studio v.4.0.0 para ejecutar los análisis de función de cambio y de componentes principales. Para esto, se utilizaron los paquetes: rogme,

cowplot, tibble, gridExtra, tidyr, psych, FactoMineR, factoextra, corrplot y ggplot2 (Ver Anexo 2 Anexo 3).

SPSS. Se utilizó el programa estadístico SPSS v.22 para ejecutar las pruebas t de medidas independientes, los análisis de varianza y las exploraciones de cumplimiento de supuestos (Ver Anexo 4).

Paquete ofimático Microsoft Office 365. Se utilizaron diferentes programas del paquete para desarrollar la diagramación del contenido del presente documento y las presentaciones derivadas de este.

Bases de datos.

Se utilizó una base de datos tomada del estudio de Ballesteros Cadena (2018) para realizar un análisis de la estructura multivariada de la tarea espacial del LCB por medio de una análisis de componentes principales. En ese estudio los animales fueron entrenados en el instrumento según el procedimiento descrito en el presente trabajo, sin recibir ningún tratamiento adicional. La base de datos estaba compuesta por las observaciones de 37 sujetos durante el primer ensayo de adquisición (A1), el último ensayo de adquisición (A8) y una prueba de recobro con caja (PCC). Las variables incluidas en la base de datos fueron:

- Latencia al agujero meta (Lat.): Tiempo en segundos desde el inicio del ensayo hasta que el animal entra a la caja de escape.
- Latencia al primer agujero (LpA.): Tiempo en segundos desde el inicio del ensayo hasta que el animal explora el primer agujero.

- Distancia recorrida (Dist.): Distancia total recorrida en cm desde el inicio del ensayo hasta que el animal entra a la caja de escape.
- Errores (Err.): Número total de exploraciones en agujeros diferentes al meta desde el inicio del ensayo hasta que el animal entra a la caja de escape.
- Errores ponderados (EPR.): Número total de exploraciones en agujeros diferentes al meta desde el inicio del ensayo hasta que el animal entra a la caja de escape, ponderados por la distancia recta en cm respecto al agujero meta.
- Velocidad (Vel.): Velocidad promedio en centímetros por segundo desde el inicio del ensayo hasta que el animal entra a la caja de escape.

Procedimientos

Fase 1: Validación del tratamiento farmacológico.

Después de su instalación en el bioterio los animales pasaron por un periodo de aclimatación de cuatro días durante los cuales sólo fueron manipulados para realizar el cambio de encamado. Durante los tres días inmediatamente anteriores al inicio del tratamiento farmacológico, los animales fueron manipulados durante cinco minutos al día; a partir de este periodo los animales fueron pesados a diario hasta el final de los experimentos. Antes de iniciar el tratamiento los animales fueron asignados aleatoriamente al grupo Vehículo (Veh) o Nicotina (Nic). Todos los procedimientos experimentales se realizaron entre las 7:00 am y las 12:30 pm.

El tratamiento farmacológico consistió en un esquema de una inyección subcutánea diaria por un periodo de 21 días, comprendido entre DPN 70 y DPN 90, el contenido de la inyección según el grupo era el siguiente:

- Vehículo: 1 ml/kg de solución salina estéril NaCl 0.9%.
- Nicotina: 0.14 mg/kg de hidrógeno tartrato de nicotina en solución con vehículo.

Durante esta fase se evaluó la actividad locomotriz de los animales en el campo abierto, en cuatro pruebas distribuidas de la siguiente manera:

- Prueba 1 (Línea Base): cinco minutos de actividad libre en el campo abierto el primer día de tratamiento antes de recibir la inyección.
- Prueba 2 (Desafío agudo): cinco minutos de actividad libre en el campo abierto el primer día de tratamiento diez minutos después de recibir la inyección.
- Prueba 3 (Reexposición): cinco minutos de actividad libre en el campo abierto el último día de tratamiento antes de recibir la inyección.
- Prueba 4 (Desafío crónico): cinco minutos de actividad libre en el campo abierto el último día de tratamiento 10 minutos después de recibir la inyección.

Durante el primer día de tratamiento, cada animal fue tomado del bioterio y transportado en una caja de poliestireno expandido hacia una cabina experimental donde fue ubicado en el centro del campo abierto y se le permitió la exploración libre del instrumento durante cinco minutos (Prueba 1). El experimentador permaneció fuera de la cabina durante este periodo. Al completar la Prueba 1, cada animal fue transportado a la cabina de inyecciones para aplicar el tratamiento correspondiente e inmediatamente después de recibir la inyección, el animal fue regresado a la cabina del campo abierto en donde permaneció dentro de la caja de transporte durante diez minutos después de la inyección. Al terminar este periodo el animal fue ubicado nuevamente en el centro del campo abierto y se le permitió la exploración libre del instrumento durante cinco minutos (Prueba 2). Al terminar la Prueba 2 el animal fue regresado al bioterio.

Durante el día 21 de tratamiento se repitieron los procedimientos del primer día (Prueba 3 y Prueba 4). Las pruebas de actividad locomotriz fueron grabadas en video y posteriormente se procesaron con el software ANY-maze (Figura 7).

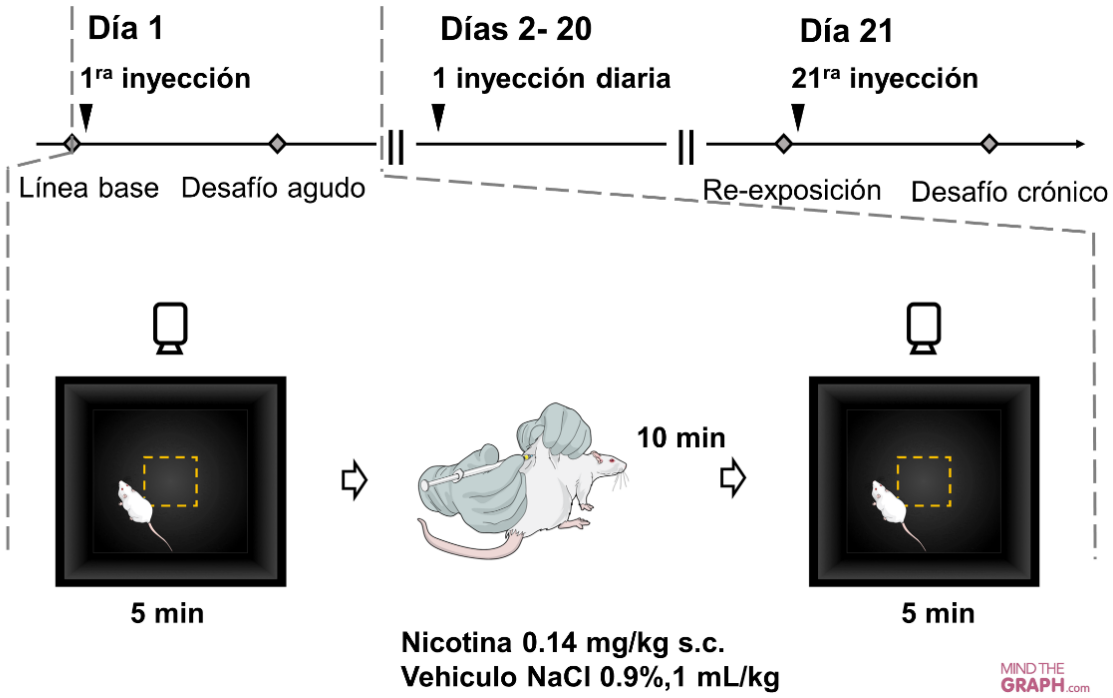


Figura 7. Procedimientos para evaluación de actividad locomotriz. La evaluación de la actividad locomotriz se realizó durante la primera fase de los experimentos para confirmar la efectividad de la dosis de nicotina utilizada. La línea punteada amarilla en la plataforma representa la división virtual de las regiones del campo: centro y periferia. Modificado de Ortega et al. (2019).

Durante los días 2 al 20 de tratamiento, los animales sólo recibieron la inyección de vehículo o nicotina según el grupo al que fueron asignados. Posterior a la finalización del tratamiento farmacológico y de la evaluación de la sensibilización locomotora, los animales se sometieron a un periodo de retirada prolongada de 30 días. Durante este periodo los animales únicamente se manipularon para realizar el registro de peso diario y el cambio de encamado cada dos días, a excepción de los últimos tres días cuando los animales fueron manipulados durante cinco minutos.

Fase 2: Evaluación del aprendizaje y la memoria espacial.

El día 31 después de la finalización del tratamiento farmacológico (DPN 121), se inició la evaluación del aprendizaje y la memoria espacial en el Laberinto Circular de Barnes (LCB). Brevemente, cada animal fue tomado del bioterio y transportado a la cabina experimental del LCB para realizar los siguientes procedimientos: el primer día de esta fase cada animal fue familiarizado con los elementos del laberinto de manera secuencial en una sesión de aproximadamente doce minutos; el segundo día los animales fueron sometidos a una sesión de entrenamiento masivo compuesta por ocho ensayos con periodos inter-ensayo de cuatro minutos; el tercer día los animales fueron sometidos a una prueba de recobro de cuatro minutos. La sesión de entrenamiento y la prueba de recobro de la tarea espacial en el LCB fueron grabadas en video y posteriormente se procesaron con el software ANY-maze.

En cada ensayo de entrenamiento el animal fue ubicado en el centro de la plataforma bajo la caja de salida durante 30 segundos, después de esto se levantaba la caja y se le permitía la exploración libre del laberinto por un tiempo máximo de cuatro minutos; durante este tiempo las fuentes de luz y ruido blancos permanecían encendidas. Transcurrido este periodo, si el animal no ingresaba a la caja de escape era conducido hasta ella por el experimentador. Para cada animal se asignó aleatoriamente un agujero debajo del cual se ubicó la caja de escape. Durante la prueba (PSC), los animales exploraron el laberinto durante cuatro minutos sin la caja emplazada en la plataforma. El protocolo de esta tarea se describió con mayor detalle por Vargas-López et al. (2011) (Figura 8A).

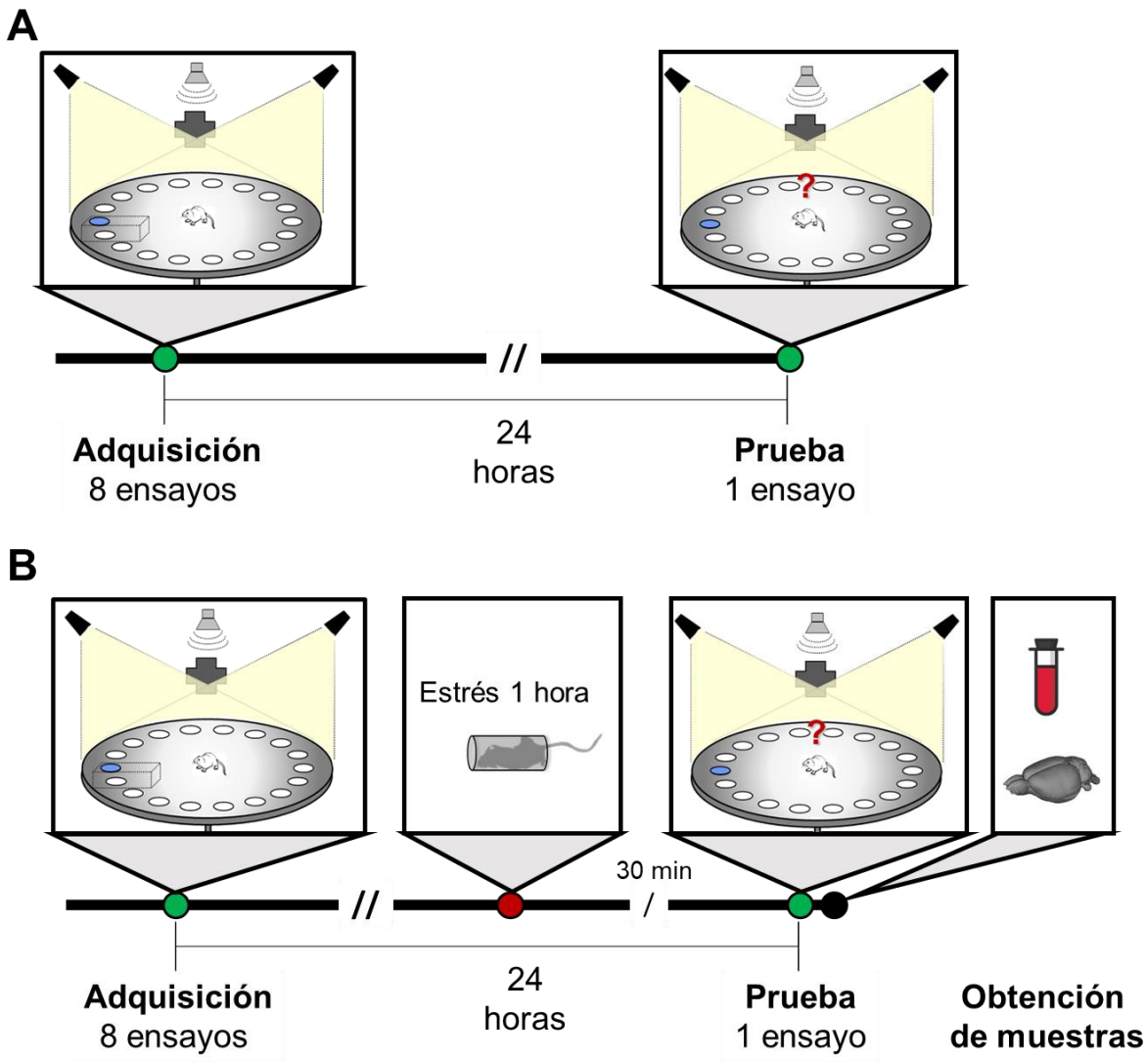


Figura 8. Procedimientos para evaluación del aprendizaje y la memoria espacial. A. Esquema del primer experimento. La adquisición en el LCB consiste en ocho ensayos y la prueba en un único ensayo realizado 24 horas después del inicio de la adquisición. **B**. Esquema del segundo experimento. El estrés por restricción de movimientos se aplicó 1 hora y 30 minutos antes de la prueba en el LCB. La duración del estrés fue 1 hora, inmediatamente después los animales fueron dejados en una caja de recuperación por 30 minutos, inmediatamente después se realizó la prueba en el LCB y posteriormente la obtención de muestras biológicas. Modificado de Solano López (2019).

Durante esta última etapa de evaluación de la memoria espacial los animales del segundo experimento fueron evaluados posterior a la inducción de estrés agudo por restricción de movimientos. Para esto, 1 hora y 30 minutos antes de la hora programada para la prueba de recobro,

los animales fueron tomados del bioterio y transportados a una cabina adyacente, allí fueron introducidos suavemente en un restrictor de movimientos por un periodo de una hora. Concluido este periodo, fueron devueltos al bioterio donde permanecieron por 30 minutos, antes de ser llevados a la cabina experimental del LCB para la prueba de recobro descrita previamente (Figura 8B).

Fase 3: Obtención y procesamiento de muestras de tejido cerebral.

Al terminar la prueba de recobro los animales fueron transportados a la cabina de inyecciones en donde fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de Uretano (dosis: 1.25 g/kg). Posteriormente fueron sometidos a un procedimiento de perfusión transcardiaca con 100 mL de PBS 0.01M pH 7.4 seguidos de 100 mL de solución de paraformaldehído (4 g/mL) preparada en PBS 0.01M pH 7.4. Al completar la perfusión los cerebros de los animales fueron extraídos y almacenados bajo refrigeración.

Las muestras de cerebro fueron procesadas por medio de un ensayo de inmunohistoquímica para la proteína c-Fos. Para esto, al terminar la perfusión transcardiaca los cerebros fueron extraídos y almacenados en solución de paraformaldehído (4 g/mL) a 4 °C durante tres días. Posteriormente fueron transferidos a una solución de sacarosa (25 g/mL) preparada en PBS 0.01M pH 7.4 y se mantuvieron a 4 °C durante cuatro días para luego ser seccionados coronalmente en cortes de 30 µm con criostato. Los cortes se almacenaron en solución anticongelante a -20 °C hasta la realización del ensayo de inmunohistoquímica. Para realizar el ensayo se escogieron cuatro cortes por sujeto, correspondientes a las coordenadas anteroposteriores: 2.52 mm, 1.20 mm, -1.80 mm y -3.00 mm respecto a bregma, según la descripción anatómica de Paxinos y Watson (2007).

La marcación de proteínas se realizó con el anticuerpo primario conejo-Anti-c-Fos ab190289, Abcam (dilución: 1: 10 000) y el anticuerpo secundario caballo-Anti-conejo BA-1100, Vector Laboratories Inc. (dilución: 1:500). La visualización de la señal se consiguió aplicando la técnica de avidina-biotina-peroxidasa más 3.3'-diaminobenzidina con $NiCl_2$, utilizando los kits PK 6101 y SK-4100, Vector Laboratories Inc. Estos procedimientos se completaron siguiendo el protocolo descrito en el Anexo 5.

Análisis estadísticos

Se utilizaron análisis de varianza mixtos para evaluar los efectos de la nicotina y los cambios intra-sujeto. Se evaluaron los supuestos de normalidad con la prueba Shapiro-Wilk, la homocedasticidad con la prueba de igualdad de Levene, y la esfericidad con la prueba de esfericidad de Mauchly. En los análisis que no se cumplió el criterio de esfericidad se aplicó la corrección de Greenhouse-Geisser a los grados de libertad. Además, se aplicaron pruebas post hoc con el método de Sidak. El nivel de significancia se estableció en $\alpha=0.05$. Los datos se presentan como medias ± SEM.

Estos análisis se realizaron para tres momentos: 1) Evaluación en el campo abierto, 2) Adquisición de la tarea espacial del laberinto de Barnes, 3) Recobro de la tarea espacial del laberinto de Barnes. En el primer momento el análisis consistió en un ANOVA mixto 2x2: Desafío (Agudo, Crónico) x Tratamiento (Vehículo, Nicotina). En el segundo momento el análisis consistió en un ANOVA mixto 8x2: Ensayo (A1 – A8) x Tratamiento (Vehículo, Nicotina). En el tercer momento el análisis consistió en un ANOVA mixto 2x2: Ensayo (A8, PSC) x Tratamiento (Vehículo, Nicotina). Estos análisis se realizaron en paralelo para los dos experimentos de este estudio.

Se utilizaron pruebas t de medidas independientes para evaluar la respuesta de dos regiones cerebrales (PVN y AcbSh) ante un estresor agudo en animales tratados con vehículo o nicotina. Para esto, se compararon los niveles de expresión de la proteína en cada grupo contra la expresión en el grupo basal y los niveles de expresión entre los dos grupos con tratamiento. Además, esta última comparación fue repetida utilizando las estimaciones de la función de cambio descritas por Rousselet et al. (2017). Para esto, se estimaron los percentiles 10, 25, 50, 75 y 90 de cada grupo según el método de Harrell-Davis; posteriormente, se estimaron las diferencias entre estos percentiles y sus intervalos de confianza (IC) al 95% por medio de bootstrap con 2000 repeticiones. La estimación de los intervalos de confianza fue corregida para múltiples comparaciones y se ajustaron los niveles de significancia críticos; siguiendo esta corrección se asignaron los valores p críticos (0.050, 0.025, 0.017, 0.013, 0.010) para las diferencias en orden ascendente.

Por otra parte, se utilizaron análisis de componentes principales (ACP) sobre una base de datos complementaria (Ballesteros Cadena, 2018) para explorar las dimensiones de la tarea espacial del laberinto de Barnes. El propósito de este análisis exploratorio fue orientar la adaptación de un plan de análisis que permitiera evaluar la posible influencia de factores no mnemónicos sobre el desempeño en la tarea espacial del laberinto circular de Barnes (LCB). Se ha sugerido que, el comportamiento en este laberinto podría ser influenciado por factores no cognitivos como la ansiedad, la inmovilidad o la actividad exploratoria (Harrison et al., 2006). Una hipótesis similar ha sido evaluada con la implementación de análisis factoriales exploratorios en el laberinto acuático de Morris (LAM), otro instrumento ampliamente utilizado en la evaluación de memoria espacial con roedores, y se ha observado que los indicadores se agrupan en varios factores (Wolfer et al., 1998). Aunque los resultados en el LAM podrían reforzar la hipótesis de

una estructura multidimensional en el LCB, no se encontraron reportes que pusieran a prueba esta idea con los análisis pertinentes.

Antes de realizar los ACP se evaluaron los supuestos de adecuación muestral con el índice de Kaiser-Meyer-Olkin (KMO), y la inter-correlación del conjunto de variables con la prueba de esfericidad de Bartlett. Posterior a la extracción, se conservaron los componentes con valores propios > 1 según el criterio de Kaiser. Los resultados de este análisis se utilizaron para orientar la selección de un subconjunto de variables para posterior análisis y discusión. Los ACP se aplicaron en tres momentos importantes de la tarea: A1, A8 y PSC; además, se repitieron con las medidas en el LCB del presente estudio para corroborar su transferibilidad.

Consideraciones Éticas

Los procedimientos del presente estudio se basaron en lo establecido por la ley 84 de 1989 del Congreso de Colombia, específicamente en lo referido al uso de animales vivos en experimentos e investigación; de igual forma, se basaron en lo establecido en la resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia respecto a los requisitos para llevar a cabo investigación biomédica con animales.

El personal encargado del cuidado y manejo de los animales de experimentación contó con formación específica para los procedimientos realizados. Para garantizar la seguridad de los investigadores, los procedimientos experimentales se realizaron con el uso de bata, guantes de nitrilo y tapabocas. Todos los residuos producidos en el presente estudio fueron desechados según los protocolos de manejo de residuos establecidos por la Oficina de Gestión Ambiental de la Sede Bogotá en la Universidad Nacional de Colombia.

Resultados

Experimento 1: Efectos comportamentales de la nicotina crónica y su retirada prolongada

A corto plazo la nicotina crónica indujo sensibilización de la actividad locomotriz.

Se ha descrito que un pre tratamiento crónico con nicotina produce sensibilización locomotriz en roedores, este fenómeno consiste en incremento de la actividad locomotriz producida por la misma droga aplicada de manera repetida (Balfour, 2015). En el presente estudio, los animales tratados con nicotina recorrieron mayor distancia al final del tratamiento crónico respecto al desafío agudo (Figura 9A). Un ANOVA mixto mostró una interacción del desafío con el tratamiento (Tratamiento x Desafío: $F_{(1/19)} = 13.55$, $p<0.05$, $\eta^2_p=0.42$). Comparaciones post hoc no mostraron diferencias en la actividad de los animales vehículo entre los desafíos agudo y crónico ($F_{(1/19)} = 2.39$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.11$); sin embargo, se observó que los animales tratados con nicotina recorrieron mayor distancia en el desafío crónico respecto al desafío agudo ($F_{(1/19)} = 13.04$, $p<0.05$, $\eta^2_p=0.41$). Adicionalmente, no se observaron diferencias basadas en el tratamiento durante el desafío crónico ($F_{(1/19)} = 3.04$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.14$).

Por otra parte, se ha mostrado que indicadores como defecación, tiempo de permanencia en el centro y actividad durante los primeros cinco minutos en el campo abierto son indicadores de procesos emocionales (T. Gould, 2009). Sumado a esto, se ha observado que además de efectos reforzantes y estimulantes, la nicotina ejerce efectos sobre procesos emocionales (Picciotto et al., 2002). En el presente estudio se exploraron los potenciales efectos emocionales a corto plazo de la nicotina crónica, comparando la actividad en el centro del campo abierto. Los animales tratados con nicotina recorrieron una distancia comparable entre los desafíos agudo y crónico en el centro del campo abierto (Figura 9B). Un ANOVA mixto no mostró efectos significativos del tratamiento,

los desafíos o la interacción de los factores (Tratamiento: $F_{(1/19)}$ =1.13, p>0.05, η^2_p=0.06; Desafío: $F_{(1/19)}$ =0.07, p>0.05, η^2_p<0.01; Tratamiento x Desafío: $F_{(1/19)}$ =0.90, p>0.05, η^2_p=0.05).

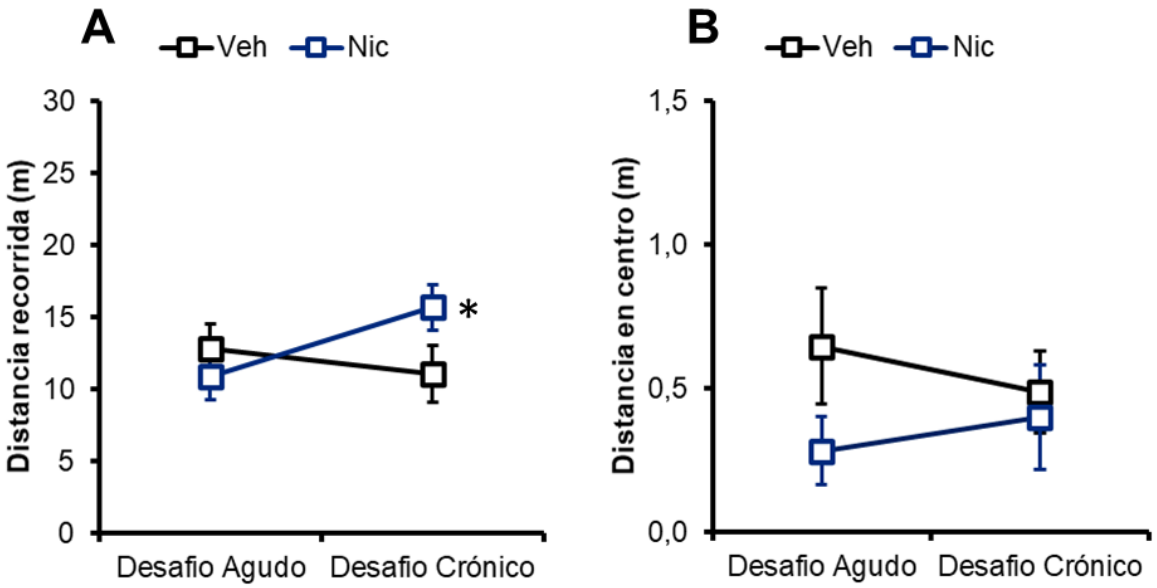


Figura 9. Actividad horizontal en campo abierto – experimento 1. A. Distancia recorrida en las pruebas realizadas los días 1 y 21 de tratamiento, diez minutos después de la inyección de vehículo o nicotina. **B**. Distancia recorrida en el centro del campo durante las pruebas realizadas los días 1 y 21 de tratamiento, diez minutos después de la inyección de vehículo o nicotina. * p<0.05 respecto a desafío agudo.

A largo plazo la nicotina crónica no afectó la adquisición en el laberinto circular de Barnes (LCB).

El LCB ha sido utilizado para evaluar el aprendizaje espacial en roedores; sin embargo, el comportamiento en este laberinto podría ser influenciado por factores no cognitivos como la ansiedad, la inmovilidad o la actividad exploratoria (Harrison et al., 2006). Con el fin de desarrollar un análisis sensible a la influencia de factores no cognitivos sobre el desempeño en la tarea espacial del LCB, se planteó la exploración multivariada de indicadores comportamentales en tres momentos importantes de la evaluación en el LCB: el inicio del entrenamiento (A1), el final del

entrenamiento (A8) y una prueba de recobro con caja (PCC). Estos análisis se realizaron con la base de datos complementaria tomada del estudio de Ballesteros Cadena (2018).

La exploración preliminar de la base de datos complementaria permitió corroborar que esta era adecuada para realizar los análisis de componentes principales (ACP). El nivel de adecuación muestral alcanzó valores aceptables en los tres momentos analizados (KMO: A1 =0.73; A8 =0.72; PCC =0.61). De igual manera, la inter-correlación de las variables fue significativa en los tres momentos analizados (Bartlett: A1: $\chi^2_{(15)}$ =248.28, p<0.05; A8: $\chi^2_{(15)}$ =223.65, p<0.05; Prueba: $\chi^2_{(15)}$ =272.03, p<0.05).

Se observó que los dos primeros componentes resumieron satisfactoriamente la información recolectada en la tarea espacial del LCB. Al extraer los componentes principales sólo los dos primeros cumplieron el criterio de Kaiser (Figura 10). Estos componentes contuvieron entre 79 – 86 % de la varianza observada en el conjunto de datos.

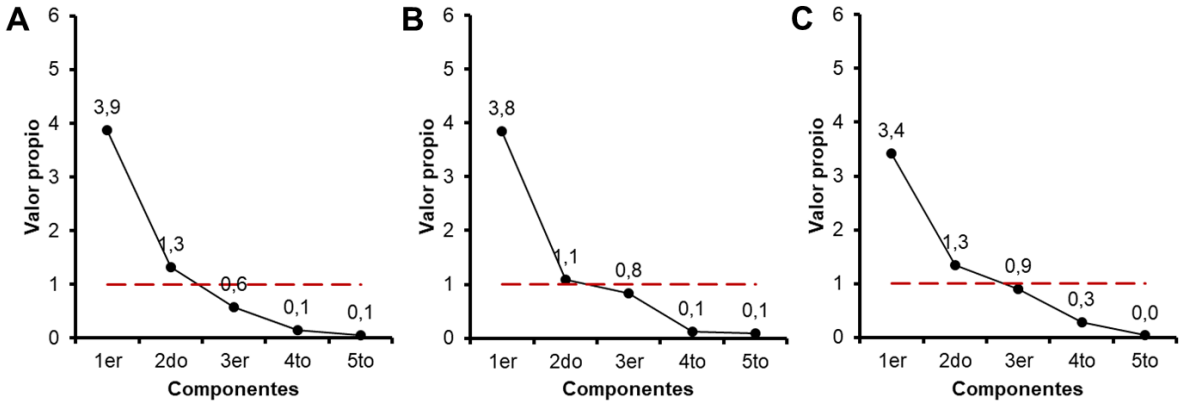


Figura 10. Gráficos de sedimentación. A. Ensayo 1 de adquisición (A1). **B**. Ensayo 8 de adquisición (A8). **C**. Prueba con caja (PCC). La línea punteada roja representa el punto de corte para la selección de componentes a explorar: Valor propio > 1.

La constitución de los componentes fue estable a lo largo de la adquisición y el recobro de la tarea espacial del laberinto de Barnes (Figura 11). De manera consistente, las variables incluidas en los análisis mostraron correlaciones fuertes con los primeros dos componentes extraídos.

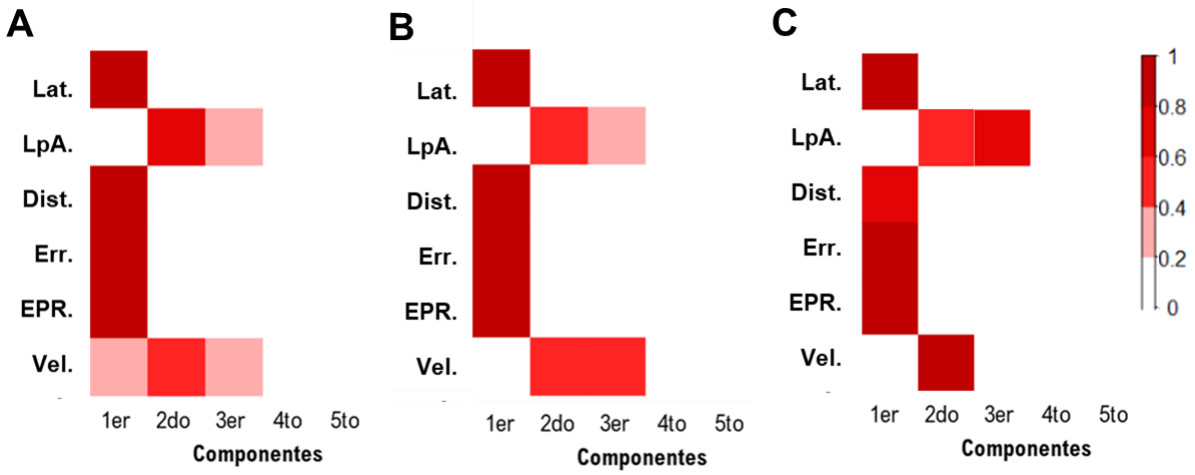


Figura 11. Matrices de correlación variable – componente. **A.** Ensayo 1 de adquisición (A1). **B.** Ensayo 8 de adquisición (A8). **C.** Prueba con caja (PCC). La escala de color representa la magnitud de la correlación entre variables y componentes. Variables: Latencia al agujero meta (Lat.), Latencia al primer agujero (LpA.), Distancia recorrida (Dist.), Errores (Err.), Errores ponderados (EPR.), Velocidad (Vel.).

El primer componente está integrado por indicadores convencionales de memoria: Latencia al agujero meta (Lat.), Distancia recorrida (Dist.), Errores (Err.), Errores ponderados (EPR.). El segundo componente está integrado por la Latencia al primer agujero (LpA.), y la Velocidad (Vel.) (Figura 12).

Por otra parte, la estructura de componentes principales observada en el estudio de Ballesteros Cadena (2018) fue replicada con los datos del presente estudios (Anexo 2). A partir de estos resultados, el análisis fue estructurado en torno a los dos componentes observados. Para esto, se seleccionaron dos de las variables con mayor contribución en cada componente y se analizaron

sus valores brutos, esto es: componente 1: errores ponderados y latencia; componente 2: latencia al primer agujero y velocidad.

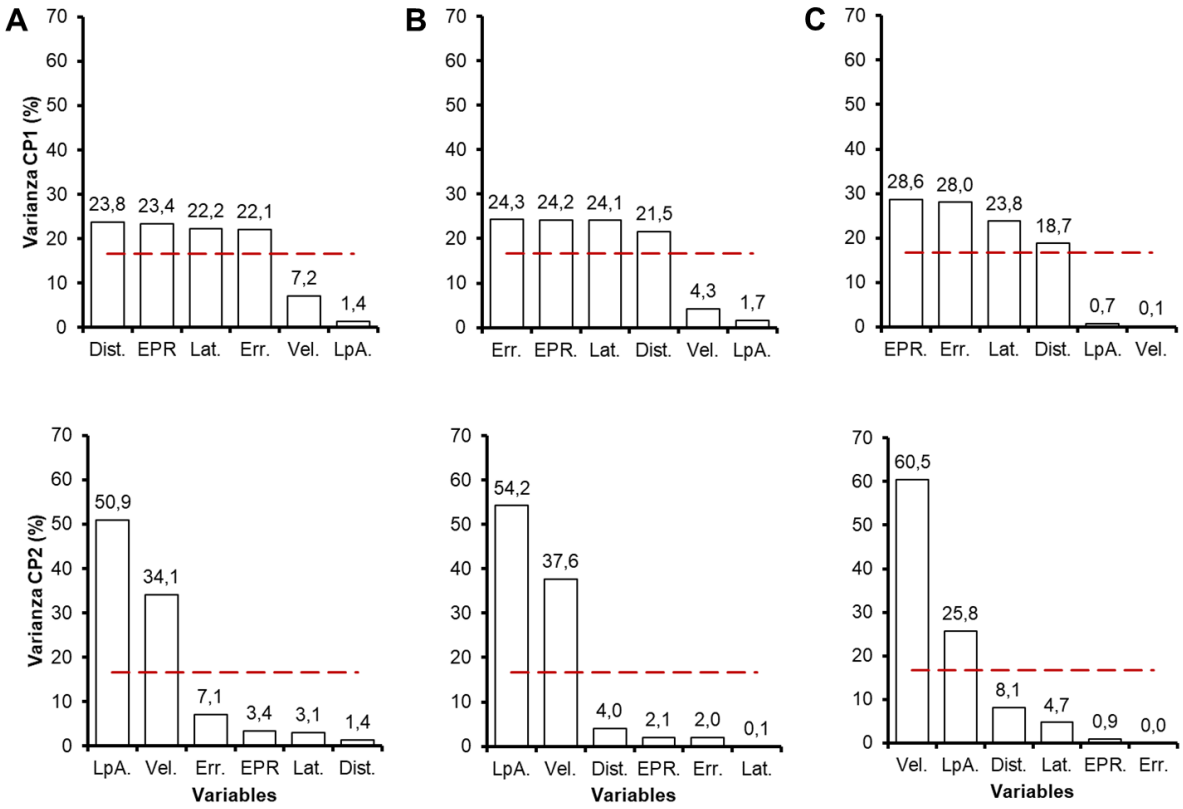


Figura 12. Contribución de variables por componente. **A.** Ensayo 1 de adquisición (A1). **B.** Ensayo 8 de adquisición (A8). **C.** Prueba con caja (PCC). En el panel superior se presenta el primer componente. En el panel inferior se presenta el segundo componente. La línea punteada roja representa la contribución promedio esperada. Variables: Latencia al agujero meta (Lat.), Latencia al primer agujero (LpA.), Distancia recorrida (Dist.), Errores (Err.), Errores ponderados (EPR.), Velocidad (Vel.).

En cuanto a la relación de la nicotina con procesos de memoria, se ha reportado que la activación aguda de RCN con nicotina mejora el desempeño de animales y humanos en diferentes tareas; sin embargo, la exposición crónica a la droga lleva a adaptaciones del sistema colinérgico con resultados contradictorios en roedores (Deiana et al., 2011). En el presente estudio se evaluó el efecto a largo plazo de un tratamiento crónico con nicotina sobre la adquisición de la tarea

espacial en el LCB. Se observó una mejora en los indicadores del primer componente durante la adquisición de la tarea espacial en el LCB, sin diferencias basadas en el tratamiento (Figura 13). Un ANOVA mixto mostró una reducción significativa en la latencia de llegada al agujero meta a lo largo de la adquisición (Ensayo: $F_{(3/47)} = 12.34$, $p<0.05$, $\eta^2_p=0.38$). Comparaciones post hoc mostraron diferencias entre el ensayo A1 y los ensayos A4, A6, A7, A8 ($F_{(7/14)} = 9.57$, $p<0.05$, $\eta^2_p=0.83$). No se observó un efecto global del tratamiento durante la adquisición (Tratamiento: $F_{(1/20)} = 0.15$, $p>0.05$, $\eta^2_p<0.01$). No se observaron efectos del tratamiento de ensayo a ensayo (Ensayo x Tratamiento: $F_{(3/47)} = 0.46$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.02$) (Figura 13A).

En el mismo sentido, un ANOVA mixto mostró una reducción significativa en los errores ponderados a lo largo de la adquisición, sin diferencias basadas en el tratamiento (Ensayo: $F_{(4/71)} = 6.38$, $p<0.05$, $\eta^2_p=0.24$). Comparaciones post hoc mostraron diferencias entre el ensayo A1 y el ensayo A8 ($F_{(7/14)} = 8.36$, $p<0.05$, $\eta^2_p=0.81$). No se observó un efecto global del tratamiento durante la adquisición (Tratamiento: $F_{(1/20)} = 0.28$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.01$). No se observaron efectos del tratamiento de ensayo a ensayo (Ensayo x Tratamiento: $F_{(4/71)} = 0.45$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.02$) (Figura 13B).

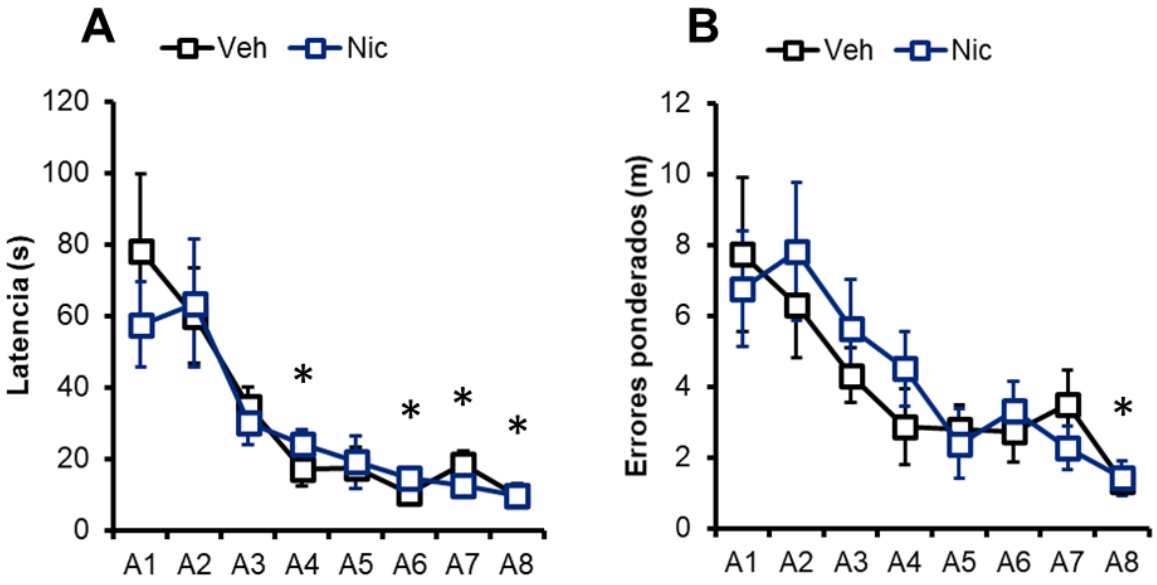


Figura 13. Adquisición tarea espacial laberinto de Barnes– componente 1, experimento 1. **A**. Latencia de llegada al agujero meta promedio ± SEM. **B**. Errores ponderados promedio ± SEM. * $p<0.05$ respecto a A1.

Por otra parte, se observó una mejora en los indicadores del segundo componente durante la adquisición de la tarea espacial en el LCB, sin diferencias basadas en el tratamiento (Figura 14). Un ANOVA mixto mostró una reducción significativa en la latencia al primer agujero a lo largo de la adquisición (Ensayo: $F_{(2/34)}=6.41$, $p<0.05$, $\eta^2_p=0.24$). Comparaciones post hoc mostraron diferencias entre el ensayo A2 y los ensayos A5, A6, A7, A8 ($F_{(7/14)}=3.09$, $p<0.05$, $\eta^2_p=0.61$). No se observó un efecto global del tratamiento durante la adquisición (Tratamiento: $F_{(1/20)}=0.01$, $p>0.05$, $\eta^2_p<0.01$). No se observaron efectos del tratamiento de ensayo a ensayo (Ensayo x Tratamiento: $F_{(2/34)}=0.28$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.01$) (Figura 14A).

Sumado a esto, un ANOVA mixto mostró un incremento significativo en la velocidad a lo largo de la adquisición, sin diferencias basadas en el tratamiento (Ensayo: $F_{(3/49)}=8.31$, $p<0.05$, $\eta^2_p=0.33$). Comparaciones post hoc mostraron diferencias entre el ensayo A1 y los ensayos A6,

A7, A8 ($F_{(7/11)}$ =3.35, p<0.05, η^2_p=0.69). No se observó un efecto global del tratamiento durante la adquisición (Tratamiento: $F_{(1/17)}$ <0.01, p>0.05, η^2_p<0.01). No se observaron efectos del tratamiento de ensayo a ensayo (Ensayo x Tratamiento: $F_{(3/49)}$ =1.71, p>0.05, η^2_p=0.09) (Figura 14B).

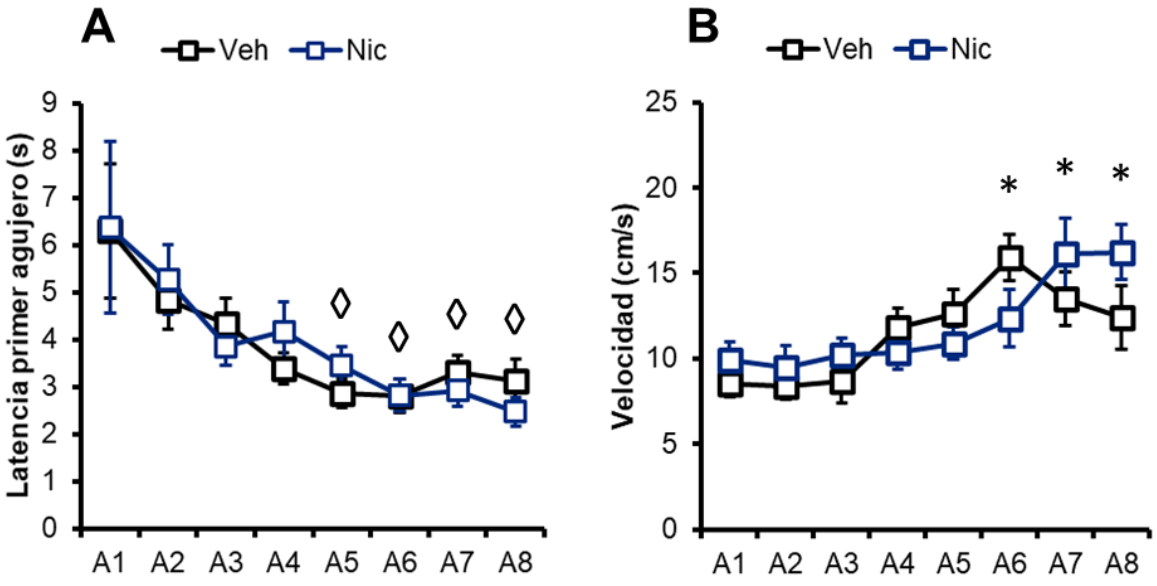


Figura 14. Adquisición tarea espacial laberinto de Barnes – componente 2, experimento 1. **A**. Latencia de llegada al primer agujero promedio ± SEM. **B**. Velocidad promedio ± SEM. ◊ p<0.05 respecto a A2; * p<0.05 respecto a A1.

A largo plazo la nicotina crónica mejoró el desempeño durante el recobro en el LCB.

La memoria se considera como un proceso con varias etapas (i.e. adquisición, consolidación y recobro); al respecto, estudios de la neurobiología de la memoria han mostrado que diferentes cascadas moleculares son reclutadas de manera selectiva en diferentes etapas de la memoria (Abel y Lattal, 2001). Tras no observar efecto de la nicotina en la adquisición en el LCB, en este experimento se evaluó el efecto de la nicotina sobre el recobro de la tarea en este laberinto, comparando las medidas al final del entrenamiento con las medidas en la prueba sin caja (PSC).

Los animales tratados con nicotina mostraron mejor desempeño en los indicadores del primer componente en el recobro de la tarea en el LCB (Figura 15). Un ANOVA mixto mostró un incremento en la latencia de llegada al agujero meta en la prueba de recobro respecto al final del entrenamiento (Ensayo: $F_{(1/20)} = 12.37$, $p<0.05$, $\eta^2_p=0.38$). No se observó una interacción significativa del tratamiento con el ensayo en esta variable (Ensayo x tratamiento: $F_{(1/20)} = 3.39$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.15$). Comparaciones post hoc segregadas por tratamiento mostraron que el incremento fue significativo únicamente para el grupo vehículo (Veh: $F_{(1/20)} = 14.36$, $p<0.05$, $\eta^2_p=0.42$; Nic: $F_{(1/20)} = 1.40$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.07$). No se observó un efecto global del tratamiento (Tratamiento: $F_{(1/20)} = 2.08$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.09$). Adicionalmente, no se observaron diferencias entre los tratamientos dentro de los ensayos (A8: $F_{(1/20)} < 0.01$, $p>0.05$, $\eta^2_p<0.01$; PSC: $F_{(1/20)} = 2.88$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.13$) (Figura 15A).

En línea con esto, un ANOVA mixto mostró un incremento en los errores ponderados en la prueba de recobro respecto al final del entrenamiento (Ensayo: $F_{(1/20)} = 12.62$, $p<0.05$, $\eta^2_p=0.39$). No se observó una interacción del tratamiento con el ensayo (Ensayo x tratamiento: $F_{(1/20)} = 0.93$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.04$). Comparaciones post hoc segregadas por tratamiento mostraron que el incremento fue significativo únicamente para el grupo vehículo (Veh: $F_{(1/20)} = 10.20$, $p<0.05$, $\eta^2_p=0.34$; Nic: $F_{(1/20)} = 3.35$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.14$). No se observó un efecto global del tratamiento (Tratamiento: $F_{(1/20)} = 0.56$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.03$). Adicionalmente, no se observaron diferencias entre los tratamientos dentro de los ensayos (A8: $F_{(1/20)} = 0.01$, $p>0.05$, $\eta^2_p<0.01$; PSC: $F_{(1/20)} = 0.80$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.04$) (Figura 15B).

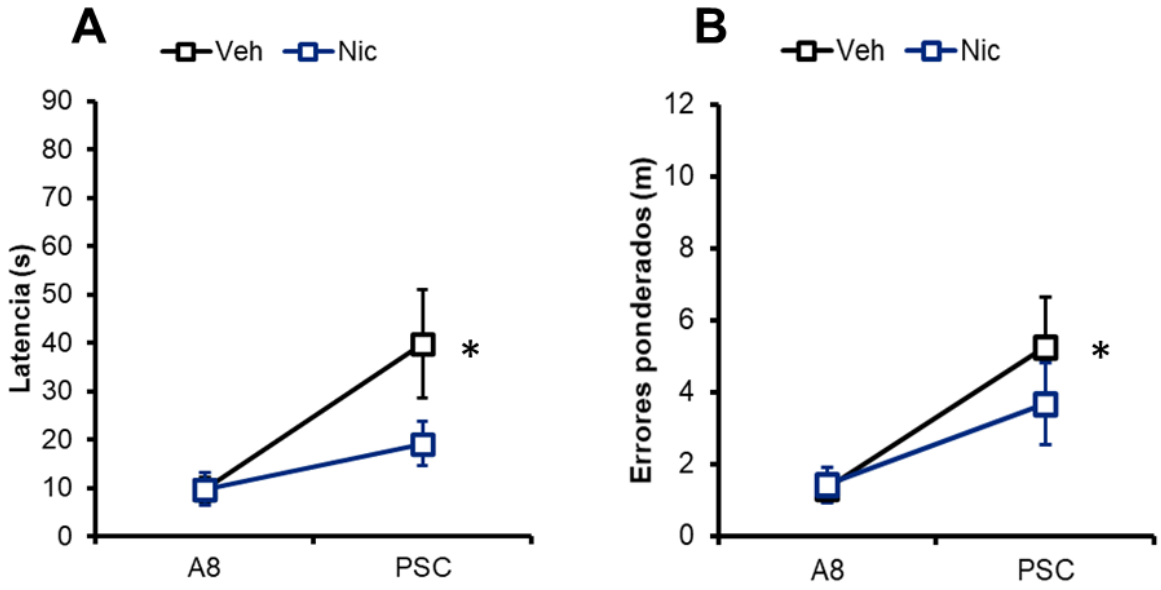


Figura 15. Recobro tarea espacial laberinto de Barnes – componente 1, experimento 1. **A**. Latencia de llegada al agujero meta promedio ± SEM. **B**. Errores ponderados promedio ± SEM. * $p<0.05$ respecto a A8.

Al mismo tiempo, la nicotina afectó parcialmente los indicadores del segundo componente del recobro en el LCB (Figura 16). Un ANOVA mixto mostró un incremento en la latencia de llegada al primer agujero en la prueba de recobro respecto al final del entrenamiento (Ensayo: $F_{(1/20)}=5.97$, $p<0.05$, $\eta^2_p=0.23$). No se observó una interacción del tratamiento con el ensayo (Ensayo x tratamiento: $F_{(1/20)}=0.30$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.02$). Comparaciones post hoc segregadas por tratamiento mostraron que el incremento fue significativo únicamente para el grupo vehículo (Veh: $F_{(1/20)}=4.48$, $p<0.05$, $\eta^2_p=0.18$; Nic: $F_{(1/20)}=1.79$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.08$). No se observó un efecto global del tratamiento (Tratamiento: $F_{(1/20)}=2.27$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.10$). Adicionalmente, no se observaron diferencias entre los tratamientos dentro de los ensayos (A8: $F_{(1/20)}=1.40$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.07$; PSC: $F_{(1/20)}=1.69$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.08$) (Figura 16A).

Por otra parte, un ANOVA mixto no mostró cambios en la velocidad entre la prueba de recobro y el final del entrenamiento (Ensayo: $F_{(1/20)}=0.05$, $p>0.05$, $\eta^2_p<0.01$). No se observó una interacción del tratamiento con el ensayo (Ensayo x tratamiento: $F_{(1/20)}=0.75$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.04$). Comparaciones post hoc segregadas por tratamiento no mostraron cambios para ninguno de los grupos (Veh: $F_{(1/20)}=0.21$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.01$; Nic: $F_{(1/20)}=0.60$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.03$). No se observó un efecto global del tratamiento (Tratamiento: $F_{(1/20)}=1.79$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.08$). Adicionalmente, no se observaron diferencias entre los tratamientos dentro de los ensayos (A8: $F_{(1/20)}=2.40$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.11$; PSC: $F_{(1/20)}=0.33$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.02$) (Figura 16B).

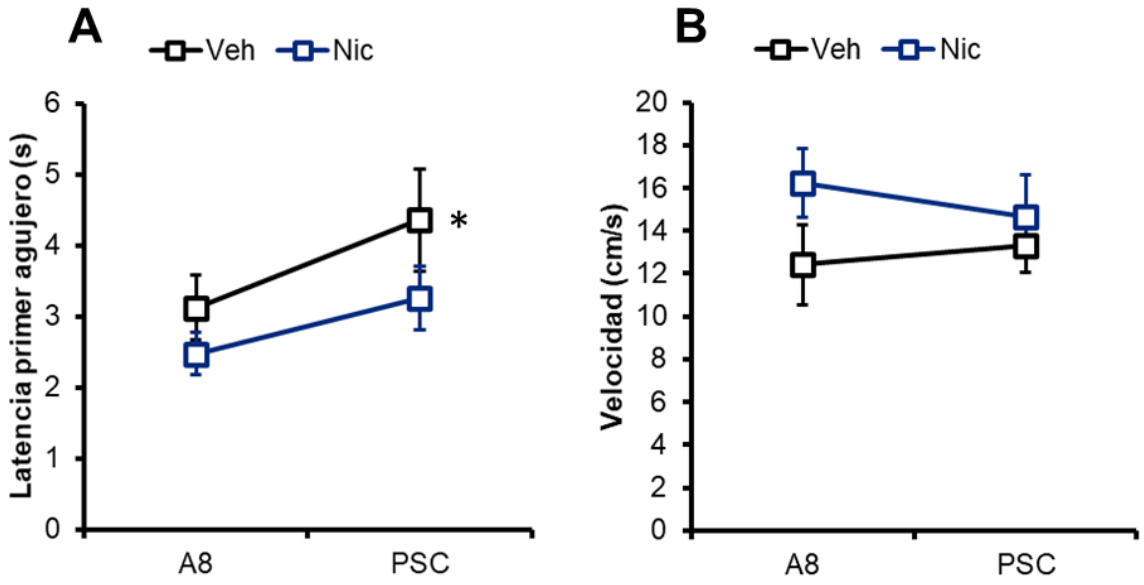


Figura 16. Recobro tarea espacial laberinto de Barnes – componente 2, experimento 1. **A**. Latencia de llegada al primer agujero promedio ± SEM. **B**. Velocidad promedio ± SEM. * $p<0.05$ respecto a A8.

Experimento 2: Respuesta a un estresor agudo durante la retirada prolongada de la nicotina crónica

Los efectos de la nicotina sobre la actividad locomotriz y la memoria espacial fueron parcialmente replicados.

El efecto de sensibilización locomotriz inducida por la nicotina fue replicado en el segundo experimento (Figura 17). Los animales tratados con nicotina recorrieron mayor distancia durante el desafío crónico en comparación con el agudo (Figura 17A). Un ANOVA mixto mostró una interacción del desafío con el tratamiento (Tratamiento x Desafío: $F_{(1/20)} = 26.80$, $p<0.05$, $\eta^2_p = 0.57$). Comparaciones post hoc mostraron una reducción en la distancia recorrida por los animales vehículo en el desafío crónico respecto al desafío agudo ($F_{(1/20)} = 6.18$, $p<0.05$, $\eta^2_p=0.24$); por el contrario, se observó un incremento en la distancia recorrida por los animales nicotina en el desafío crónico respecto al desafío agudo ($F_{(1/20)} = 23.39$, $p<0.05$, $\eta^2_p=0.54$). Adicionalmente, los animales tratados con nicotina recorrieron una mayor distancia durante el desafío crónico respecto a los animales tratados con vehículo ($F_{(1/20)} = 2.26$, $p<0.05$, $\eta^2_p=0.34$).

El tratamiento con nicotina no incrementó el nivel de actividad en el centro del campo abierto. Los animales tratados con nicotina recorrieron una distancia en centro del campo comparable entre los desafíos agudo y crónico (Figura 17B). Un ANOVA mixto no mostró efectos significativos del tratamiento, los desafíos o la interacción de los factores (Tratamiento: $F_{(1/20)} = 0.64$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.03$; Desafío: $F_{(1/20)} = 0.01$, $p>0.05$, $\eta^2_p<0.01$; Tratamiento x Desafío: $F_{(1/20)} = 2.37$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.11$).

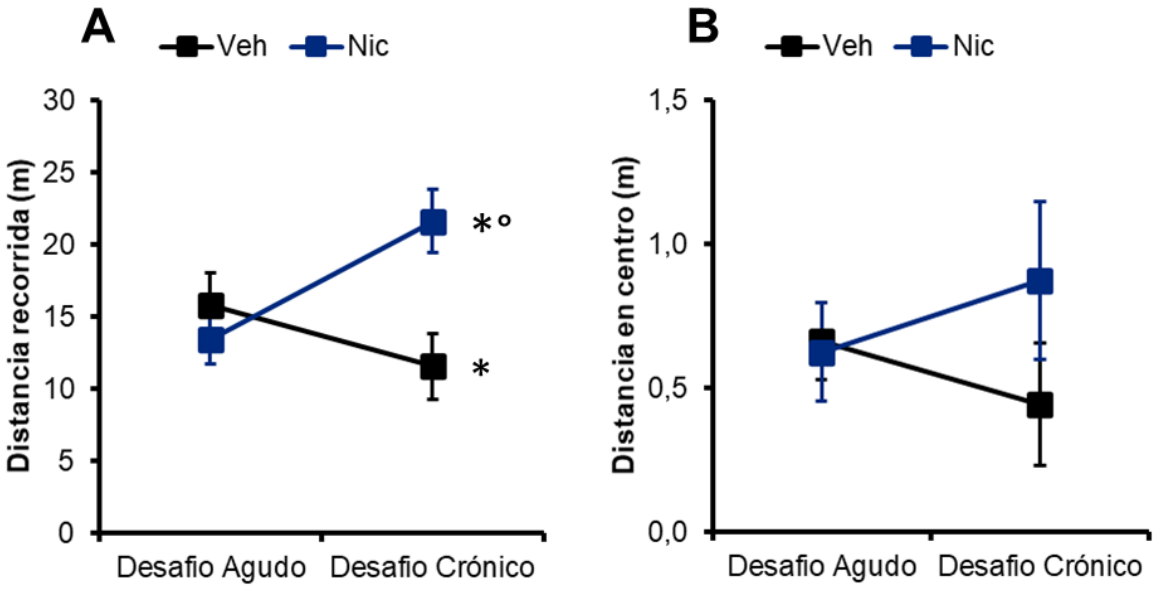


Figura 17. Actividad horizontal en campo abierto – experimento 2. A. Distancia recorrida en la prueba realizada los días 1 y 21 de tratamiento, 10 minutos después de la inyección de vehículo o nicotina. **B**. Distancia recorrida en el centro del campo durante la prueba realizada los días 1 y 21 de tratamiento, 10 minutos después de la inyección de vehículo o nicotina. Segundo conjunto de sujetos. * $p<0.05$ respecto a desafío agudo; ° $p<0.05$ respecto a grupo vehículo.

Al igual que en el primer experimento, en el segundo experimento no se observaron efectos de largo plazo de la nicotina sobre la adquisición en el LCB. Se observó una mejora en los indicadores del primer componente durante la adquisición de la tarea espacial en el LCB, sin diferencias basadas en el tratamiento (Figura 18). Un ANOVA mixto mostró una reducción significativa en la latencia de llegada al agujero meta a lo largo de la adquisición (Ensayo: $F_{(3/54)}=11.14$, $p<0.05$, $\eta^2_p=0.36$). Comparaciones post hoc mostraron diferencias entre el ensayo A1 y los ensayos A4, A5, A6, A7, A8 ($F_{(7/14)}=7.33$, $p<0.01$, $\eta^2_p=0.79$). No se observó un efecto global del tratamiento durante la adquisición (Tratamiento: $F_{(1/20)}=0.21$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.01$). No se observaron efectos del tratamiento de ensayo a ensayo (Ensayo x Tratamiento: $F_{(3/54)}=1.38$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.07$) (Figura 18A).

En el mismo sentido, un ANOVA mixto mostró una reducción significativa en los errores ponderados a lo largo de la adquisición, sin diferencias basadas en el tratamiento (Ensayo: $F_{(4/72)}$ =4.96, p<0.05, η^2_p=0.20). Comparaciones post hoc mostraron diferencias entre el ensayo A1 y los ensayos A4, A6, A7, A8 ($F_{(7/14)}$ =6.50, p<0.05, η^2_p=0.77). No se observó un efecto global del tratamiento durante la adquisición (Tratamiento: $F_{(1/20)}$ =0.18, p>0.05, η^2_p<0.01). No se observaron efectos del tratamiento de ensayo a ensayo (Ensayo x Tratamiento: $F_{(4/72)}$ =1.29, p>0.05, η^2_p=0.06) (Figura 18B).

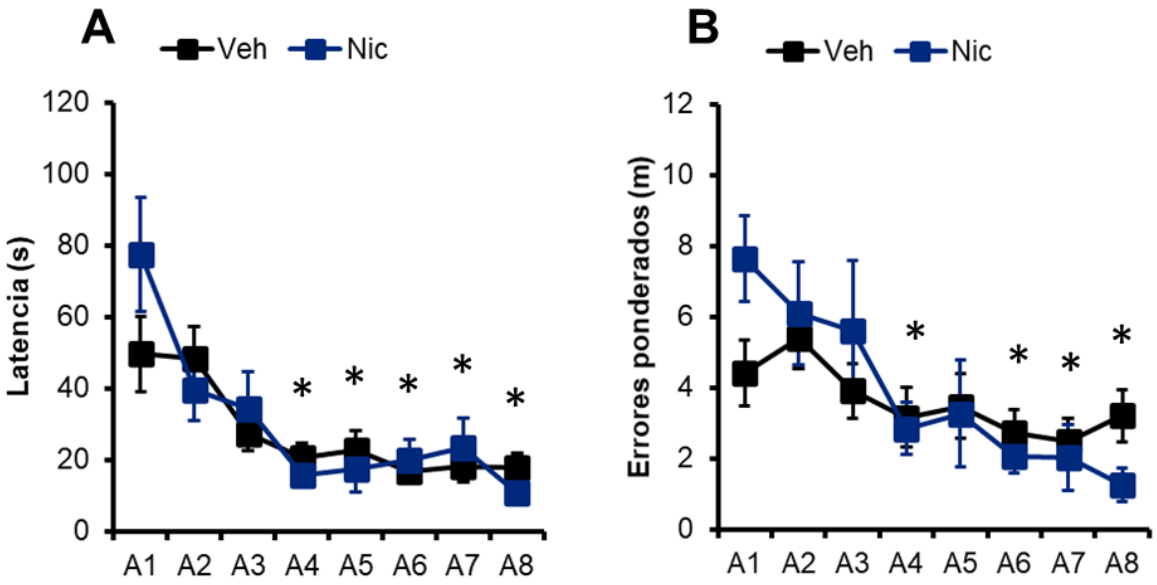


Figura 18. Adquisición tarea espacial laberinto de Barnes – componente 1, experimento 2. **A**. Latencia de llegada al agujero meta promedio ± SEM. **B**. Errores ponderados promedio ± SEM. * p<0.05 respecto a A1.

Asimismo, se observó una mejora parcial en los indicadores del segundo componente durante la adquisición de la tarea espacial en el LCB, sin diferencias basadas en el tratamiento (Figura 19). Un ANOVA mixto no mostró cambios en la latencia de exploración del primer agujero a lo largo de la adquisición (Ensayo: $F_{(3/63)}$ =2.08, p>0.05, η^2_p=0.09). No se observó un efecto

global del tratamiento durante la adquisición (Tratamiento: $F_{(1/20)}$ =0.01, p>0.05, η^2_p<0.01). No se observaron efectos del tratamiento de ensayo a ensayo (Ensayo x Tratamiento: $F_{(3/63)}$ =0.87, p>0.05, η^2_p=0.04) (Figura 19A).

Por otra parte, un ANOVA mixto mostró un incremento significativo en la velocidad a lo largo de la adquisición (Ensayo: $F_{(4/67)}$ =5.84, p<0.05, η^2_p=0.24). Comparaciones post hoc mostraron diferencias entre el ensayo A1 y el ensayo A6 ($F_{(7/13)}$ =2.76, p=0.05, η^2_p=0.60; DIF= 4.89, p<0.05). Se observó un efecto global del tratamiento durante la adquisición, esto es: los animales nicotina se desplazaron a una menor velocidad respecto a los animales vehículo durante toda la adquisición (Tratamiento: $F_{(1/19)}$ =4.55, p<0.05, η^2_p<0.19). No se observaron efectos del tratamiento de ensayo a ensayo (Ensayo x Tratamiento: $F_{(4/67)}$ =1.00, p>0.05, η^2_p=0.05) (Figura 19B).

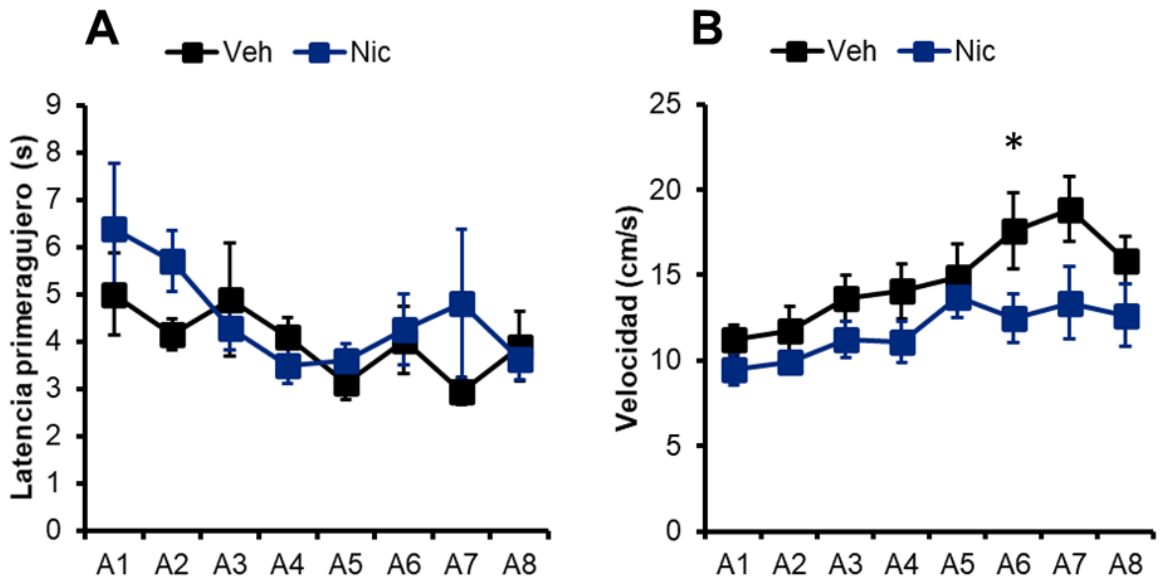


Figura 19. Adquisición tarea espacial laberinto de Barnes – componente 2, experimento 2. **A**. Latencia de llegada al primer agujero promedio ± SEM. **B**. Velocidad promedio ± SEM. * p<0.05 respecto a A1.

A largo plazo la nicotina crónica deterioró el desempeño durante el recobro en el LCB bajo los efectos del estrés.

Trabajos previos del Laboratorio de Neurociencias han mostrado que el estrés agudo por restricción de movimientos deteriora el desempeño durante el recobro de la tarea espacial en el LCB (Troncoso et al., 2010). En este experimento se evaluó el recobro de la tarea, comparando las medidas al final de entrenamiento con las medidas en la prueba sin caja (PSC), después de un desafío con estrés agudo por restricción de movimientos. Bajo los efectos del estrés agudo, los animales tratados con nicotina tuvieron una mayor pérdida en los indicadores del primer componente durante el recobro de la tarea espacial del LCB (Figura 20). Un ANOVA mixto mostró un incremento en la latencia de llegada al agujero meta en la prueba de recobro respecto al final del entrenamiento (Ensayo: $F_{(1/20)}=8.28$, $p<0.05$, $\eta^2_p=0.24$). No se observó interacción del tratamiento con el ensayo (Ensayo x tratamiento: $F_{(1/20)}=0.88$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.04$). Comparaciones post hoc segregadas por tratamiento mostraron que el incremento fue significativo únicamente para el grupo nicotina (Veh: $F_{(1/20)}=1.23$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.06$; Nic: $F_{(1/20)}=5.94$, $p<0.05$, $\eta^2_p=0.23$). No se observó un efecto global del tratamiento (Tratamiento: $F_{(1/20)}=0.25$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.01$). Adicionalmente, no se observaron diferencias entre los tratamientos dentro de los ensayos (A8: $F_{(1/20)}=1.69$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.08$; PSC: $F_{(1/20)}=0.54$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.03$) (Figura 20A).

En el mismo sentido, un ANOVA mixto mostró un incremento en los errores ponderados en la prueba de recobro respecto al final del entrenamiento (Ensayo: $F_{(1/20)}=7.08$, $p<0.05$, $\eta^2_p=0.26$). No se observó una interacción del tratamiento con el ensayo (Ensayo x tratamiento: $F_{(1/20)}=0.24$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.01$). Comparaciones post hoc segregadas por tratamiento mostraron que el incremento fue significativo únicamente para el grupo nicotina (Veh: $F_{(1/20)}=2.35$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.11$; Nic: $F_{(1/20)}=4.97$, $p<0.05$, $\eta^2_p=0.20$). No se observó un efecto global del tratamiento

(Tratamiento: $F_{(1/20)}$ =0.27, p>0.05, η^2_p=0.01). Comparaciones post hoc segregadas por ensayo mostraron diferencias entre los tratamientos dentro del ensayo A8 (A8: $F_{(1/20)}$ =4.98, p<0.05, η^2_p=0.20; PSC: $F_{(1/20)}$ <0.01, p>0.05, η^2_p<0.01) (Figura 20B).

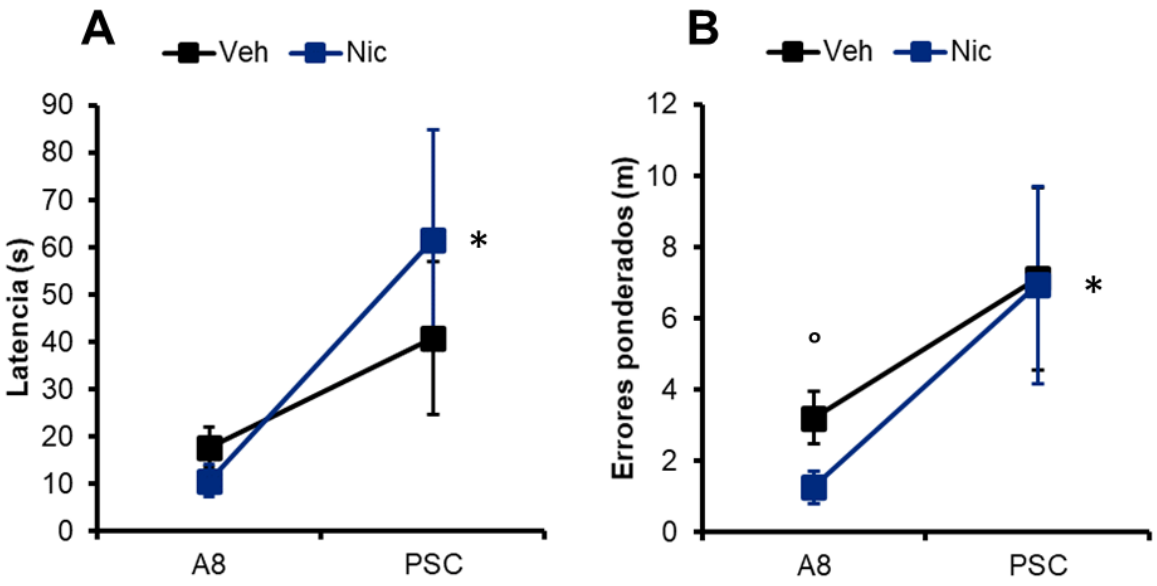


Figura 20. Recobro tarea espacial laberinto de Barnes – componente 1, experimento 2. A. Latencia de llegada al agujero meta promedio ± SEM. **B**. Errores ponderados promedio ± SEM. * p<0.05 respecto a A8; ° p<0.05 respecto a grupo vehículo.

Por otra parte, bajo los efectos del estrés, la nicotina no afectó los indicadores del segundo componente durante el recobro de la tarea espacial del LCB (Figura 21). Un ANOVA mixto no mostró cambios en la latencia al primer agujero entre la prueba de recobro y el final del entrenamiento (Ensayo: $F_{(1/20)}$ =0.07, p>0.05, η^2_p<0.01). No se observó interacción del tratamiento con el ensayo (Ensayo x tratamiento: $F_{(1/20)}$ =0.48, p>0.05, η^2_p=0.02). Comparaciones post hoc segregadas por tratamiento no mostraron cambios para ninguno de los grupos (Veh: $F_{(1/20)}$ =0.10, p>0.05, η^2_p<0.01; Nic: $F_{(1/20)}$ =0.45, p>0.05, η^2_p=0.02). No se observó un efecto global del tratamiento (Tratamiento: $F_{(1/20)}$ =0.02, p>0.05, η^2_p<0.01). Adicionalmente, no se observaron

diferencias entre los tratamientos dentro de los ensayos (A8: $F_{(1/20)}=0.10$, $p>0.05$, $\eta^2_p<0.01$; PSC: $F_{(1/20)}=0.20$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.01$) (Figura 21A).

En línea con esto, un ANOVA mixto no mostró cambios en la velocidad entre la prueba de recobro y el final del entrenamiento (Ensayo: $F_{(1/20)}=0.79$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.04$). No se observó una interacción del tratamiento con el ensayo (Ensayo x tratamiento: $F_{(1/20)}=0.91$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.04$). Comparaciones post hoc segregadas por tratamiento no mostraron cambios para ninguno de los grupos (Veh: $F_{(1/20)}<0.01$, $p>0.05$, $\eta^2_p<0.01$; Nic: $F_{(1/20)}=1.69$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.08$). No se observó un efecto global del tratamiento (Tratamiento: $F_{(1/20)}=1.33$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.06$). Adicionalmente, no se observaron diferencias entre los tratamientos dentro de los ensayos (A8: $F_{(1/20)}=1.93$, $p>0.05$, $\eta^2_p=0.09$; PSC: $F_{(1/20)}=0.15$, $p>0.05$, $\eta^2_p<0.01$) (Figura 21B).

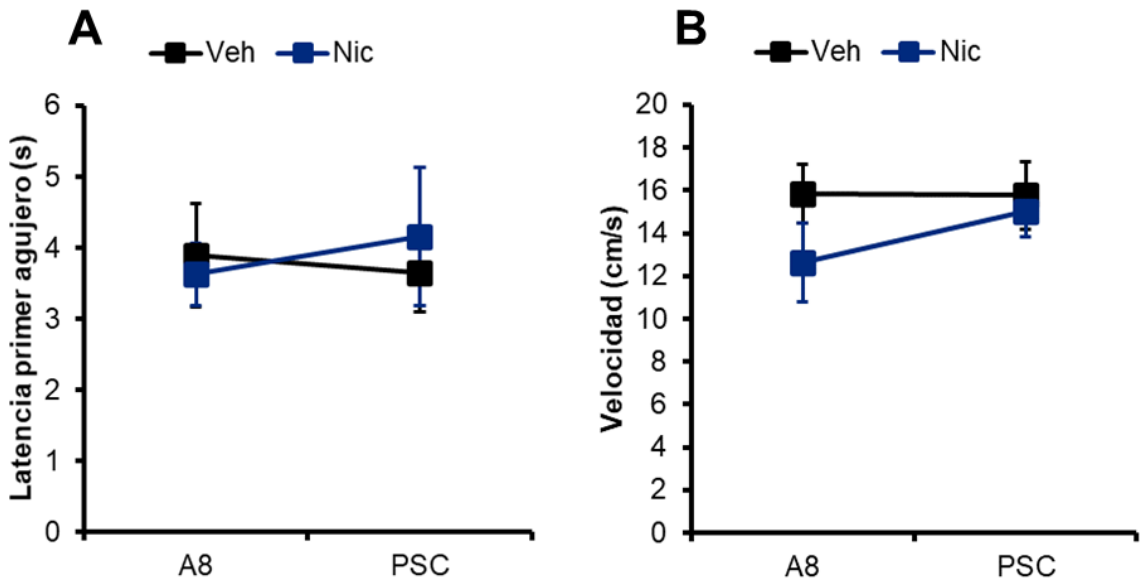


Figura 21. Recobro tarea espacial laberinto de Barnes – componente 2, experimento 2. **A**. Latencia de llegada al primer agujero promedio ± SEM. **B**. Velocidad promedio ± SEM.

A largo plazo la nicotina crónica incrementó selectivamente la inducción de la proteína c-Fos en respuesta al estrés agudo en regiones de sistemas emocionales cerebrales.

Las proteínas de la familia Fos son factores de trascripción que se han sugerido como iniciadores de cambios celulares de largo plazo en respuesta a diferentes tipos de estimulación, entre estos el estrés (Kovács et al., 2018). La expresión de la proteína c-Fos sigue un patrón típico de otros genes de expresión temprana (IEG por sus siglas en inglés) y ha sido utilizada como un marcador de activación postsináptica. Sumado a esto, se ha observado que la administración aguda de nicotina induce la expresión de c-Fos en varias regiones cerebrales de ratas (Marttila et al., 2006). En el presente estudio se evaluó la expresión de la proteína c-Fos en respuesta a un desafío con estrés agudo, durante la retirada prolongada de un tratamiento crónico con nicotina (Figura 22). En este análisis se exploraron el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN por sus siglas en inglés) y la región *Shell* del núcleo accumbens (AcbSh).

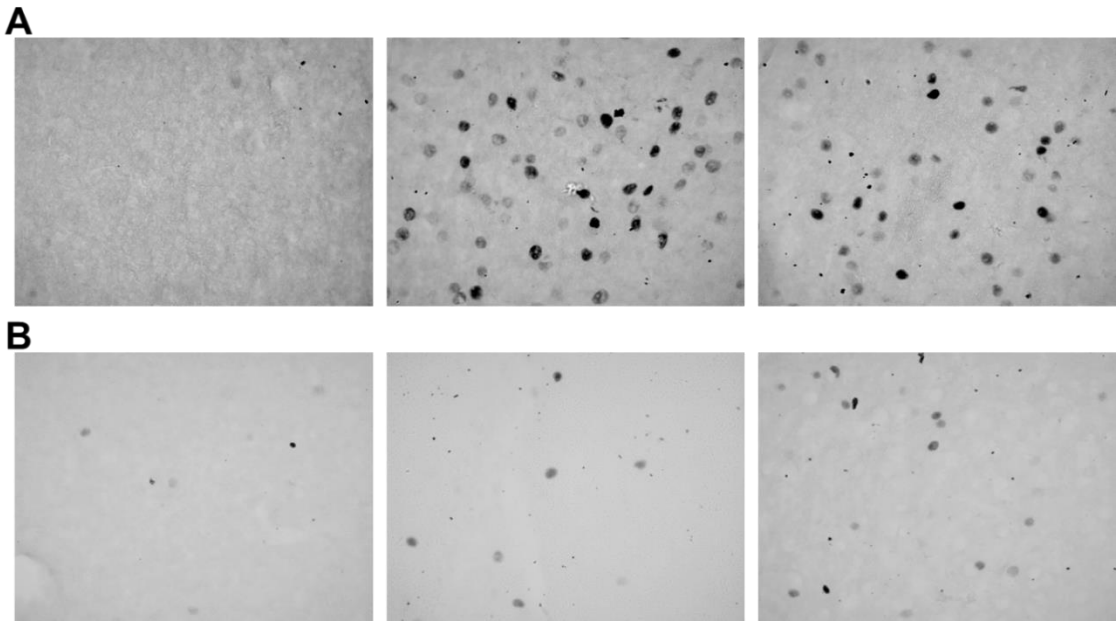


Figura 22. Ensayo de inmunohistoquímica para c-Fos. A. Núcleo paraventricular del hipotálamo. **B**. Región *Shell* del núcleo accumbens. De izquierda a derecha se presentan fotografías representativas del grupo basal, grupo vehículo y grupo nicotina.

El estrés agudo indujo expresión de la proteína c-Fos en el PVN sin diferencias basadas en el tratamiento. Pruebas t de medidas independientes mostraron un incremento significativo en la expresión de c-Fos en ambos grupos respecto a la expresión basal (Veh: $t_{(13)} = -2.52$, $p<0.05$; Nic: $t_{(13)} = -2.71$, $p<0.05$). Una prueba t de medidas independientes no mostró diferencias en el nivel de expresión de c-Fos del grupo nicotina respecto al grupo vehículo ($t_{(20)} = 1.24$, $p>0.05$). El análisis de la función de cambio en el PVN no mostró diferencias en el nivel de expresión de c-Fos del grupo nicotina respecto al grupo vehículo en ninguno de los percentiles evaluados ($dif_{(p.10)}$: -3.33, p=0.15; $dif_{(p.25)}$: -2.45, p=0.59; $dif_{(p.50)}$: -5.88, p=0.56; $dif_{(p.75)}$: -14.59, p=0.15; $dif_{(p.90)}$: -22.46, p=0.02) (Figura 23A).

Por otra parte, el estrés agudo indujo expresión de la proteína c-Fos en la AcbSh, en mayor medida a partir del percentil 90 entre los animales tratados con nicotina. Pruebas t de medidas independientes mostraron un incremento significativo en la expresión de c-Fos en ambos grupos respecto a la expresión basal (Veh: $t_{(13)} = -4.43$, $p<0.05$; Nic: $t_{(13)} = -2.40$, $p<0.05$). Una prueba t de medidas independientes no mostró diferencias en el nivel de expresión de c-Fos del grupo nicotina respecto al grupo vehículo ($t_{(20)} = -1.10$, $p>0.05$). El análisis de la función de cambio en la AcbSh mostró un mayor nivel de expresión de c-Fos en el grupo nicotina respecto al grupo vehículo, significativo en el percentil 90 ($dif_{(p.10)}$: -1.55, p=0.36; $dif_{(p.25)}$: -0.95, p=0.66; $dif_{(p.50)}$: 1.23, p=0.61; $dif_{(p.75)}$: 5.58, p=0.06; $dif_{(p.90)}$: 8.60, p= 0.00) (Figura 23B).

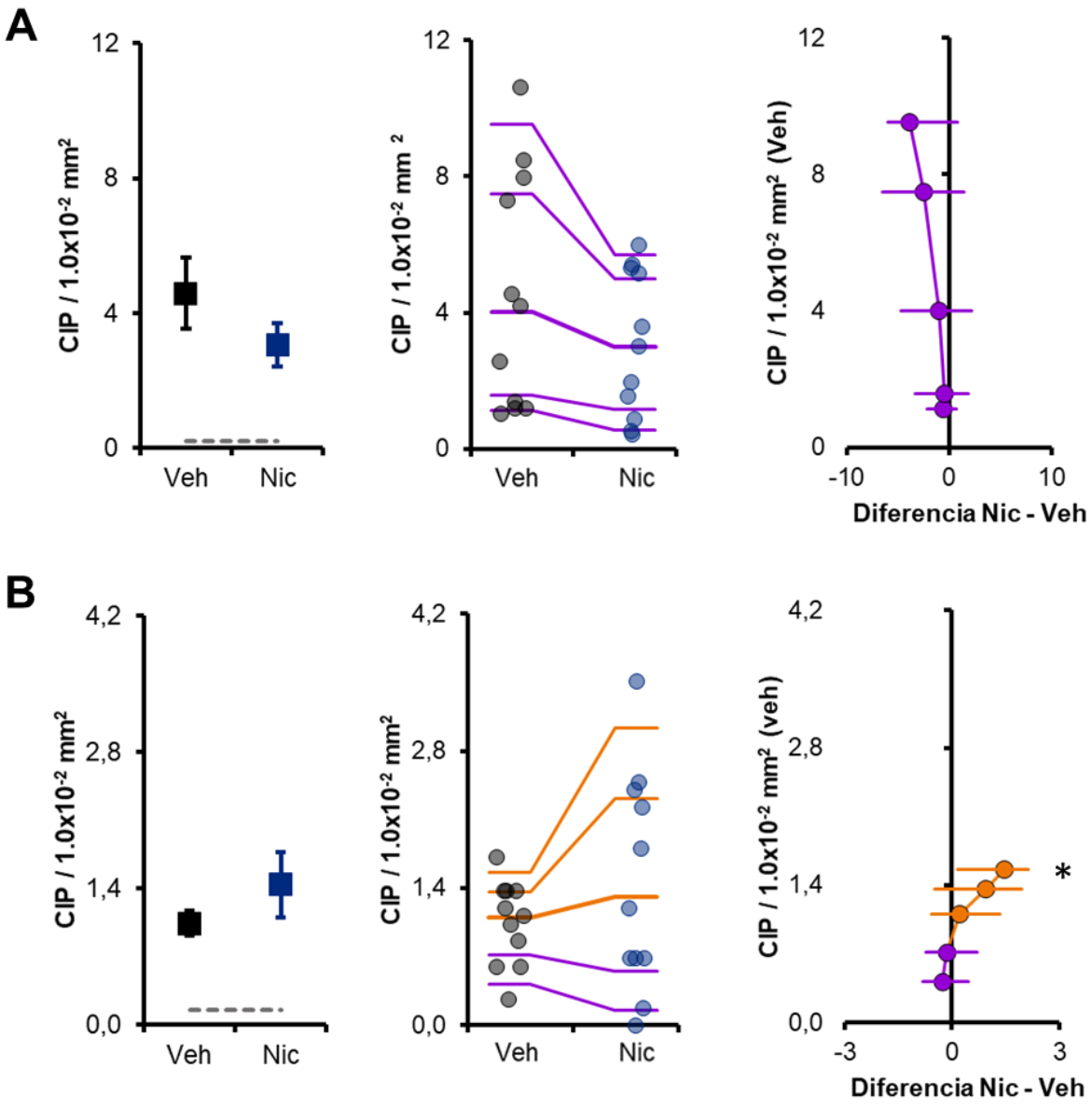


Figura 23. Inducción de c-Fos en respuesta a desafío con estrés agudo. A. Número de células inmunopositivas (CIP) para c-Fos en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) por unidad de área. **B**. Número de células inmunopositivas (CIP) para c-Fos en la región *Shell* del núcleo accumbens (AcbSh) por unidad de área. En el panel izquierdo los datos se presentan como promedio ± SEM, la línea punteada gris señala el límite superior del intervalo de confianza (IC) de la media del grupo basal. En el panel medio se presentan las observaciones individuales, los marcadores horizontales señalan los percentiles 10, 25, 50, 75 y 90 en los dos grupos. En el panel derecho se presentan las diferencias entre grupos ± IC de la diferencia en los percentiles 10, 25, 50, 75 y 90. Los marcadores de color violeta señalan un mayor valor en el grupo vehículo. Los marcadores de color anaranjado señalan un mayor valor en el grupo nicotina. * p < p crítico.

Discusión

Inicialmente, el tratamiento con nicotina fue efectivo para inducir sensibilización de la actividad locomotriz, sin tener efecto sobre conductas de ansiedad en el campo abierto. Posteriormente, la nicotina tuvo efectos discordantes sobre procesos de memoria espacial, esto es: no afectó la adquisición y facilitó el recobro, pero produjo que este proceso fuera más susceptible a la demanda ambiental y provocó un incremento selectivo de la inducción de la proteína c-Fos en regiones cerebrales relacionadas con la respuesta emocional. Durante la adquisición de la tarea espacial en el laberinto circular de Barnes (LCB) los animales pretratados con nicotina tuvieron un desempeño equivalente al de los animales control. No obstante, los animales pretratados con nicotina tuvieron mejores indicadores de recobro 24 horas después de terminado el entrenamiento; en contraste, bajo los efectos del estrés, los animales pretratados con nicotina tuvieron un mayor deterioro en los indicadores de recobro en relación con los animales sin experiencia con la droga. Estos resultados se discuten considerando los efectos moduladores de sistemas emocionales cerebrales sobre la actividad de múltiples sistemas de aprendizaje y memoria.

Efectividad del tratamiento farmacológico

A corto plazo la nicotina crónica indujo sensibilización de la actividad locomotriz. Esto se observó como un incremento de la distancia recorrida en el campo abierto durante el desafío crónico en los animales pretratados con nicotina. Este es un efecto ampliamente reportado que, se ha observado con múltiples procedimientos, dosis, duración de los tratamientos y tipos de drogas (Domino, 2001; Itzhak & Martin, 1999; Miller et al., 2001); también, se ha reportado que este es un efecto que se sostiene en el tiempo y está relacionado con la facilitación de la autoadministración de drogas; por esto, se ha sugerido que hace parte de las adaptaciones

comportamentales características de los modelos de consumo abusivo de sustancias en investigación preclínica (Baker et al., 2013; DiFranza & Wellman, 2007). Además, se ha mostrado que este efecto es inhibido al bloquear procesos de plasticidad sináptica en conexiones glutamatérgicas entre la corteza prefrontal y el núcleo accumbens (NAcb), sugiriendo su relación con procesos de reorganización neural a nivel de esta segunda estructura (Moussawi et al., 2009).

Adicionalmente, en el presente estudio se evaluó la modulación de conductas de ansiedad en el campo abierto. En este instrumento las conductas de ansiedad se observan en relación con la evitación de la región central del laberinto que, se ha mostrado correlacionada con la evitación de los brazos abiertos en el laberinto en cruz elevado (Carola et al., 2002). En el presente estudio no se observó modulación de las conductas de ansiedad, pues se observó un nivel de exploración del centro del campo abierto equivalente entre los animales pretratados con nicotina y los animales control. Esto es importante considerando que se ha reportado que la nicotina ejerce efectos moduladores de las conductas de ansiedad a largo plazo; sin embargo, los resultados son controvertidos. Por ejemplo, Morud et al. (2018) reportaron una disminución en las conductas de ansiedad en el laberinto en cruz elevado después de un tratamiento de tres semanas con inyecciones s.c. diarias de nicotina (0.36 mg/kg), pero sobre este estudio es importante señalar que el efecto sólo fue observado tras una retirada de dos o tres meses posterior al tratamiento. En contraste, Elliott et al. (2004) Mostraron una modulación de las conductas de ansiedad en una manera dependiente de la edad y el sexo en el laberinto en cruz elevado; después de dos días de tratamiento con inyecciones s.c. diarias de nicotina (0.5 - 1.0 mg/kg), se observó disminución de las conductas de ansiedad en ratas macho adolescentes y se observó incremento de las conductas de ansiedad en ratas macho adultas y hembras de ambas edades. En ese estudio no se evalúo la progresión de estos efectos.

La ausencia de efecto sobre conductas de ansiedad en el presente trabajo se podría relacionar con la ventana temporal de la evaluación. Como mostraron Morud et al., (2018) este efecto es una consecuencia de la exposición a la nicotina que evoluciona incluso después de la retirada prolongada, en paralelo con procesos de remodelación de estructuras límbicas. Sería necesaria una evaluación posterior a la retirada de la droga para probar esta alternativa. Además, es importante considerar que, en el presente estudio se utilizó una de las dosis más bajas con las que se han reportado adaptaciones de la actividad locomotriz en el campo abierto (DiFranza & Wellman, 2007). Comparando los estudios de Elliot et al. (2004) y Morud et al. (2018), se puede sugerir que la dosis de nicotina es un factor importante en la inducción de los efectos moduladores de las conductas de ansiedad. Esto podría sugerir una ausencia total de la modulación de conductas de ansiedad en el presente trabajo o el requerimiento de una ventana temporal más amplia para su detección. En cualquier caso, la presencia del efecto facilitador de la actividad locomotriz señaló la efectividad del tratamiento implementado en este estudio y podría advertir la adaptación de la actividad dopaminérgica en el estriado ventral (Morud et al., 2016).

El estriado ventral se ha descrito como un centro de *integración límbica-motora*, señalando su potencial para integrar información proveniente de estructuras límbicas y coordinar procesos de motivación, memoria y generación de comportamientos orientados a metas (Day & Carelli, 2007). Al mismo tiempo, el estriado ventral y en particular la región *Shell* del núcleo accumbens (AcbSh) guarda una estrecha relación con estructuras implicadas en la respuesta emocional. De hecho, la AcbSh integra un complejo anatómico denominado amígdala extendida, junto con el núcleo basal de la estría terminal y el núcleo central de la amígdala (Alheid, 2006; Koob & Schulkin, 2019). Este complejo juega un papel importante en la regulación de la respuesta de

estrés, el miedo y la ansiedad; además, sus diferentes componentes ejercen acciones moduladoras de la actividad del eje HPA a nivel cerebral (Kovács et al., 2018).

La amígdala extendida y el eje HPA constituyen los denominados sistemas emocionales cerebrales. Retomando la propuesta de Kelley (2004), los sistemas emocionales cerebrales organizan estados afectivos y coordinan procesos motivacionales para adaptar el comportamiento a las exigencias del entorno. De este modo, en el campo de las drogas de abuso, los sistemas emocionales cerebrales serían críticos en la integración de las propiedades motivacionales de las drogas y los estados afectivos provocados por estas. La remodelación de estos sistemas, inducida por drogas como la nicotina, representa un potencial mecanismo para la modulación del aprendizaje y la memoria de una manera global y esto podría resultar en alteraciones en la capacidad de los individuos para adaptarse a las exigencias ambientales incluso en ausencia de la droga.

Estructura multivariada del laberinto circular de Barnes

En el presente estudio se evaluaron los efectos a largo plazo de la nicotina crónica sobre el aprendizaje y el recobro de la tarea espacial del LCB durante un periodo de retirada prolongada. Considerando que se ha sugerido que el LCB puede ser influenciado por factores no cognitivos (Harrison et al., 2006; Wolfer et al., 1998); de manera preliminar, se implementó un análisis de componentes principales (ACP) con una base de datos complementaria. El propósito de este análisis inicial fue orientar la adaptación de un plan de análisis que permitiera evaluar la posible influencia de factores no mnemónicos sobre el desempeño en la tarea espacial del LCB.

Previamente, Wolfer et al. (1998) habían reportado un análisis factorial exploratorio para el laberinto acuático de Morris (LAM), el instrumento más utilizado para la evaluación de memoria

espacial en roedores (Harrison et al., 2006). En el trabajo de Wolfer et al. se identificaron tres factores que resumieron el 81% de la varianza en una base de datos de 1400 ratones. Curiosamente, el factor que los autores atribuyeron a la memoria fue el que representó la menor cantidad de varianza entre los tres: sólo el 13%. Los dos primeros factores se relacionaron con la constancia de la conducta de nado y la aproximación a las paredes del laberinto. Los resultados de ese estudio resaltan la posibilidad de que procesos de memoria en el LAM sean enmascarados por aspectos no cognitivos que se presentan de manera concurrente durante la ejecución de la tarea (Harrison et al., 2006). Respecto al LCB, algunos trabajos más recientes también han señalado la relación de indicadores conductuales en este laberinto con procesos no mnemónicos. Por ejemplo, Morel et al. (2015) evaluaron ratas hembra de avanzada edad con un protocolo en LCB similar al del presente estudio, en ese trabajo se discutió la influencia del acondicionamiento físico y la motivación por escapar, en relación con la frecuencia y especificidad de la conducta exploratoria. También, Attar et al. (2013) sugirieron la presencia de un factor de motivación en el LCB, en este caso relacionado con la exploración espacialmente no específica, concretamente, el número total de exploraciones de agujero durante un ensayo de prueba. No obstante, los dos estudios mencionados no utilizaron análisis de la estructura multivariada que permitieran apreciar de la independencia de indicadores mnemónicos y no mnemónicos en esta tarea. Las suposiciones presentadas se basaron únicamente en argumentos teóricos.

El ACP implementado en el presente estudio señaló la presencia de dos dimensiones en los indicadores del LCB. La estructura multivariada del LCB descrita aquí fue estable a lo largo de momentos importantes de la tarea, esto es: el inicio y final del entrenamiento, así como la prueba de recobro. Además, los resultados obtenidos con la base de datos del estudio de Ballesteros Cadena (2018) se replicaron con los datos del presente estudio (Anexo 2). Los dos componentes

extraídos recogieron entre el 79 y el 86 % de la varianza y mostraron una composición estable a lo largo de los tres momentos analizados en los dos estudios. El primer componente estuvo integrado por indicadores que convencionalmente se han reportado como mnemónicos en el LCB y sobre los que se presta mayor atención. Estos indicadores son: la latencia de llegada al agujero meta, la cantidad de errores de exploración, es decir, el número de exploraciones en agujeros diferentes al meta, los errores ponderados según la distancia entre el agujero meta y cada exploración errada, y finalmente, la distancia recorrida antes de llegar al agujero meta. Los indicadores mencionados cuantifican la eficiencia para encontrar el escape de la plataforma y se supone que representan procesos de memoria espacial (Illouz et al., 2016), mostrando una relación negativa entre el valor de los indicadores y la memoria a medida que progresa el entrenamiento.

Por otro lado, la identificación de un segundo componente en los indicadores conductuales del LCB es un hallazgo novedoso; probablemente, aquí se reporta una de las primeras exploraciones de la estructura factorial del LCB y los resultados sientan un precedente para poner a prueba la premisa sobre la influencia de factores no mnemónicos en este instrumento. El segundo componente estuvo integrado por dos indicadores: la latencia de la primera exploración y velocidad de desplazamiento media. A primera vista, los indicadores que integran este componente plantean un debate importante acerca de su naturaleza. Por una parte, se podría sugerir que están señalando la motivación por escapar de la plataforma; en línea con lo sugerido por Attar et al. (2013), estos indicadores estarían relacionados con aspectos espacialmente no específicos de la conducta exploratoria, en este sentido, animales más motivados por escapar iniciarían la exploración de manera más temprana y tenderían a desplazarse a mayor velocidad. Por otra parte, ambos indicadores podrían representar aspectos de la habilidad motora, pues animales más hábiles podrían desplazarse a mayor velocidad y llegar más rápido a los agujeros; de hecho, esta

interpretación es favorecida por la progresión de los indicadores durante la adquisición que, está en línea con lo reportado en pruebas específicas de la habilidad motora en roedores. En esas pruebas el desempeño mejora en función de la experiencia con el aparato (para una demostración ver Shiotsuki et al., 2010). Considerando los posibles efectos de la nicotina en el estriado ventral, las conductas motivadas y la actividad locomotriz, estas explicaciones señalaron la relevancia de explorar los efectos de la droga en el segundo componente del LCB y así poder detectar posibles efectos no mnemónicos de la nicotina, involucrados en el desempeño de la tarea.

No obstante, es igualmente importante reconocer las limitaciones de la aproximación utilizada en relación con las posibles inferencias a derivar de allí. Al respecto, vale aclarar que este es un ejercicio teórico y empírico que no está concluido. Para determinar la naturaleza del segundo componente y su relevancia, sería necesario identificar la sensibilidad de los indicadores a intervenciones que teóricamente afectan a los constructos de habilidad motora o motivación; además, sería necesario poner a prueba la hipótesis de la estructura bidimensional sugerida en el presente estudio, en contraste con la hipótesis clásica de unidimensionalidad. La segunda se encuentra implícita en la literatura cada vez que no se reportan efectos alternos a los mnemónicos en este instrumento. Para evaluar estas hipótesis sería necesario recurrir a un marco de análisis factorial confirmatorio y poner a prueba las relaciones que aquí se presentan con un carácter descriptivo (Figura 24).

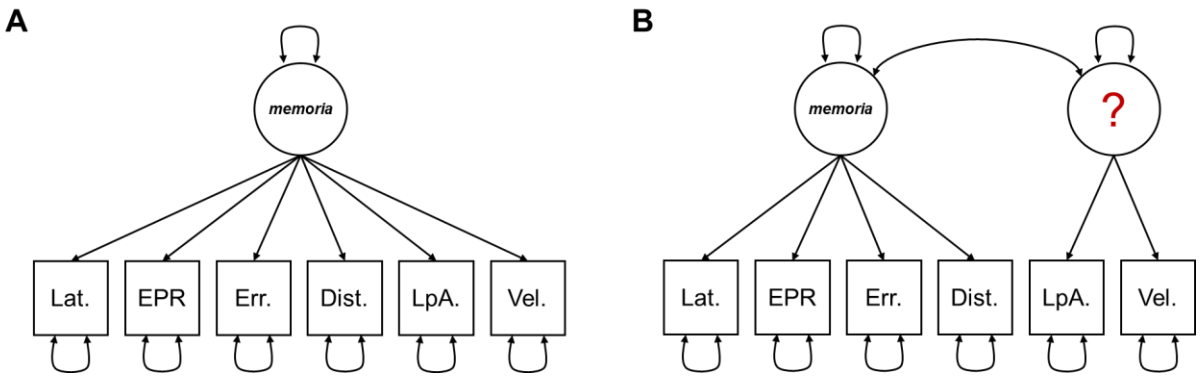


Figura 24. Diagramas de ruta para la tarea espacial del laberinto circular de Barnes. Se representa la estructura multivariada de los indicadores comportamentales en la tarea espacial del laberinto de Barnes. **A.** Estructura unidimensional clásica. **B.** Estructura bidimensional sugerida en el presente trabajo.

Los hallazgos del ACP motivaron la comparación en paralelo de los indicadores del primer y segundo componente del LCB. Por esto, se compararon los efectos del pretratamiento con nicotina sobre cuatro indicadores en los dos experimentos, esto es: la latencia de llegada al agujero meta y los errores ponderados para el primer componente, y la latencia al primer agujero y la velocidad de desplazamiento para el segundo componente.

Consecuencias a largo plazo de la exposición crónica a nicotina

La exposición crónica a la nicotina y su posterior retirada no afectó a largo plazo la adquisición de la tarea espacial en el LCB. Se observó una reducción significativa en los indicadores del primer componente a lo largo del entrenamiento tanto para los animales tratados con nicotina, como para los animales inyectados con solución salina, lo que indica el aprendizaje de la tarea. En los indicadores del segundo componente también se observó un cambio a lo largo del entrenamiento, sin diferencias basadas en el tratamiento. En el caso de la velocidad, se observó un incremento progresivo, contrario a la disminución observada en la latencia de exploración del primer agujero.

Por otro lado, a largo plazo la nicotina crónica mejoró el recobro en el LCB. En los animales control se observó un patrón de cambio entre el final del entrenamiento y la prueba de recobro que señaló un ligero detrimento en el desempeño ganado durante el entrenamiento. Los resultados obtenidos señalan que, de hecho, este detrimento del desempeño puede alcanzar niveles significativos bajo ciertas circunstancias. En el presente estudio se observó que los animales control tuvieron un incremento significativo en la latencia de llegada al agujero meta y los errores ponderados del final del entrenamiento hacia la prueba de recobro. Esto podría estar relacionado con el carácter *abreviado* del protocolo de entrenamiento. El protocolo utilizado en el presente estudio contrasta con otros protocolos típicamente encontrados en la literatura que utilizan múltiples días de entrenamiento, menos ensayos por sesión y mayores intervalos inter-ensayo (Vargas-López et al., 2011). Esto podría haber resultado en una adquisición subóptima de la tarea, pues se ha señalado que parámetros como el número total de ensayos pueden afectar el desempeño (Gawel et al., 2019). No obstante, según señalaron Vargas-López et al. (2011) el procedimiento es útil para la evaluación de intervenciones comportamentales y farmacológicas en diferentes etapas de la memoria espacial, así como para el estudio de los principios neurofisiológicos de este tipo de memoria. De hecho, el aparente desempeño subóptimo del grupo control podría permitir la detección de efectos mejoradores del desempeño. Efectivamente, los animales pretratados con nicotina mostraron mejores indicios de recobro de la tarea. En el caso de los animales pretratados con nicotina, el detrimento del final del entrenamiento hacia la prueba de recobro fue menor, en un nivel que no alcanzó a ser significativo. En los indicadores del segundo componente no se observaron diferencias entre el final del entrenamiento y la prueba de recobro, ni entre los grupos.

La mejora en el recobro podría estar relacionada con el carácter psicoestimulante de la nicotina. Los fármacos psicoestimulantes son definidos por sus efectos de incremento del

alertamiento y de la actividad locomotriz y por sus propiedades reforzantes (Berridge & Arnsten, 2013). No obstante, en bajas dosis, estos fármacos ejercen acciones reguladoras de la actividad de sistemas catecolaminérgicos (e.g. sistema dopaminérgico), de manera que modulan estados de alertamiento que mejoran el desempeño en tareas de atención, memoria de trabajo e inhibición comportamental (Arnsten & Pliszka, 2011). Desde esta perspectiva, la nicotina facilitaría procesos de alertamiento o de integración de información por medio de la estimulación de RCN que resultaría en la mejoría en el desempeño de la tarea de memoria espacial (Socci et al., 1995). Esta interpretación, aunque plausible, es difícil de sostener a la luz del presente estudio por dos razones. Primero, el efecto mejorador descrito en esos trabajos implica la acción directa de los fármacos estimulantes y en el presente estudio se asume que ni la nicotina, ni sus metabolitos activos se encontraban presentes en el momento de la evaluación en el LCB (para una revisión ver Matta et al., 2007); segundo, aunque se observa una mejora en el proceso de recobro, el desempeño durante la adquisición es equivalente entre los animales pretratados con nicotina y los animales control. Esto sugiere que la nicotina tuvo efecto en el proceso de transición entre estos dos momentos, esto es: la consolidación. La consolidación de la memoria es el proceso mediante el cual memorias recientemente formadas se estabilizan y transforman en memorias de larga duración (Squire et al., 2015). Este proceso está comúnmente referido a eventos a nivel sináptico y celular que estabilizan procesos de plasticidad neural en el término de horas después del aprendizaje (Squire et al., 2015). Particularmente, estudios con inhibidores de la síntesis de proteínas han mostrado que estos eventos son necesarios para la consolidación de la memoria (McGaugh, 2000) dado que teóricamente la síntesis de proteínas proporciona los efectores necesarios para las reorganizaciones neuronales que soportan la formación de la memoria (Gold, 2017; Squire et al., 2015). El mecanismo por medio del cual la nicotina afecta un fenómeno de esta naturaleza podría estar

relacionado con su actividad inhibitoria sobre las proteínas deacetilasas de histonas (HDAC). Sobre esto, Levine et al. (2011) mostraron que un tratamiento con nicotina por una semana redujo la actividad de HDAC en el estriado, además facilitó la respuesta comportamental y los procesos de PLP inducidos por otra droga. Igualmente, existe un creciente cuerpo de evidencia señalando que la nicotina imita la acción de fármacos inhibidores de las HDAC y que estos fármacos pueden modular aspectos de las propiedades reforzantes de la nicotina (Faillace & Bernabeu, 2019). En línea con lo explicado por Levine et al. (2011), la supresión de las HDAC ejercida por la nicotina podría promover un entorno celular preparado para la producción de nuevas proteínas que podrían funcionar como los efectores necesarios para la reorganización neuronal durante la formación de nuevas memorias. No obstante, esta idea es problemática, pues plantea una explicación demasiado simple y poco específica sobre la consolidación de la memoria en el cerebro.

Una alternativa hipotética para el problema de inespecificidad de los mecanismos moleculares en la consolidación de la memoria es que estos sean explotados a nivel sistémico, por medio de la participación de circuitos cerebrales que coordinen estas adaptaciones moleculares con eventos celulares inducidos por las situaciones de aprendizaje, resultando en una modulación de los procesos de memoria. La propuesta del presente trabajo es que, por medio de la remodelación de regiones clave para el procesamiento emocional, la nicotina puede ejercer una actividad moduladora del aprendizaje y la memoria, sacando provecho de mecanismos moleculares, grabados en la forma de adaptaciones epigenéticas inducidas durante la exposición crónica a la droga. Con relación a esto, se ha mostrado que núcleos de la amígdala en conjunto con regiones del estriado ventral ejercen acciones moduladoras sobre procesos de memoria en diferentes sistemas (McGaugh & Roozendaal, 2017). Con particular relevancia para este estudio, se ha expuesto que la activación emocional, mediada por estructuras como la amígdala, interfiere

con las memorias dependientes de hipocampo (Goodman et al., 2017). Con el ánimo de poner a prueba la propuesta de este trabajo, se analizaron los efectos de un desafío con estrés agudo sobre el recobro de la tarea espacial del LCB y la inducción de la proteína c-Fos en estructuras de los sistemas emocionales cerebrales.

De manera importante, contrario a lo esperado, el estrés no tuvo un efecto deletéreo en el recobro de la tarea espacial del LCB en los animales control. Este resultado contrasta con trabajos previos del laboratorio (para una demostración ver Troncoso et al., 2010). En el caso de los animales control se observó la misma tendencia descrita en el primer experimento, esto es: se presentó un ligero detrimento del desempeño alcanzado al final del entrenamiento. No obstante, en el segundo experimento el detrimento de los indicadores del primer componente en los animales control no alcanzó un nivel significativo; al respecto, vale mencionar que bajo los efectos del estrés la variabilidad aumentó de manera considerable, este aumento se puede apreciar en los índices de variación para cada indicador; en el caso de la latencia, el índice de variación en el primer experimento fue 0.9 y en el segundo experimento, bajo los efectos del estrés, el índice de variación fue 1.3; en el caso de los errores ponderados los índices de variación fueron 0.9 y 1.2 respectivamente; por esto, a pesar de observarse una tendencia similar en ambos experimentos, en el segundo no se contó con el poder estadístico necesario para la detección de este efecto. El incremento de la variabilidad en el grupo sometido a estrés es un evento secundario a las diferencias individuales en la respuesta de estrés que han sido reiteradamente descritas (para una revisión ver Ellis et al., 2006).

Adicionalmente, Solano López (2019) realizó un análisis detallado, señalando que la extensión de las manipulaciones, como las utilizadas en este estudio, resultarían en reducción de los niveles de alertamiento en el contexto de la tarea espacial del LCB y esto modificaría la

sensibilidad de esta memoria a la demanda ambiental. En su análisis, Solano López extendió el modelo de relación en U invertida entre el alertamiento y el desempeño que, típicamente ha sido descrito en el contexto de la adquisición y consolidación de la memoria, y lo aplicó en el contexto del recobro de la memoria espacial (para una revisión ver Sandi, 2013). En este sentido, la ausencia de efecto deletéreo del estrés en los animales control podría estar relacionada con la disminución del alertamiento intrínseco a la tarea, combinada con la mediación de diferencias individuales en la respuesta al estrés, de manera que el desempeño promedio del grupo control estresado se mantuvo en un nivel relativamente óptimo (según los estándares de este estudio).

En contraste, los animales pretratados con nicotina presentaron un detrimento significativo en los indicadores del primer componente durante la prueba de recobro bajo los efectos del estrés. Este resultado llama la atención, considerando que en el primer experimento la nicotina tuvo un efecto facilitador de la consolidación de la memoria espacial. Esto señala un aumento de la sensibilidad de la memoria espacial a los efectos deletéreos de la demanda ambiental sobre el recobro; posiblemente relacionado con una adaptación de los sistemas emocionales cerebrales y sus acciones moduladoras del aprendizaje y la memoria. Sobre esto, se ha explicado que diferentes niveles de activación emocional influencian el control del comportamiento por parte de diferentes sistemas de memoria (Goodman et al., 2017).

Se ha señalado que tareas de memoria espacial, como la del LCB, pueden ser solucionadas mediante el uso de diferentes estrategias (Harrison et al., 2006; Illouz et al., 2016). En este contexto, diferentes sistemas de memoria adquieren información en paralelo acerca de la situación de aprendizaje y contribuyen en diferente medida al control del comportamiento, dependiendo del tipo de información codificada (Gruber & McDonald, 2012; McDonald et al., 2017). Por ejemplo, se ha sugerido la participación de un sistema dependiente del hipocampo, que se caracteriza por

patrones de respuesta flexibles basados en las relaciones espaciales entre los elementos del entorno (Danjo et al., 2018; Gruber & McDonald, 2012). En paralelo, se ha sugerido la participación de un sistema dependiente del estriado dorsolateral, que se caracteriza por patrones de respuesta automáticos basados en relaciones de tipo estímulo - respuesta (Burton et al., 2015; Gruber & McDonald, 2012).

En algunas situaciones, el estrés agudo o agentes ansiogénicos, sesgan la actividad cerebral hacia el uso del sistema de memoria dependiente del estriado dorsolateral, por encima del sistema dependiente del hipocampo (M. G. Packard & Goodman, 2012). Por ejemplo, Schwabe et al. (2010) diseñaron una tarea en el LCB que les permitió clasificar las estrategias utilizadas para solucionar la tarea (entre espacial o de estímulo - respuesta). En dicha tarea, los animales eran entrenados para escapar del laberinto por medio de un único agujero que se encontraba señalizado con un objeto visible desde la plataforma; durante la prueba, el objeto se ubicaba en el lado opuesto de la plataforma, señalando un segundo agujero que era habilitado para escapar en ese momento. Durante la prueba, escapar a través del único agujero habilitado durante el entrenamiento y que en ese momento no se encontraba señalizado, se consideró evidencia del uso de una estrategia espacial; en contraste, escapar por el agujero señalizado, ubicado en una posición que no estuvo disponible durante el entrenamiento, se consideró evidencia del uso de una estrategia de estímulo - respuesta. Además, en el estudio de Schwabe et al., se utilizó un desafío con estrés antes de la prueba de recobro y se observó que el estrés promovió el uso de la estrategia de estímulo - respuesta y deterioró el desempeño de los animales que conservaron la estrategia espacial.

En el contexto del presente estudio, la nicotina podría haber promovido un incremento de la sensibilidad de los sistemas emocionales cerebrales a la demanda ambiental. Al someter a los animales al desafío con estrés, una mayor respuesta a nivel de los sistemas emocionales cerebrales

podría haber promovido la pérdida sobre el control del comportamiento por parte del sistema de tipo espacial, en favor del sistema de tipo estímulo - respuesta. El sistema espacial es más eficiente en la formación de relaciones útiles para la solución de tareas como la del LCB (McDonald et al., 2017), y esto podría implicar que el cambio en el control del comportamiento resultara en un deterioro del desempeño.

En favor de esa interpretación, a largo plazo la nicotina crónica incrementó selectivamente la inducción de la proteína c-Fos en respuesta al estrés agudo, en regiones de sistemas emocionales cerebrales, específicamente en la región *Shell* del núcleo accumbens (AcbSh). La proteína c-Fos sigue un patrón de expresión aguda ante diferentes tipos de estimulación y ha sido utilizada como un marcador inespecífico de activación postsináptica, útil para el mapeo de la respuesta de sistemas cerebrales (Kovács et al., 2018; Marttila et al., 2006; Sagar et al., 1988). El incremento en la inducción de c-Fos en la AcbSh reportado aquí, es compatible con reportes previos en dónde se ha mostrado que la nicotina induce la expresión de dicha proteína en esa región (Marttila et al., 2006; Shim et al., 2001). De manera adicional, el resultado descrito señala el carácter de largo plazo de la influencia de la nicotina sobre procesos moleculares durante la retirada prolongada de las drogas (Becker et al., 2017), y también proporciona evidencia sobre las implicaciones funcionales de la adaptación de la AcbSh y su posible contribución en la respuesta diferencial a las drogas (Day & Carelli, 2007; Nestler & Lüscher, 2019).

A manera de resumen, bajo condiciones normales, los sistemas emocionales cerebrales ejercen acciones moduladoras de procesos de memoria (McGaugh & Roozendaal, 2017). Estos participan en la coordinación de diferentes sistemas de memoria en el control del comportamiento (Gruber & McDonald, 2012). Frente a la exposición crónica a la nicotina ocurren adaptaciones moleculares que promueven la remodelación de sistemas cerebrales (Volkow, 2011). En particular,

son sobresalientes los procesos plásticos que ocurren el estriado ventral (Morud et al., 2016, 2018), pues esta región cerebral es importante para la respuesta a las drogas y la interacción de los sistemas emocionales cerebrales con procesos neurales propios del aprendizaje y la memoria (Gruber & McDonald, 2012; Koob & Schulkin, 2019). Los resultados del presente trabajo señalaron que, a largo plazo, la nicotina facilita la consolidación de la memoria espacial, pero contribuye a un incremento de la sensibilidad a los efectos deletéreos de la demanda ambiental sobre el recobro, junto con un incremento selectivo de la inducción de la proteína c-Fos en la AcbSh en respuesta al estrés agudo; apoyando la hipótesis de la adaptación de sistemas emocionales cerebrales durante la retirada prolongada de la nicotina crónica (Figura 25).

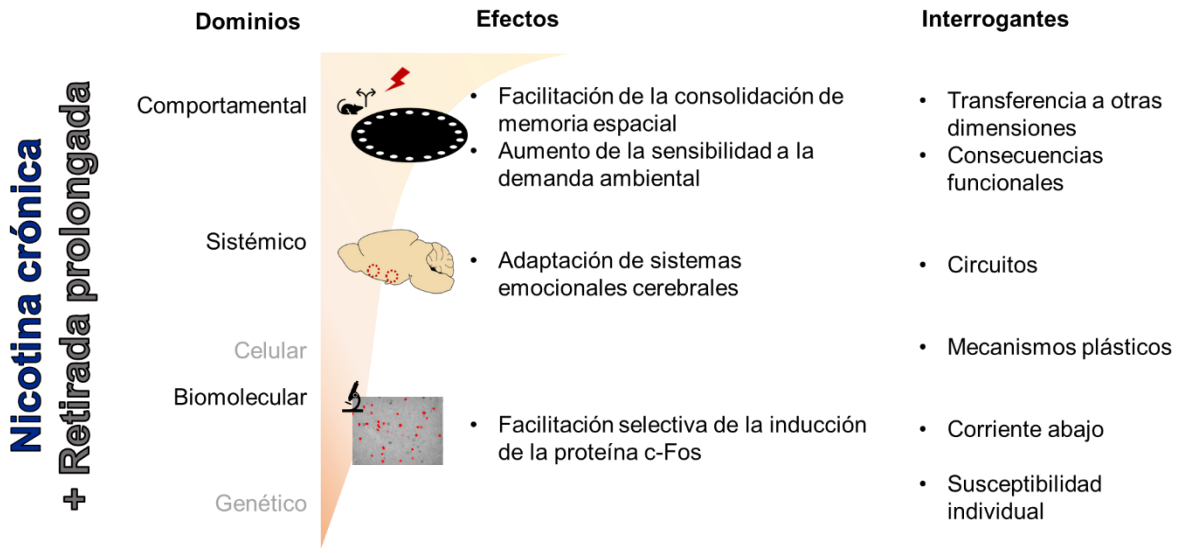


Figura 25. Resumen gráfico. Se presenta una síntesis de los principales hallazgos del trabajo y algunos de los interrogantes motivados por estos hallazgos.

Consideraciones metodológicas y perspectivas futuras

En el presente estudio se implementaron herramientas de análisis complementarias a las pruebas para las hipótesis principales del trabajo. En conjunto con los hallazgos discutidos

previamente, estos análisis complementarios proporcionan una perspectiva más detallada sobre los resultados y dan lugar a interrogantes que quedan pendientes. Por ejemplo, el ACP sugirió la existencia de una estructura bidimensional en los indicadores comportamentales del LCB. A pesar de los interrogantes pendientes sobre la naturaleza del segundo componente de esta prueba, la ausencia de un efecto del estrés o de la nicotina en esos indicadores sugiere una especificidad de los resultados sobre procesos mnemónicos. Este es un detalle importante, considerando la supuesta sensibilidad de esta tarea a factores ajenos a la memoria (Harrison et al., 2006), y permite sacar provecho de las relaciones entre los elementos del comportamiento en esta tarea para comprender los efectos de diferentes tratamientos (Giuliani, 2017).

Adicionalmente, se aprovechó la semejanza de los experimentos independientes para evaluar la replicabilidad de los efectos reportados. Esta estrategia permitió corroborar los resultados del campo abierto y la adquisición de la tarea espacial en el LCB. Esto es, la exposición crónica a la nicotina fue efectiva para inducir sensibilización de la actividad locomotriz, sin adaptaciones de las conductas de ansiedad en el campo abierto y a largo plazo, tras su retirada, la nicotina no afectó la adquisición de la tarea de memoria espacial. Corroborar la presencia de estos efectos en grupos independientes fue importante pues señaló la presencia de resultados robustos detectables con tamaños de muestra razonables, un factor crítico para garantizar la reproducibilidad y fiabilidad (Gulinello et al., 2019).

Por otro lado, el uso de la función de cambio permitió detectar una facilitación selectiva de la inducción de la proteína c-Fos. Este resultado es compatible con la sensibilidad diferencial que se ha descrito con relación a los efectos de las drogas de abuso y del estrés. Se ha reconocido que los trastornos por abuso de sustancias no son condiciones que se desarrollen en todos los individuos que son expuestos de manera repetida a una droga, por el contrario, son condiciones altamente

relacionadas con vulnerabilidades individuales que pueden radicar en particularidades genéticas (Para una revisión ver Nestler & Lüscher, 2019). Esto es importante considerando que herramientas estadísticas convencionales que recaen en la comparación de medidas de tendencia central, tienen sensibilidad limitada a diferencias en la distribución entre grupos y no tienen un buen desempeño para datos que no cumplen pruebas de criterios, generando dificultades para la detección de efectos que no son homogéneos entre individuos (Rousselet et al., 2017).

Por último, los resultados reportados en el presenten trabajo dejan diversos interrogantes. Por ejemplo, se observó una facilitación de la consolidación de la memoria en una tarea que no ocurrió de manera contingente con la administración del fármaco, de hecho, esta facilitación se observó en un periodo de retirada prolongada de la droga ¿podría esto tener un potencial terapéutico? ¿este es un efecto exclusivo sobre la memoria espacial o puede ser transferido a otros tipos de tareas? En contraste, la nicotina incrementó la sensibilidad de la memoria espacial a los efectos deletéreos de la demanda ambiental sobre el recobro ¿cuáles son las consecuencias funcionales de esta adaptación? ¿qué relación guardan estos hallazgos con reportes en la investigación clínica? Los resultados se discutieron desde el marco de múltiples sistemas de memoria, desde allí, el deterioro en el desempeño de la terea de memoria espacial podría estar relacionado con un cambio hacia una estrategia de estímulo - respuesta ¿cómo identificar este cambio de estrategia en los indicadores comportamentales del LCB? Además, se sugirió la influencia diferencial del estrés posterior al tratamiento con nicotina ¿cuáles son los mecanismos responsables de esa respuesta diferencial? ¿estos mecanismos guardan relación con las supuestas vulnerabilidades individuales al abuso de sustancias? ¿cuáles son los eventos corriente abajo de la inducción de la proteína c-Fos? ¿estos eventos están relacionados con los efectos

comportamentales observados? ¿están relacionados con la supuesta acción moduladora de la nicotina sobre la actividad de las HDAC?

Algunos de estos interrogantes podrían ser abordados a mediano plazo con recursos disponibles en el Laboratorio de Neurociencias. Por ejemplo, con relación al efecto deletéreo del estrés sobre el recobro en los animales pretratados con nicotina, se podría evaluar la supuesta pérdida del control del comportamiento por parte del sistema espacial, implementando un análisis de las estrategias desplegadas durante la prueba de recobro por medio del software BUNS, trabajos previos del laboratorio han avanzado el uso de esta herramienta y han sugerido su utilidad para la identificación de efectos derivados de diferentes tratamientos (Amaya Durán, 2018). Por otro lado, la posible relación de estos efectos con la inhibición de las HDAC podría evaluarse por medio de un ensayo de inmunohistoquímica para determinar el nivel de acetilación de histonas (e.g. acH3K14) en animales pretratados con nicotina, en una ventana temporal como la del presente estudio. Como consecuencia de la inhibición de las HDAC los niveles de acetilación de las histonas deberían incrementar, de hecho, Levine et al. (2011) mostraron que un tratamiento con nicotina generó incremento en la acetilación de histonas en el estriado, en una ventana temporal más corta que la del presente estudio; además de esto, este marcador ha sido previamente evaluado en el contexto de la tarea espacial del LCB en el Laboratorio de Neurociencias; continuar en esta línea podría contribuir en la determinación de la temporalidad de los efectos moleculares de la nicotina y en la comprensión de su relación con la formación de la memoria espacial.

Referencias

Abdulla, F. A., Gray, J. A., Sinden, J. D., Bradbury, E., Calaminici, M. R., Lippiello, P. M., & Wonnacott, S. (1996). Relationship between up-regulation of nicotine binding sites in rat brain and delayed cognitive enhancement observed after chronic or acute nicotinic receptor stimulation. *Psychopharmacology*, *124*(4), 323–331. https://doi.org/10.1007/BF02247437

Abel, T., & Lattal, K. M. (2001). Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Current Opinion in Neurobiology*, *11*(2), 180–187. https://doi.org/10.1016/S0959-4388(00)00194-X

Alheid, G. F. (2006). Extended Amygdala and Basal Forebrain. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *985*(1), 185–205. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07082.x

Amaya Durán, L. E. (2018). *Caracterización de las Estrategias de Aprendizaje de una Tarea Espacial en el Laberinto Circular de Barnes* [Universidad Nacional de Colombia]. http://bdigital.unal.edu.co/70168/

Arnsten, A. F. T., & Pliszka, S. R. (2011). Catecholamine influences on prefrontal cortical function: Relevance to treatment of attention deficit/hyperactivity disorder and related disorders. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *99*(2), 211–216. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.01.020

Attar, A., Liu, T., Chan, W.-T. C., Hayes, J., Nejad, M., Lei, K., & Bitan, G. (2013). A Shortened Barnes Maze Protocol Reveals Memory Deficits at 4-Months of Age in the Triple-Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*, *8*(11), e80355. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080355

Baker, L. K., Mao, D., Chi, H., Govind, A. P., Vallejo, Y. F., Iacoviello, M., Herrera, S., Cortright, J. J., Green, W. N., McGehee, D. S., & Vezina, P. (2013). Intermittent nicotine exposure upregulates nAChRs in VTA dopamine neurons and sensitises locomotor responding to the drug. *European Journal of Neuroscience*, *37*(6), 1004–1011. https://doi.org/10.1111/ejn.12114

Bale, T. L. (2015). Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nature Reviews Neuroscience*, *16*(6), 332–344. https://doi.org/10.1038/nrn3818

Balfour, D. J. K. (2015). *The Role of Mesoaccumbens Dopamine in Nicotine Dependence* (pp. 55–98). https://doi.org/10.1007/978-3-319-13482-6_3

Ballesteros Cadena, D. C. (2018). *Efectos del estrés agudo sobre la reconsolidación de la memoria espacial y el patrón de expresión de la proteina c-Fos.* [Universidad Nacional de Colombia]. http://bdigital.unal.edu.co/69849/

Becker, J. A. J., Kieffer, B. L., & Le Merrer, J. (2017). Differential behavioral and molecular alterations upon protracted abstinence from cocaine versus morphine, nicotine, THC and alcohol. *Addiction Biology*, *22*(5), 1205–1217. https://doi.org/10.1111/adb.12405

Berridge, C. W., & Arnsten, A. F. T. (2013). Psychostimulants and motivated behavior: Arousal and cognition. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *37*(9), 1976–1984. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2012.11.005

Brown, R. W., & Gill, W. D. (2019). Nicotine, Neural Plasticity, and Nicotine's Therapeutic Potential. In *Neuroscience of Nicotine* (pp. 65–70). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813035-3.00009-5

Burton, A. C., Nakamura, K., & Roesch, M. R. (2015). From ventral-medial to dorsal-lateral striatum: Neural correlates of reward-guided decision-making. *Neurobiology of Learning and Memory*, *117*, 51–59. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.05.003

Carola, V., D'Olimpio, F., Brunamonti, E., Mangia, F., & Renzi, P. (2002). Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behavioural Brain Research*, *134*(1–2), 49–57. https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00452-1

Chen, H., Fu, Y., & Sharp, B. M. (2008). Chronic Nicotine Self-Administration Augments Hypothalamic–Pituitary–Adrenal Responses to Mild Acute Stress. *Neuropsychopharmacology*, *33*(4), 721–730. https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301466

Chrousos, G. P. (1992). The Concepts of Stress and Stress System Disorders. *JAMA*, *267*(9), 1244. https://doi.org/10.1001/jama.1992.03480090092034

Danjo, T., Toyoizumi, T., & Fujisawa, S. (2018). Spatial representations of self and other in the hippocampus. *Science*, *359*(6372), 213–218. https://doi.org/10.1126/science.aao3898

Day, J. J., & Carelli, R. M. (2007). The Nucleus Accumbens and Pavlovian Reward Learning. *The Neuroscientist*, *13*(2), 148–159. https://doi.org/10.1177/1073858406295854

de Kloet, E. R., Joëls, M., & Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *6*(6), 463–475. https://doi.org/10.1038/nrn1683

Deiana, S., Platt, B., & Riedel, G. (2011). The cholinergic system and spatial learning. *Behavioural Brain Research*, *221*(2), 389–411. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.036

DiFranza, J., & Wellman, R. (2007). Sensitization to nicotine: How the animal literature might inform future human research. *Nicotine & Tobacco Research*, *9*(1), 9–20. https://doi.org/10.1080/14622200601078277

Domino, E. F. (2001). Nicotine induced behavioral locomotor sensitization. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *25*(1), 59–71. https://doi.org/10.1016/S0278-5846(00)00148-2

Eiland, L., & Romeo, R. D. (2013). Stress and the developing adolescent brain. *Neuroscience*, *249*, 162–171. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.10.048

Elliott, B. M., Faraday, M. M., Phillips, J. M., & Grunberg, N. E. (2004). Effects of nicotine on elevated plus maze and locomotor activity in male and female adolescent and adult rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *77*(1), 21–28. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2003.09.016

Ellis, B., Jackson, J., & Boyce, W. (2006). The stress response systems: Universality and adaptive individual differences☆. *Developmental Review*, *26*(2), 175–212. https://doi.org/10.1016/j.dr.2006.02.004

Faillace, M. P., & Bernabeu, R. O. (2019). Effects of Nicotine and Histone Deacetylase Inhibitors on the Brain. In *Neuroscience of Nicotine* (pp. 365–373). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813035-3.00045-9

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

Gawel, K., Gibula, E., Marszalek-Grabska, M., Filarowska, J., & Kotlinska, J. H. (2019). Assessment of spatial learning and memory in the Barnes maze task in rodents—methodological consideration. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *392*(1), 1–18. https://doi.org/10.1007/s00210-018-1589-y

Giuliani, A. (2017). The application of principal component analysis to drug discovery and biomedical data. *Drug Discovery Today*, *22*(7), 1069–1076. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.01.005

Gold, P. E. (2017). Protein Synthesis and Memory. In *Learning and Memory: A Comprehensive Reference* (Second Edi, Vol. 4, pp. 293–310). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.21119-X

Goodman, J., McIntyre, C., & Packard, M. G. (2017). Amygdala and Emotional Modulation of Multiple Memory Systems. In *The Amygdala - Where Emotions Shape Perception, Learning and Memories* (Vol. 395, pp. 116–124). InTech. https://doi.org/10.5772/intechopen.69109

Gould, T. (2009). *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice: Characterization Using Behavioral Tests*. Humana press.

Gould, T. J. (2010). Addiction and cognition. *Addiction Science & Clinical Practice*, *5*(2), 4–14. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22002448

Gruber, A. J., & McDonald, R. J. (2012). Context, emotion, and the strategic pursuit of goals: interactions among multiple brain systems controlling motivated behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *6*(AUGUST), 1–26. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00050

Gulinello, M., Mitchell, H. A., Chang, Q., Timothy O'Brien, W., Zhou, Z., Abel, T., Wang, L., Corbin, J. G., Veeraragavan, S., Samaco, R. C., Andrews, N. A., Fagiolini, M., Cole, T. B., Burbacher, T. M., & Crawley, J. N. (2019). Rigor and reproducibility in rodent behavioral research. *Neurobiology of Learning and Memory*, *165*(January 2018), 106780. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.01.001

Harrison, F. E., Reiserer, R. S., Tomarken, A. J., & McDonald, M. P. (2006). Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. *Learning and Memory*, *13*(6), 809–819. https://doi.org/10.1101/lm.334306

Hyman, S. E. (2005). Addiction: A disease of learning and memory. *American Journal of Psychiatry*, *162*(8), 1414–1422. https://doi.org/10.1176/appi.ajp.162.8.1414

Illouz, T., Madar, R., Clague, C., Griffioen, K. J., Louzoun, Y., Okun, E., & Gan, R. (2016). *Data and text mining Unbiased classification of spatial strategies in the Barnes maze*. *32*(July), 3314–3320. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw376

Itzhak, Y., & Martin, J. L. (1999). Effects of cocaine, nicotine, dizocipline and alcohol on mice locomotor activity: cocaine–alcohol cross-sensitization involves upregulation of striatal dopamine transporter binding sites. *Brain Research*, *818*(2), 204–211. https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)01260-8

Kelley, A. E. (2004). Memory and Addiction. *Neuron*, *44*(1), 161–179. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.016

Kenney, J. W., & Gould, T. J. (2008). Modulation of Hippocampus-Dependent Learning and Synaptic Plasticity by Nicotine. *Molecular Neurobiology*, *38*(1), 101–121.

https://doi.org/10.1007/s12035-008-8037-9

Kohlmeier, K. A. (2019). Synaptically Located Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits in Neurons Involved in Dependency to Nicotine. In *Neuroscience of Nicotine* (pp. 49–56). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813035-3.00007-1

Kolb, B., & Gibb, R. (2014). Searching for the principles of brain plasticity and behavior. *Cortex*, *58*, 251–260. https://doi.org/10.1016/j.cortex.2013.11.012

Koob, G. F., & Schulkin, J. (2019). Addiction and stress: An allostatic view. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *106*, 245–262. https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.09.008

Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology*, 217–238. https://doi.org/10.1038/npp.2009.110

Kovács, L. Á., Schiessl, J. A., Nafz, A. E., Csernus, V., & Gaszner, B. (2018). Both Basal and Acute Restraint Stress-Induced c-Fos Expression Is Influenced by Age in the Extended Amygdala and Brainstem Stress Centers in Male Rats. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *10*(AUG), 1–20. https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00248

Kutlu, M. G., & Gould, T. J. (2015). Nicotinic Receptors, Memory, and Hippocampus. In D. J. K. Balfour & M. R. Munafò (Eds.), *Current topics in behavioral neurosciences* (Vol. 23, Issue August 2016, pp. 137–163). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13665-3_6

Kvetnansky, R., Sabban, E. L., & Palkovits, M. (2009). Catecholaminergic Systems in Stress: Structural and Molecular Genetic Approaches. *Physiological Reviews*, *89*(2), 535–606.

https://doi.org/10.1152/physrev.00042.2006

Levine, A., Huang, Y., Drisaldi, B., Griffin, E. A., Pollak, D. D., Xu, S., Yin, D., Schaffran, C., Kandel, D. B., & Kandel, E. R. (2011). Molecular Mechanism for a Gateway Drug: Epigenetic Changes Initiated by Nicotine Prime Gene Expression by Cocaine. *Science Translational Medicine*, *3*(107), 107ra109-107ra109. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003062

Li, H., Penzo, M. A., Taniguchi, H., Kopec, C. D., Huang, Z. J., & Li, B. (2013). Experience-dependent modification of a central amygdala fear circuit. *Nature Neuroscience*, *16*(3), 332–339. https://doi.org/10.1038/nn.3322

Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(6), 434–445. https://doi.org/10.1038/nrn2639

Marinelli, M., Rougé-Pont, F., Deroche, V., Barrot, M., De Jésus-Oliveira, C., Le Moal, M., & Piazza, P. V. (1997). Glucocorticoids and behavioral effects of psychostimulants. I: locomotor response to cocaine depends on basal levels of glucocorticoids. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *281*(3), 1392–1400. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9190875

Marttila, K., Raattamaa, H., & Ahtee, L. (2006). Effects of chronic nicotine administration and its withdrawal on striatal FosB/ΔFosB and c-Fos expression in rats and mice. *Neuropharmacology*, *51*(1), 44–51. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.02.014

Matta, S. G., Balfour, D. J., Benowitz, N. L., Boyd, R. T., Buccafusco, J. J., Caggiula, A. R., Craig,

C. R., Collins, A. C., Damaj, M. I., Donny, E. C., Gardiner, P. S., Grady, S. R., Heberlein, U., Leonard, S. S., Levin, E. D., Lukas, R. J., Markou, A., Marks, M. J., McCallum, S. E., … Zirger, J. M. (2007). Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. *Psychopharmacology*, *190*(3), 269–319. https://doi.org/10.1007/s00213-006-0441-0

Matthews, S. G., & McGowan, P. O. (2019). Developmental programming of the HPA axis and related behaviours: epigenetic mechanisms. *Journal of Endocrinology*, *242*(1), T69–T79. https://doi.org/10.1530/JOE-19-0057

McDonald, R. J., Devan, B. D., & Hong, N. S. (2004). Multiple memory systems: The power of interactions. *Neurobiology of Learning and Memory*, *82*(3), 333–346. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.05.009

McDonald, R. J., Hong, N. S., & Devan, B. D. (2017). Interactions Among Multiple Parallel Learning and Memory Systems in the Mammalian Brain. In *Learning and Memory: A Comprehensive Reference* (Second Edi, Vol. 3, Issue 5, pp. 9–47). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.21067-5

McDonald, R. J., & White, N. M. (1993). A triple dissociation of memory systems: Hippocampus, amygdala, and dorsal striatum. *Behavioral Neuroscience*, *127*(6), 835–853. https://doi.org/10.1037/a0034883

McEwen, B. S., Bowles, N. P., Gray, J. D., Hill, M. N., Hunter, R. G., Karatsoreos, I. N., & Nasca, C. (2015). Mechanisms of stress in the brain. *Nature Neuroscience*, *18*(10), 1353–1363. https://doi.org/10.1038/nn.4086

McEwen, B. S., Nasca, C., & Gray, J. D. (2016). Stress Effects on Neuronal Structure:

Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex. *Neuropsychopharmacology*, *41*(1), 3–23. https://doi.org/10.1038/npp.2015.171

McGaugh, J. L. (2000). Memory--a Century of Consolidation. *Science*, *287*(5451), 248–251. https://doi.org/10.1126/science.287.5451.248

McGaugh, J. L., & Roozendaal, B. (2017). Memory Modulation ☆. In *Learning and Memory: A Comprehensive Reference* (Second Edi, Vol. 3, Issue April 2016, pp. 411–443). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.21092-4

Miller, D., Wilkins, L., Bardo, M., Crooks, P., & Dwoskin, L. (2001). Once weekly administration of nicotine produces long-lasting locomotor sensitization in rats via a nicotinic receptor-mediated mechanism. *Psychopharmacology*, *156*(4), 469–476. https://doi.org/10.1007/s002130100747

Morel, G. R., Andersen, T., Pardo, J., Zuccolilli, G. O., Cambiaggi, V. L., Hereñú, C. B., & Goya, R. G. (2015). Cognitive impairment and morphological changes in the dorsal hippocampus of very old female rats. *Neuroscience*, *303*, 189–199. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.050

Morud, J., Adermark, L., Perez-Alcazar, M., Ericson, M., & Söderpalm, B. (2016). Nicotine produces chronic behavioral sensitization with changes in accumbal neurotransmission and increased sensitivity to re-exposure. *Addiction Biology*, *21*(2), 397–406. https://doi.org/10.1111/adb.12219

Morud, J., Strandberg, J., Andrén, A., Ericson, M., Söderpalm, B., & Adermark, L. (2018). Progressive modulation of accumbal neurotransmission and anxiety-like behavior following

protracted nicotine withdrawal. *Neuropharmacology*, *128*, 86–95. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.10.002

Moser, E. I., Moser, M.-B., & McNaughton, B. L. (2017). Spatial representation in the hippocampal formation: a history. *Nature Neuroscience*, *20*(11), 1448–1464. https://doi.org/10.1038/nn.4653

Moussawi, K., Pacchioni, A., Moran, M., Olive, M. F., Gass, J. T., Lavin, A., & Kalivas, P. W. (2009). N-Acetylcysteine reverses cocaine-induced metaplasticity. *Nature Neuroscience*, *12*(2), 182–189. https://doi.org/10.1038/nn.2250

Mukhara, D., Banks, M. L., & Neigh, G. N. (2018). Stress as a Risk Factor for Substance Use Disorders: A Mini-Review of Molecular Mediators. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *12*(December), 1–8. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00309

Nestler, E. J., & Lüscher, C. (2019). The Molecular Basis of Drug Addiction: Linking Epigenetic to Synaptic and Circuit Mechanisms. *Neuron*, *102*(1), 48–59. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.01.016

Nisell, M., Nomikos, G. G., & Svensson, T. H. (1994). Systemic nicotine-induced dopamine release in the rat nucleus accumbens is regulated by nicotinic receptors in the ventral tegmental area. *Synapse*, *16*(1), 36–44. https://doi.org/10.1002/syn.890160105

Ortega, L., Lamprea, M., Novoa, C., & Solano López, J. L. (2019). *Differences of nicotine-induced locomotor sensitization in adolescent and adult Wistar rats.*

Packard, M. G., & Goodman, J. (2012). Emotional arousal and multiple memory systems in the

mammalian brain. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *6*(MARCH 2012), 1–38. https://doi.org/10.3389/fnbeh.2012.00014

Packard, M., Hirsh, R., & White, N. (1989). Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks: evidence for multiple memory systems. *The Journal of Neuroscience*, *9*(5), 1465–1472. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-05-01465.1989

Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (6ta ed.). Elsevier Inc.

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

Renthal, W., & Nestler, E. J. (2008). Epigenetic mechanisms in drug addiction. *Trends in Molecular Medicine*, *14*(8), 341–350. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2008.06.004

Rousselet, G. A., Pernet, C. R., & Wilcox, R. R. (2017). Beyond differences in means: robust graphical methods to compare two groups in neuroscience. *European Journal of Neuroscience*, *46*(2), 1738–1748. https://doi.org/10.1111/ejn.13610

Rupprecht, L. E., Smith, T. T., Schassburger, R. L., Buffalari, D. M., Sved, A. F., & Donny, E. C. (2015). *Behavioral Mechanisms Underlying Nicotine Reinforcement* (pp. 19–53). https://doi.org/10.1007/978-3-319-13482-6_2

Sagar, S., Sharp, F., & Curran, T. (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science*, *240*(4857), 1328–1331. https://doi.org/10.1126/science.3131879

Sandi, C. (2013). Stress and cognition. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science*, *4*(3), 245–261. https://doi.org/10.1002/wcs.1222

Scerri, C., Stewart, C. A., Breen, K. C., & Balfour, D. J. K. (2006). The effects of chronic nicotine on spatial learning and bromodeoxyuridine incorporation into the dentate gyrus of the rat. *Psychopharmacology*, *184*(3–4), 540–546. https://doi.org/10.1007/s00213-005-0086-4

Schwabe, L., Schächinger, H., de Kloet, E. R., & Oitzl, M. S. (2010). Corticosteroids Operate as a Switch between Memory Systems. *Journal of Cognitive Neuroscience*, *22*(7), 1362–1372. https://doi.org/10.1162/jocn.2009.21278

Schwabe, L., & Wolf, O. T. (2013). Stress and multiple memory systems: from 'thinking' to 'doing.' *Trends in Cognitive Sciences*, *17*(2), 60–68. https://doi.org/10.1016/j.tics.2012.12.001

Shabel, S. J., & Janak, P. H. (2009). Substantial similarity in amygdala neuronal activity during conditioned appetitive and aversive emotional arousal. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(35), 15031–15036. https://doi.org/10.1073/pnas.0905580106

Shim, I., Javaid, J. I., Wirtshafter, D., Jang, S.-Y., Shin, K.-H., Lee, H.-J., Chung, Y.-C., & Chun, B.-G. (2001). Nicotine-induced behavioral sensitization is associated with extracellular dopamine release and expression of c-Fos in the striatum and nucleus accumbens of the rat. *Behavioural Brain Research*, *121*(1–2), 137–147. https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00161-9

Shiotsuki, H., Yoshimi, K., Shimo, Y., Funayama, M., Takamatsu, Y., Ikeda, K., Takahashi, R., Kitazawa, S., & Hattori, N. (2010). A rotarod test for evaluation of motor skill learning.

Journal of Neuroscience Methods, *189*(2), 180–185. https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.03.026

Sinha, R. (2008). Chronic Stress, Drug Use, and Vulnerability to Addiction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1141*(1), 105–130. https://doi.org/10.1196/annals.1441.030

Socci, D. J., Sanberg, P. R., & Arendash, G. W. (1995). Nicotine enhances morris water maze performance of young and aged rats. *Neurobiology of Aging*, *16*(5), 857–860. https://doi.org/10.1016/0197-4580(95)00091-R

Solano López, J. L. (2019). *Modulación de la respuesta emocional y la memoria espacial en la adultez por exposición temprana a nicotina.* [Universidad Nacional de Colombia]. https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/75747

Spencer, R. L., & Deak, T. (2017). A users guide to HPA axis research. *Physiology & Behavior*, *178*, 43–65. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.11.014

Squire, L. R. (2004). Memory systems of the brain: A brief history and current perspective. *Neurobiology of Learning and Memory*, *82*(3), 171–177. https://doi.org/10.1016/j.nlm.2004.06.005

Squire, L. R., Genzel, L., Wixted, J. T., & Morris, R. G. (2015). Memory Consolidation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(8), a021766. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021766

Stahn, C., & Buttgereit, F. (2008). Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids. *Nature Clinical Practice Rheumatology*, *4*(10), 525–533. https://doi.org/10.1038/ncprheum0898

Tasker, J. G., & Joëls, M. (2015). The Synaptic Physiology of the Central Nervous System Response to Stress. In *Neuroendocrinology of Stress* (Issue March 2019, pp. 43–70). John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/9781118921692.ch3

Thompson, R. F., & Kim, J. J. (1996). Memory systems in the brain and localization of a memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(24), 13438–13444. https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13438

Troncoso, J., Lamprea, M., Cuestas, D. M., & Múnera, B. A. (2010). Acute stress impairs evocation and promotes extinction of spatial memory in the Barnes maze. *Acta Biologica Colombiana*, *15*(1), 207–222.

Vargas-López, V., Lamprea, M. R., & Múnera, A. (2011). Characterizing spatial extinction in an abbreviated version of the Barnes maze. *Behavioural Processes*, *86*(1), 30–38. https://doi.org/10.1016/j.beproc.2010.08.002

Volkow, N. D. (2011). Epigenetics of Nicotine: Another Nail in the Coughing. *Science Translational Medicine*, *3*(107), 107ps43-107ps43. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003278

White, N. M., Packard, M. G., & McDonald, R. J. (2013). Dissociation of memory systems: The story unfolds. *Behavioral Neuroscience*, *127*(6), 813–834. https://doi.org/10.1037/a0034859

WHO. (2020). *Tobacco*. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tobacco

Wise, R. A., & Rompre, P. P. (1989). Brain Dopamine and Reward. *Annual Review of Psychology*, *40*(1), 191–225. https://doi.org/10.1146/annurev.ps.40.020189.001203

Wolfer, D. P., Stagljar-Bozicevic, M., Errington, M. L., & Lipp, H. (1998). Spatial Memory and Learning in Transgenic Mice: Fact or Artifact? *Physiology*, *13*(3), 118–123. https://doi.org/10.1152/physiologyonline.1998.13.3.118

Anexos

Anexo 1. Protocolo de cuantificación de fotografías de inmunohistoquímica.

Parámetros ajustados para el núcleo paraventricular del hipotálamo

```
run("8-bit");
run("Subtract Background...", "rolling=100 light");
setAutoThreshold("Default");
//run("Threshold...");
setThreshold(0, 195);
setThreshold(0, 195);
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask");
run("Make Binary");
run("Fill Holes");
run("Erode");
run("Fill Holes");
run("Dilate");
run("Fill Holes");
run("Watershed");
run("Analyze Particles...", "size=1900-9000 circularity=0.50-1.00 show=Masks
display clear summarize in_situ");
```

Parámetros ajustados para la región *Shell* del núcleo accumbens

```
run("8-bit");
run("Subtract Background...", "rolling=90 light");
setAutoThreshold("Default");
//run("Threshold...");
setThreshold(0, 235);
setThreshold(0, 235);
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask");
run("Make Binary");
run("Fill Holes");
run("Erode");
run("Fill Holes");
run("Dilate");
run("Fill Holes");
run("Watershed");
run("Analyze Particles...", "size=2000-8000 circularity=0.50-1.00 show=Masks
display clear summarize in_situ");
```

En la Figura 1 se presenta un ejemplar de este protocolo de cuantificación. Código fotografía: arriba 23_PVN_I_40x, abajo 13_AcbSh_D_40x.

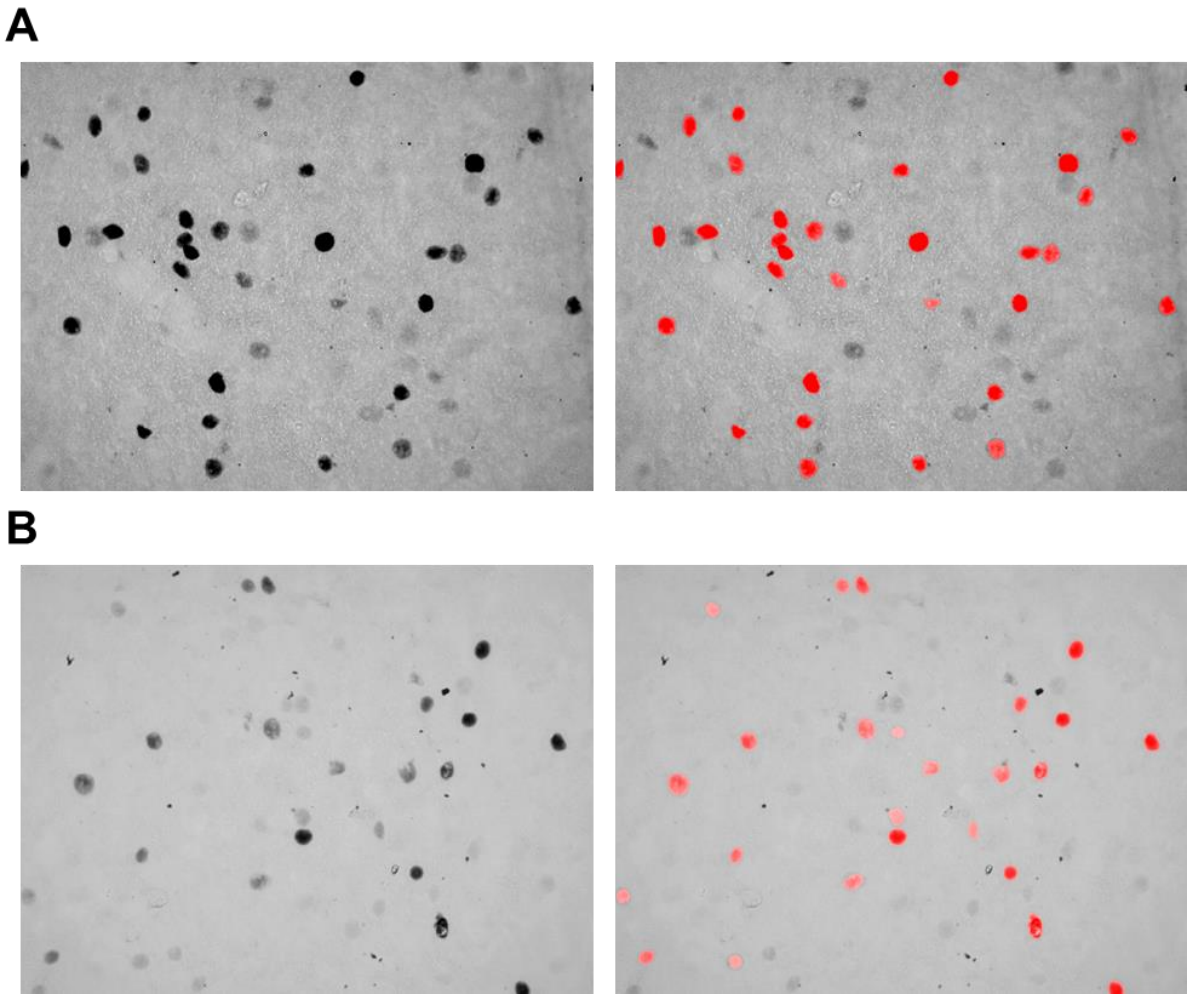


Figura 1. Ejemplares de cuantificación automática. **A**. Núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN). **B**. Región *Shell* del núcleo accumbens (AcbSh). En el panel izquierdo se muestran fotografías representativas del ensayo de inmunohistoquímica. En el panel derecho se muestran los resultados de la cuantificación automática, los marcadores de color rojo señalan las partículas identificadas como células.

Anexo 2. Script para análisis de componentes principales en lenguaje R

Sección A. Análisis de componentes principales estudio Ballesteros Cadena (2018): Las salidas de datos se presentan en el capítulo de resultados.

```
##### CODIGO PARA CORRER ANALISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (A1, A8 & PSC)
##### LOS ANALISIS SE CORREN CON LOS SOBREENTRENADOS COMO SUJETOS ACTIVOS
##### Y LOS ADULTOS DEL ESTUDIO NIC-EST-BARNES COMO ANIMALES COMPLEMENTARIOS

# Bibliotecas ----

library(ggplot2)
library(FactoMineR)
library(factoextra)
library(corrplot)
library(dplyr)

#### TODOS LOS ANIMALES ----

## SEGMENTADO POR MOMENTOS ----

# ACP A1 ----

# Construye el plano indicando variables activas y suplementarias: cuanti,
cuali
# los guarda en un objeto

A1.pca <- PCA(A1, quali.sup = c(1:2), ind.sup = c(38:81) ,graph = FALSE)

# Visualiza las variables, guarda archivo .png

write.csv2(A1.pca$var$coord, file = "A1.var.csv")

png("A1.var.png", width = 500, height = 500)
fviz_pca_var(A1.pca, repel = TRUE) +
  theme(text = element_text(size = 16),
        axis.title = element_text(size = 20),
        axis.text = element_text(size = 16))
dev.off()

## Visualiza el "scree plot", guarda archivo .png

write.csv2(A1.pca$eig, file = "A1.scree.csv")

png("A1.scree.png", width = 500, height = 500)
fviz_eig(A1.pca, addlabels = TRUE, ylim = c(0,100)) +
  theme(text = element_text(size = 16),
        axis.title = element_text(size = 20),
        axis.text = element_text(size = 16))
dev.off()

# Visualiza la contribucion de las variables por componente, guarda archivo
.png
```

```
write.csv2(A1.pca$var$contrib, file = "A1.comps.csv")

# Componente 1

png("A1.cp1.png", width = 500, height = 500)
fviz_contrib(A1.pca, choice = "var",
                        axes = 1, top = 6, ylim = c(0,100)) +
  theme(text = element_text(size = 16),
        axis.title = element_text(size = 20),
        axis.text = element_text(size = 16))
dev.off()

# Componente 2

png("A1.cp2.png", width = 500, height = 500)
fviz_contrib(A1.pca, choice = "var",
                        axes = 2, top = 6, ylim = c(0,100)) +
  theme(text = element_text(size = 16),
        axis.title = element_text(size = 20),
        axis.text = element_text(size = 16))
dev.off()

# Componente 3

png("A1.cp3.png", width = 500, height = 500)
fviz_contrib(A1.pca, choice = "var",
                        axes = 3, top = 6, ylim = c(0,100)) +
  theme(text = element_text(size = 16),
        axis.title = element_text(size = 20),
        axis.text = element_text(size = 16))
dev.off()

# Visualiza la carga de los variables en cada dimension, guarda archivo .png

write.csv2(A1.pca$var$cos2, file = "A1.corr.csv")

png("A1.corrplot.png", width = 500, height = 500)
corrplot(A1.pca$var$cos2, is.corr = FALSE) +
  theme(text = element_text(size = 16),
        axis.title = element_text(size = 20),
        axis.text = element_text(size = 16))
dev.off()

# Visualiza la representacion de las variables en los componente elegidos (2)
# guarda archivo .png

png("A1.repvar.png", width = 500, height = 500)
fviz_cos2(A1.pca, choice = "var", axes = 1:2, ylim = c (0, 1)) +
  theme(text = element_text(size = 16),
        axis.title = element_text(size = 20),
        axis.text = element_text(size = 16))
dev.off()

# visualiza los sujetos agrupados, guarda archivo .png

write.csv2(A1.pca$ind$coord, file = "A1.ind.csv")
```

```
write.csv2(A1.pca$ind.sup$coord, file = "A1.indNIC.csv")

png("A1.ind.png", width = 500, height = 500)
fviz_pca_ind(A1.pca, habillage = 1,
             palette = c("#8681F3", "#000096", "#808080", "#000000"),
             addEllipses = TRUE, ellipse.type = "confidence",
             repel = TRUE, label = "all") +
  theme(text = element_text(size = 16),
        axis.title = element_text(size = 20),
        axis.text = element_text(size = 16))
dev.off()

# ACP A8 ----

# Construye el plano indicando variables activas y suplementarias: cuanti,
cuali
# los guarda en un objeto

A8.pca <- PCA(A8, quali.sup = c(1:2), ind.sup = c(38:81), graph = FALSE)

# Visualiza las variables, guarda archivo .png

write.csv2(A8.pca$var$coord, file = "A8.var.csv")

png("A8.var.png", width = 500, height = 500)
fviz_pca_var(A8.pca, repel = TRUE) +
  theme(text = element_text(size = 16),
        axis.title = element_text(size = 20),
        axis.text = element_text(size = 16))
dev.off()

## Visualiza el "scree plot", guarda archivo .png

write.csv2(A8.pca$eig, file = "A8.scree.csv")

png("A8.scree.png", width = 500, height = 500)
fviz_eig(A8.pca, addlabels = TRUE, ylim = c(0,100)) +
  theme(text = element_text(size = 16),
        axis.title = element_text(size = 20),
        axis.text = element_text(size = 16))
dev.off()

# Visualiza la contribucion de las variables por componente, guarda archivo
.png

write.csv2(A8.pca$var$contrib , file = "A8.comps.csv")

# Componente 1

png("A8.cp1.png", width = 500, height = 500)
fviz_contrib(A8.pca, choice = "var",
                       axes = 1, top = 6, ylim = c(0,100)) +
  theme(text = element_text(size = 16),
        axis.title = element_text(size = 20),
        axis.text = element_text(size = 16))
dev.off()
```

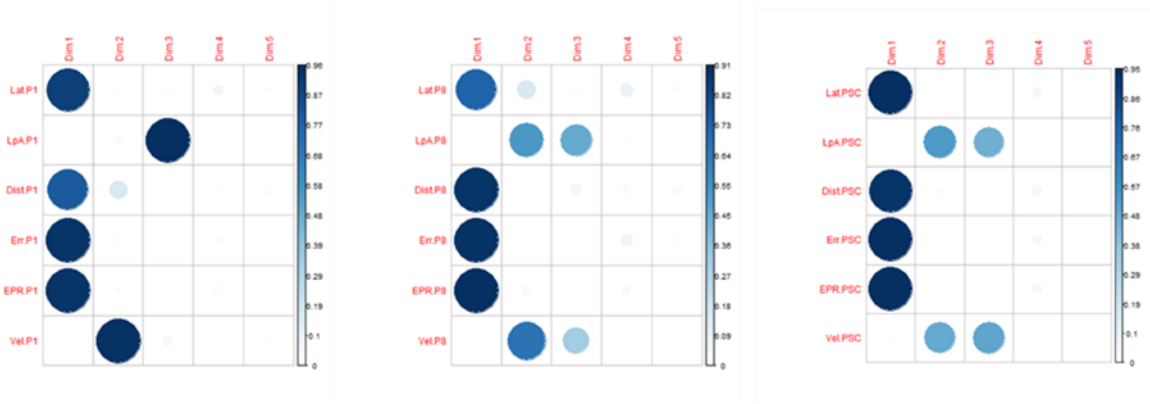
```
# Componente 2

png("A8.cp2.png", width = 500, height = 500)
fviz_contrib(A8.pca, choice = "var",
                        axes = 2, top = 6, ylim = c(0,100)) +
  theme(text = element_text(size = 16),
        axis.title = element_text(size = 20),
        axis.text = element_text(size = 16))
dev.off()

# Componente 3

png("A8.cp3.png", width = 500, height = 500)
fviz_contrib(A8.pca, choice = "var",
                        axes = 3, top = 6, ylim = c(0,100)) +
  theme(text = element_text(size = 16),
        axis.title = element_text(size = 20),
        axis.text = element_text(size = 16))
dev.off()

# Visualiza la carga de los variables en cada dimension, guarda archivo .png

write.csv2(A8.pca$var$cos2, file = "A8.corr.csv")

png("A8.corrplot.png", width = 500, height = 500)
corrplot(A8.pca$var$cos2, is.corr = FALSE) +
  theme(text = element_text(size = 16),
        axis.title = element_text(size = 20),
        axis.text = element_text(size = 16))
dev.off()

# Visualiza la representacion de las variables en los componente elegidos (2)
# guarda archivo .png

png("A8.repvar.png", width = 500, height = 500)
fviz_cos2(A8.pca, choice = "var", axes = 1:2, ylim = c (0, 1)) +
  theme(text = element_text(size = 16),
        axis.title = element_text(size = 20),
        axis.text = element_text(size = 16))
dev.off()

# visualiza los sujetos agrupados, guarda archivo .png

write.csv2(A8.pca$ind$coord, file = "A8.ind.csv")
write.csv2(A8.pca$ind.sup$coord, file = "A8.indNIC.csv")

png("A8.ind.png", width = 500, height = 500)
fviz_pca_ind(A8.pca, habillage = 1,
             palette = c("#8681F3", "#000096", "#808080", "#000000"),
             addEllipses = TRUE, ellipse.type = "confidence",
             repel = TRUE, label = "all") +
  theme(text = element_text(size = 16),
        axis.title = element_text(size = 20),
        axis.text = element_text(size = 16))
dev.off()

# ACP PSC ----
```

```
# Construye el plano indicando variables activas y suplementarias: cuanti,
cuali
# los guarda en un objeto

PSC.pca <- PCA(A9, quali.sup = c(1:2), ind.sup = c(38:81), graph = FALSE)

# Visualiza las variables, guarda archivo .png

write.csv2(PSC.pca$var$coord, file = "PSC.var.csv")

png("PSC.var.png", width = 500, height = 500)
fviz_pca_var(PSC.pca, repel = TRUE) +
  theme(text = element_text(size = 16),
        axis.title = element_text(size = 20),
        axis.text = element_text(size = 16))
dev.off()

## Visualiza el "scree plot", guarda archivo .png

write.csv2(PSC.pca$eig, file = "PSC.scree.csv")

png("PSC.scree.png", width = 500, height = 500)
fviz_eig(PSC.pca, addlabels = TRUE, ylim = c(0,100)) +
  theme(text = element_text(size = 16),
        axis.title = element_text(size = 20),
        axis.text = element_text(size = 16))
dev.off()

# Visualiza la contribucion de las variables por componente, guarda archivo
.png

write.csv2(PSC.pca$var$contrib, file = "PSC.comps.csv")

# Componente 1

png("PSC.cp1.png", width = 500, height = 500)
fviz_contrib(PSC.pca, choice = "var",
                      axes = 1, top = 6, ylim = c(0,100)) +
  theme(text = element_text(size = 16),
        axis.title = element_text(size = 20),
        axis.text = element_text(size = 16))
dev.off()

# Componente 2

png("PSC.cp2.png", width = 500, height = 500)
fviz_contrib(PSC.pca, choice = "var",
                      axes = 2, top = 6, ylim = c(0,100)) +
  theme(text = element_text(size = 16),
        axis.title = element_text(size = 20),
        axis.text = element_text(size = 16))
dev.off()

# Componente 3

png("PSC.cp3.png", width = 500, height = 500)
```

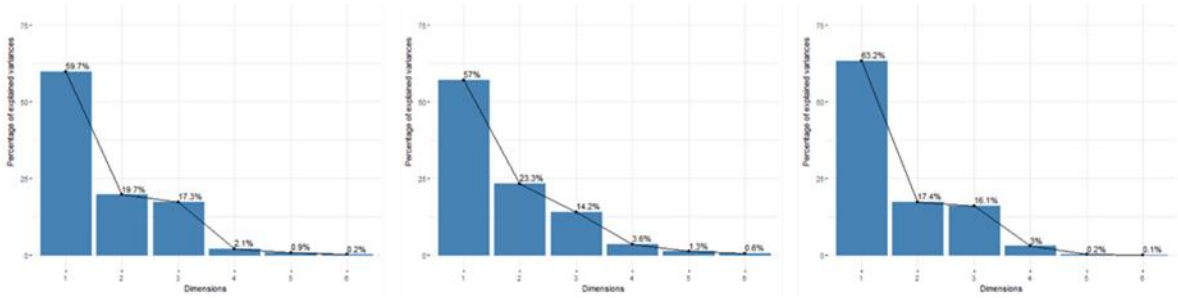
```
fviz_contrib(PSC.pca, choice = "var",
                       axes = 3, top = 6, ylim = c(0,100)) +
  theme(text = element_text(size = 16),
        axis.title = element_text(size = 20),
        axis.text = element_text(size = 16))
dev.off()

# Visualiza la carga de los variables en cada dimension, guarda archivo .png

write.csv2(PSC.pca$var$coord, file = "PSC.corr.csv")

png("PSC.corrplot.png", width = 500, height = 500)
corrplot(PSC.pca$var$cos2, is.corr = FALSE) +
  theme(text = element_text(size = 16),
        axis.title = element_text(size = 20),
        axis.text = element_text(size = 16))
dev.off()

# Visualiza la representacion de las variables en los componente elegidos (2)
# guarda archivo .png

png("PSC.repvar.png", width = 500, height = 500)
fviz_cos2(PSC.pca, choice = "var", axes = 1:2, ylim = c (0, 1)) +
  theme(text = element_text(size = 16),
        axis.title = element_text(size = 20),
        axis.text = element_text(size = 16))
dev.off()

# visualiza los sujetos agrupados, guarda archivo .png

write.csv2(PSC.pca$ind$coord, file = "PSC.ind.csv")
write.csv2(PSC.pca$ind.sup$coord, file = "PSC.indNIC.csv")

png("PSC.ind.png", width = 500, height = 500)
fviz_pca_ind(PSC.pca, habillage = 1,
             palette = c("#8681F3", "#000096", "#808080", "#000000"),
             addEllipses = TRUE, ellipse.type = "confidence",
             repel = TRUE, label = "all") +
  theme(text = element_text(size = 16),
        axis.title = element_text(size = 20),
        axis.text = element_text(size = 16))
dev.off()
```

Sección B. Análisis de componentes principales estudio Nicotina - Estrés – Barnes: A continuación se resume la salida de datos, el código utilizado es igual al resumido en la primera sección de este anexo.

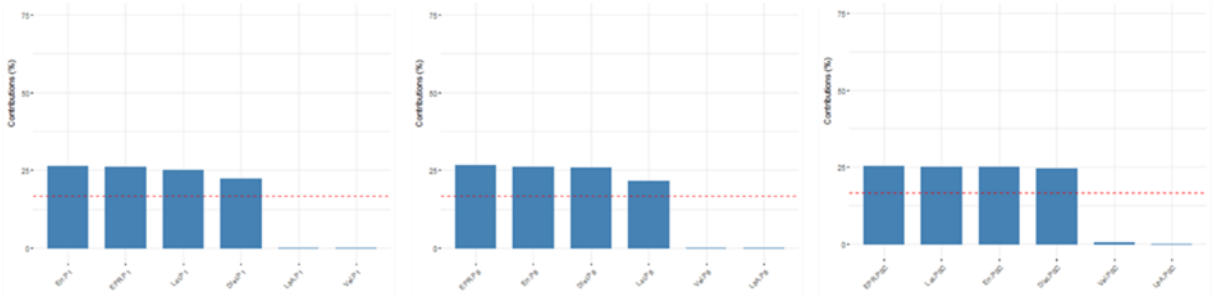
El patrón de relaciones entre las variables es similar al observado en el estudio de Ballesteros Cadena (2018).



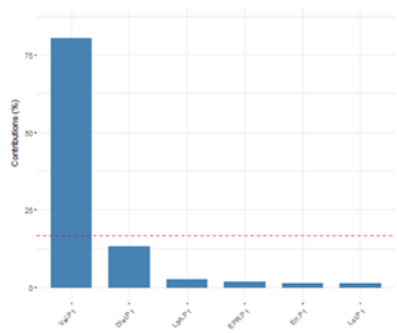
Los dos primeros componentes describen satisfactoriamente entre 79 y 81% de la varianza.

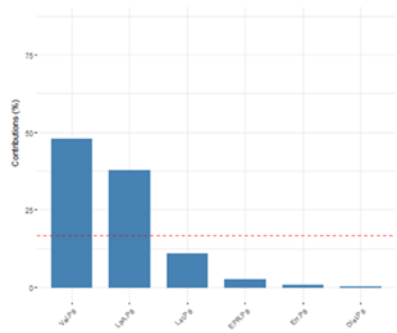


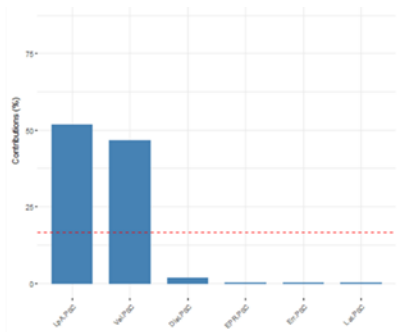
El primer componente está integrado por indicadores clásicos de desempeño en la terea espacial en el LCB.



El segundo componente está integrado por Latencia al primer agujero y Velocidad


Contributions (%)
75
50
25
0
Val.P1
Dial.P1
Lph.P1
EPR.P1
Err.P1
Lat.P1


Contributions (%)
75
50
25
0
Val.P8
Lph.P8
Lat.P8
EPR.P8
Err.P8
Dial.P8


Contributions (%)
75
50
25
0
Lph.PSC
Val.PSC
Dial.PSC
EPR.PSC
Err.PSC
Lat.PSC

Anexo 3. Script para función de cambio en lenguaje R

```
#_____________________________________________________________________________
#### ESTUDIO NICOTINA - ESTRES - BARNES----
###################################
#### COMPARACIONES PAREADAS EN EL RECOBRO
#_____________________________________________________________________________

#_____________________________________________________________________________
### CARGA LAS BIBLIOTECAS ----
################################################
#_____________________________________________________________________________

library(rogme)
library(ggplot2)
library(cowplot)
library(tibble)
library(gridExtra)
library(tidyr)
library(psych)

#_____________________________________________________________________________
__
### IMPORTA LOS DATOS COMO UN VECTOR POR CADA GRUPO ----
#######################
#_____________________________________________________________________________
__

#VARIABLE*GRUPO

NOMBRE_DEL_VECTOR <- scan()
OBSERVACION 1
OBSERVACION 2
OBSERVACION 3
…
OBSERVACION N


#_____________________________________________________________________________
__
### COMPARA POR TRATAMIENTO O EXPERIMENTO ----
#################################
#_____________________________________________________________________________
__

## VARENCIA DELTA VC vs NC ----

df_VAR.D.NCH <-mkt2(VAR.VC.D, VAR.NC.D,
                  group_labels = c("VEH", "NIC"))


sf_VAR.D.NCH <-shifthd_pbci(data = df_VAR.D.NCH, formula = obs ~ gr,
                          q = c(0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 0.9),nboot = 2000)

sf_VAR.D.NCH
```

```
write.csv2(sf_VAR.D.NCH, file = "sf_VAR.D.NCH.csv")


ps_VAR.D.NCH <- plot_scat2(data = df_VAR.D.NCH, formula = obs ~ gr,
                           xlabel = "",ylabel = "Delta Latencia",
                           shape = 21, size = 5, colour = "black", fill =
"white")

p_VAR.D.NCH <-plot_hd_links(p = ps_VAR.D.NCH, sf = sf_VAR.D.NCH[[1]],
                            q_col = c("darkred", "black"), q_width = 0.5,
                            q_size = 1, md_size = 1.5, add_rect = TRUE,
                            rect_alpha = 0.1, rect_col = "blue",
                            add_lab = TRUE, text_size = 5)

pf_VAR.D.NCH <- p_VAR.D.NCH + coord_flip()


psf_VAR.D.NCH <-plot_sf(sf_VAR.D.NCH, plot_theme = 2)[[1]] +
  scale_x_continuous(breaks = seq(-60, 240, 30), limits = c(-60, 240)) +
  scale_y_continuous(breaks = seq(-240, 240, 60), limits = c(-240, 240)) +
  labs(x = "DELTA Latencia (S) PSC - A8, NCH CTR",
       y = "Diferencia NCH CTR - NCH EST")
```

Salida de datos función de cambio, núcleo paraventricular del hipotálamo

	NIC...VEH.q	NIC...VEH.NIC	NIC...VEH.VEH	NIC...VEH.difference	NIC...VEH.ci_lower	NIC...VEH.ci_upper	NIC...VEH.p_crit	NIC...VEH.p_value
1	0,1	3,25051593	6,58446637	-3,33395045	-12,6555615	4,44701768	0,0166667	0,151
2	0,25	6,75575318	9,20229069	-2,44654372	-19,5317667	10,8198627	0,025	0,585
3	0,5	17,5122487	23,3923511	-5,88010236	-27,569469	12,8506919	0,05	0,556
4	0,75	29,1294621	43,7146558	-14,5851936	-37,8475466	8,65106717	0,0125	0,149
5	0,9	33,2342733	55,6974159	-22,4631426	-34,6488166	4,89644163	0,01	0,019

Salida de datos función de cambio, región *Shell* del núcleo accumbens

	NIC...VEH.q	NIC...VEH.NIC	NIC...VEH.VEH	NIC...VEH.difference	NIC...VEH.ci_lower	NIC...VEH.ci_upper	NIC...VEH.p_crit	NIC...VEH.p_value
1	0,1	0,90529277	2,45654345	-1,55125068	-4,76047202	2,63165288	0,0166667	0,361
2	0,25	3,20919437	4,15482841	-0,94563404	-4,31597096	4,03561923	0,05	0,656
3	0,5	7,65528225	6,42313011	1,23215214	-3,43263931	7,82681868	0,025	0,605
4	0,75	13,50059	7,92551868	5,57507128	-2,88635135	11,448757	0,0125	0,063
5	**0,9**	**17,7141081**	**9,11182357**	**8,60228457**	**-0,83890002**	**12,4722866**	**0,01**	**0,004**

Anexo 4. Salida de datos SPSS, pruebas sobre datos comportamentales

Las pruebas para el primer experimento aparecen con el código ‘Ctrl’, las pruebas para el segundo experimento aparecen con el código ‘Est’.

Fase 1. Validación del tratamiento farmacológico.

Distancia recorrida en el campo abierto.

```
GLM II_Dist_m IV_Dist_m BY TTO
  /WSFACTOR=Test 2 Polynomial
  /METHOD=SSTYPE(3)
  /POSTHOC=TTO(SIDAK)
  /PLOT=PROFILE(Test*TTO)
  /EMMEANS=TABLES(OVERALL)
  /EMMEANS=TABLES(TTO*Test) COMPARE(TTO) ADJ(SIDAK)
  /EMMEANS=TABLES(TTO*Test) COMPARE(Test) ADJ(SIDAK)
  /PRINT=DESCRIPTIVE ETASQ OPOWER PARAMETER HOMOGENEITY
  /CRITERIA=ALPHA(.05)
  /WSDESIGN=Test
  /DESIGN=TTO.
```

Estadísticos descriptivos

EST		TTO	Media	Desviación estándar	N
Ctrl	II_Dist_m	Nic	11,4340	5,16727	10
		Veh	12,8318	5,50264	11
		Total	12,1662	5,25990	21
	IV_Dist_m	Nic	15,6650	5,30719	10
		Veh	11,1036	6,54785	11
		Total	13,2757	6,28977	21
Est	II_Dist_m	Nic	13,4109	5,53807	11
		Veh	15,7664	7,46349	11
		Total	14,5886	6,52561	22
	IV_Dist_m	Nic	21,6164	7,28993	11
		Veh	11,5500	7,45323	11
		Total	16,5832	8,84863	22

Pruebas de contrastes dentro de sujetos

Medida: MEASURE_1

EST	Origen	Test	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad	Potencia observada[a]
Ctrl	Test	Lineal	16,406	1	16,406	2,390	,139	,112	2,390	,312
	Test * TTO	Lineal	93,007	1	93,007	13,547	,002	,416	13,547	,937
	Error(Test)	Lineal	130,443	19	6,865					
Est	Test	Lineal	43,760	1	43,760	2,764	,112	,121	2,764	,353
	Test * TTO	Lineal	424,329	1	424,329	26,801	,000	,573	26,801	,998

	Error(Test)	Lineal	316,648	20	15,832				

a. Se ha calculado utilizando alpha = ,05

Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error[a]

EST		F	df1	df2	Sig.
Ctrl	II_Dist_m	,167	1	19	,687
	IV_Dist_m	,494	1	19	,491
Est	II_Dist_m	,244	1	20	,627
	IV_Dist_m	,295	1	20	,593

Prueba la hipótesis nula que la varianza de error de la variable dependiente es igual entre grupos.

a. Diseño : Interceptación + TTO
Diseño dentro de sujetos: Test

Distancia recorrida en el centro del campo abierto

```
GLM II_Cent_m IV_Cent_m BY TTO
  /WSFACTOR=Test 2 Polynomial
  /METHOD=SSTYPE(3)
  /POSTHOC=TTO(SIDAK)
  /PLOT=PROFILE(Test*TTO)
  /EMMEANS=TABLES(OVERALL)
  /EMMEANS=TABLES(TTO*Test) COMPARE(TTO) ADJ(SIDAK)
  /EMMEANS=TABLES(TTO*Test) COMPARE(Test) ADJ(SIDAK)
  /PRINT=DESCRIPTIVE ETASQ OPOWER PARAMETER HOMOGENEITY
  /CRITERIA=ALPHA(.05)
  /WSDESIGN=Test
  /DESIGN=TTO.
```

Estadísticos descriptivos

EST		TTO	Media	Desviación estándar	N
Ctrl	II_Cent_m	Nic	,3100	,40541	10
		Veh	,6464	,66791	11
		Total	,4862	,57153	21
	IV_Cent_m	Nic	,4000	,59675	10
		Veh	,4882	,46846	11
		Total	,4462	,52155	21
Est	II_Cent_m	Nic	,6264	,56705	11
		Veh	,6636	,44787	11
		Total	,6450	,49900	22
	IV_Cent_m	Nic	,8745	,91101	11
		Veh	,4427	,70959	11
		Total	,6586	,82694	22

Pruebas de contrastes dentro de sujetos

Medida: MEASURE_1

EST	Origen	Test	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad	Potencia observada[a]
Ctrl	Test	Lineal	,012	1	,012	,068	,797	,004	,068	,057
	Test * TTO	Lineal	,161	1	,161	,898	,355	,045	,898	,147
	Error(Test)	Lineal	3,413	19	,180					
Est	Test	Lineal	,002	1	,002	,008	,930	,000	,008	,051
	Test * TTO	Lineal	,605	1	,605	2,366	,140	,106	2,366	,311
	Error(Test)	Lineal	5,115	20	,256					

a. Se ha calculado utilizando alpha = ,05

Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error[a]

EST		F	df1	df2	Sig.
Ctrl	II_Cent_m	7,451	1	19	,013
	IV_Cent_m	,601	1	19	,448
Est	II_Cent_m	,582	1	20	,454
	IV_Cent_m	1,513	1	20	,233

Prueba la hipótesis nula que la varianza de error de la variable dependiente es igual entre grupos.
a. Diseño : Interceptación + TTO
Diseño dentro de sujetos: Test

Fase 2. Evaluación del aprendizaje y la memoria espacial.

Adquisición primer componente LCB. Latencia de llegada al agujero meta

```
GLM Lat_PI Lat_PII Lat_PIII Lat_PIV Lat_PV Lat_PVI Lat_PVII Lat_PVIII BY TTO
  /WSFACTOR=ADQ 8 Polynomial
  /METHOD=SSTYPE(3)
  /POSTHOC=TTO(SIDAK)
  /EMMEANS=TABLES(OVERALL)
  /EMMEANS=TABLES(ADQ) COMPARE ADJ(SIDAK)
  /EMMEANS=TABLES(TTO*ADQ) COMPARE(TTO) ADJ(SIDAK)
  /EMMEANS=TABLES(TTO*ADQ) COMPARE(ADQ) ADJ(SIDAK)
  /PRINT=DESCRIPTIVE ETASQ OPOWER PARAMETER HOMOGENEITY
  /CRITERIA=ALPHA(.05)
  /WSDESIGN=ADQ
  /DESIGN=TTO.
```

Estadísticos descriptivos

EST		TTO	Media	Desviación estándar	N
Ctrl	Lat_PI	Nic	57,5555	39,25782	11
		Veh	78,2391	71,47969	11
		Total	67,8973	57,26222	22
	Lat_PII	Nic	63,5182	59,35492	11
		Veh	59,9682	44,09722	11

		Total	61,7432	51,05787	22
	Lat_PIII	Nic	30,2509	21,28917	11
		Veh	34,7618	17,53734	11
		Total	32,5064	19,17313	22
	Lat_PIV	Nic	24,0145	14,26189	11
		Veh	17,2518	16,44980	11
		Total	20,6332	15,41724	22
	Lat_PV	Nic	19,1345	24,64670	11
		Veh	17,4473	19,12866	11
		Total	18,2909	21,54653	22
	Lat_PVI	Nic	14,6391	8,41942	11
		Veh	10,5418	7,77603	11
		Total	12,5905	8,18205	22
	Lat_PVII	Nic	12,6200	10,06019	11
		Veh	18,5245	12,09589	11
		Total	15,5723	11,26928	22
	Lat_PVIII	Nic	9,7327	11,08950	11
		Veh	9,6827	8,28166	11
		Total	9,7077	9,55097	22
Est	Lat_PI	Nic	77,4745	52,93778	11
		Veh	49,5773	34,86048	11
		Total	63,5259	46,01089	22
	Lat_PII	Nic	39,6627	28,81559	11
		Veh	48,2291	30,57249	11
		Total	43,9459	29,32069	22
	Lat_PIII	Nic	34,2755	34,50959	11
		Veh	27,3009	15,85086	11
		Total	30,7882	26,44776	22
	Lat_PIV	Nic	15,5791	10,53049	11
		Veh	20,5609	13,74242	11
		Total	18,0700	12,21622	22
	Lat_PV	Nic	17,5073	21,28942	11
		Veh	22,6582	18,23395	11
		Total	20,0827	19,52177	22
	Lat_PVI	Nic	19,9982	18,83555	11
		Veh	16,6555	10,84087	11
		Total	18,3268	15,09411	22
	Lat_PVII	Nic	23,3945	27,60432	11
		Veh	18,1355	14,40107	11
		Total	20,7650	21,65312	22
	Lat_PVIII	Nic	10,6691	11,11983	11
		Veh	17,6745	13,97165	11
		Total	14,1718	12,83317	22

Prueba de esfericidad de Mauchly[a]

Medida: MEASURE_1

EST	Efecto inter sujetos	W de Mauchly	Aprox. Chi-cuadrado	gl	Sig.	Épsilon[b]		
						Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite inferior
Ctrl	ADQ	,000	134,271	27	,000	,338	,405	,143
Est	ADQ	,018	69,821	27	,000	,383	,469	,143

Prueba la hipótesis nula que la matriz de covarianzas de error de las variables dependientes con transformación ortonormalizada es proporcional a una matriz de identidad.
a. Diseño : Interceptación + TTO
Diseño dentro de sujetos: ADQ
b. Se puede utilizar para ajustar los grados de libertad para las pruebas promedio de significación. Las pruebas corregidas se visualizan en la tabla de pruebas de efectos dentro de sujetos.

Pruebas de efectos dentro de sujetos

Medida: MEASURE_1

EST	Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad	Potencia observada[a]
Ctrl	ADQ	Esfericidad asumida	79152,538	7	11307,505	12,336	,000	,382	86,355	1,000
		Greenhouse-Geisser	79152,538	2,363	33501,882	12,336	,000	,382	29,146	,998
		Huynh-Feldt	79152,538	2,834	27933,226	12,336	,000	,382	34,957	,999
		Límite inferior	79152,538	1,000	79152,538	12,336	,002	,382	12,336	,916
	ADQ * TTO	Esfericidad asumida	2931,798	7	418,828	,457	,864	,022	3,199	,195
		Greenhouse-Geisser	2931,798	2,363	1240,905	,457	,668	,022	1,080	,126
		Huynh-Feldt	2931,798	2,834	1034,642	,457	,703	,022	1,295	,134
		Límite inferior	2931,798	1,000	2931,798	,457	,507	,022	,457	,099
	Error(ADQ)	Esfericidad asumida	128323,380	140	916,596					
		Greenhouse-Geisser	128323,380	47,253	2715,690					
		Huynh-Feldt	128323,380	56,673	2264,290					
		Límite inferior	128323,380	20,000	6416,169					
Est	ADQ	Esfericidad asumida	44407,681	7	6343,954	11,144	,000	,358	78,009	1,000
		Greenhouse-Geisser	44407,681	2,678	16580,344	11,144	,000	,358	29,848	,997
		Huynh-Feldt	44407,681	3,286	13513,179	11,144	,000	,358	36,623	,999
		Límite inferior	44407,681	1,000	44407,681	11,144	,003	,358	11,144	,888
	ADQ * TTO	Esfericidad asumida	5500,417	7	785,774	1,380	,218	,065	9,662	,571
		Greenhouse-Geisser	5500,417	2,678	2053,672	1,380	,260	,065	3,697	,327
		Huynh-Feldt	5500,417	3,286	1673,767	1,380	,255	,065	4,536	,367
		Límite inferior	5500,417	1,000	5500,417	1,380	,254	,065	1,380	,201
	Error(ADQ)	Esfericidad asumida	79696,704	140	569,262					
		Greenhouse-Geisser	79696,704	53,567	1487,804					
		Huynh-Feldt	79696,704	65,725	1212,578					
		Límite inferior	79696,704	20,000	3984,835					

a. Se ha calculado utilizando alpha = ,05

Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error[a]

EST		F	df1	df2	Sig.
Ctrl	Lat_PI	1,437	1	20	,245
	Lat_PII	,258	1	20	,617
	Lat_PIII	,702	1	20	,412
	Lat_PIV	,039	1	20	,845
	Lat_PV	1,382	1	20	,254
	Lat_PVI	,233	1	20	,634
	Lat_PVII	,157	1	20	,697
	Lat_PVIII	,254	1	20	,620
Est	Lat_PI	,295	1	20	,593
	Lat_PII	,010	1	20	,920
	Lat_PIII	6,926	1	20	,016
	Lat_PIV	,088	1	20	,770
	Lat_PV	,070	1	20	,794
	Lat_PVI	2,785	1	20	,111
	Lat_PVII	5,087	1	20	,035
	Lat_PVIII	1,484	1	20	,237

Prueba la hipótesis nula que la varianza de error de la variable dependiente es igual entre grupos.
a. Diseño : Interceptación + TTO
Diseño dentro de sujetos: ADQ

Adquisición primer componente LCB. Errores ponderados

```
GLM EPR_PI EPR_PII EPR_PIII EPR_PIV EPR_PV EPR_PVI EPR_PVII EPR_PVIII BY TTO
  /WSFACTOR=ADQ 8 Polynomial
  /METHOD=SSTYPE(3)
  /POSTHOC=TTO(SIDAK)
  /EMMEANS=TABLES(OVERALL)
  /EMMEANS=TABLES(ADQ) COMPARE ADJ(SIDAK)
  /EMMEANS=TABLES(TTO*ADQ) COMPARE(TTO) ADJ(SIDAK)
  /EMMEANS=TABLES(TTO*ADQ) COMPARE(ADQ) ADJ(SIDAK)
  /PRINT=DESCRIPTIVE ETASQ OPOWER PARAMETER HOMOGENEITY
  /CRITERIA=ALPHA(.05)
  /WSDESIGN=ADQ
  /DESIGN=TTO.
```

Estadísticos descriptivos

EST		TTO	Media	Desviación estándar	N
Ctrl	EPR_PI	Nic	675,1736	537,78314	11
		Veh	772,9327	720,53530	11
		Total	724,0532	622,45217	22
	EPR_PII	Nic	782,0827	644,48454	11
		Veh	630,1064	498,49294	11
		Total	706,0945	567,60096	22

	EPR_PIII	Nic	562,3400	466,71730	11
		Veh	431,2082	255,50009	11
		Total	496,7741	373,25013	22
	EPR_PIV	Nic	450,2845	351,43864	11
		Veh	286,9736	353,62410	11
		Total	368,6291	354,04322	22
	EPR_PV	Nic	238,8200	326,62713	11
		Veh	279,1927	230,10602	11
		Total	259,0064	276,48348	22
	EPR_PVI	Nic	331,7182	274,95792	11
		Veh	271,7055	281,62339	11
		Total	301,7118	273,33429	22
	EPR_PVII	Nic	227,1873	205,73047	11
		Veh	349,9764	321,05416	11
		Total	288,5818	270,53143	22
	EPR_PVIII	Nic	141,4509	165,04449	11
		Veh	134,1982	129,45621	11
		Total	137,8245	144,79464	22
Est	EPR_PI	Nic	763,7064	405,42009	11
		Veh	441,1209	308,52430	11
		Total	602,4136	388,39502	22
	EPR_PII	Nic	609,4473	478,97795	11
		Veh	539,2882	280,63149	11
		Total	574,3677	384,75792	22
	EPR_PIII	Nic	561,0927	658,36257	11
		Veh	390,6573	252,78796	11
		Total	475,8750	494,40660	22
	EPR_PIV	Nic	284,8073	245,07088	11
		Veh	316,4318	283,44699	11
		Total	300,6195	259,07527	22
	EPR_PV	Nic	326,8118	497,14036	11
		Veh	347,3118	300,45004	11
		Total	337,0618	400,98088	22
	EPR_PVI	Nic	205,9255	156,63312	11
		Veh	273,3482	207,98026	11
		Total	239,6368	182,95189	22
	EPR_PVII	Nic	203,2991	309,86740	11
		Veh	247,8800	222,12995	11
		Total	225,5895	264,08207	22
	EPR_PVIII	Nic	125,4964	154,02444	11
		Veh	320,8200	246,17614	11
		Total	223,1582	223,93605	22

Prueba de esfericidad de Mauchly[a]

Medida: MEASURE_1

EST	Efecto inter sujetos	W de Mauchly	Aprox. Chi-cuadrado	gl	Sig.	Épsilon[b]		
						Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite inferior
Ctrl	ADQ	,034	59,032	27	,000	,512	,668	,143
Est	ADQ	,039	56,649	27	,001	,515	,674	,143

Prueba la hipótesis nula que la matriz de covarianzas de error de las variables dependientes con transformación ortonormalizada es proporcional a una matriz de identidad.
a. Diseño : Interceptación + TTO
Diseño dentro de sujetos: ADQ
b. Se puede utilizar para ajustar los grados de libertad para las pruebas promedio de significación. Las pruebas corregidas se visualizan en la tabla de pruebas de efectos dentro de sujetos.

Pruebas de efectos dentro de sujetos

Medida: MEASURE_1

EST	Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad	Potencia observada[a]
Ctrl	ADQ	Esfericidad asumida	7015558,936	7	1002222,705	6,382	,000	,242	44,676	1,000
		Greenhouse-Geisser	7015558,936	3,581	1959193,619	6,382	,000	,242	22,854	,978
		Huynh-Feldt	7015558,936	4,676	1500284,761	6,382	,000	,242	29,844	,994
		Límite inferior	7015558,936	1,000	7015558,936	6,382	,020	,242	6,382	,671
	ADQ * TTO	Esfericidad asumida	488921,000	7	69845,857	,445	,872	,022	3,113	,191
		Greenhouse-Geisser	488921,000	3,581	136538,074	,445	,755	,022	1,593	,143
		Huynh-Feldt	488921,000	4,676	104556,277	,445	,804	,022	2,080	,159
		Límite inferior	488921,000	1,000	488921,000	,445	,512	,022	,445	,097
	Error(ADQ)	Esfericidad asumida	21984636,293	140	157033,116					
		Greenhouse-Geisser	21984636,293	71,617	306975,963					
		Huynh-Feldt	21984636,293	93,523	235071,896					
		Límite inferior	21984636,293	20,000	1099231,815					
Est	ADQ	Esfericidad asumida	3789675,910	7	541382,273	4,957	,000	,199	34,702	,996
		Greenhouse-Geisser	3789675,910	3,607	1050537,216	4,957	,002	,199	17,883	,934
		Huynh-Feldt	3789675,910	4,719	803012,504	4,957	,001	,199	23,396	,973
		Límite inferior	3789675,910	1,000	3789675,910	4,957	,038	,199	4,957	,563
	ADQ * TTO	Esfericidad asumida	984218,057	7	140602,580	1,287	,261	,060	9,012	,536
		Greenhouse-Geisser	984218,057	3,607	272835,388	1,287	,284	,060	4,644	,363

		Huynh-Feldt	984218,057	4,719	208550,658	1,287	,277	,060	6,076	,425
		Límite inferior	984218,057	1,000	984218,057	1,287	,270	,060	1,287	,191
	Error(ADQ)	Esfericidad asumida	15288963,758	140	109206,884					
		Greenhouse-Geisser	15288963,758	72,147	211912,915					
		Huynh-Feldt	15288963,758	94,386	161982,573					
		Límite inferior	15288963,758	20,000	764448,188					

a. Se ha calculado utilizando alpha = ,05

Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error[a]

EST		F	df1	df2	Sig.
Ctrl	EPR_PI	,470	1	20	,501
	EPR_PII	,236	1	20	,632
	EPR_PIII	3,178	1	20	,090
	EPR_PIV	,223	1	20	,642
	EPR_PV	1,903	1	20	,183
	EPR_PVI	,000	1	20	,986
	EPR_PVII	,116	1	20	,737
	EPR_PVIII	,167	1	20	,687
Est	EPR_PI	,337	1	20	,568
	EPR_PII	1,765	1	20	,199
	EPR_PIII	9,578	1	20	,006
	EPR_PIV	1,016	1	20	,325
	EPR_PV	,782	1	20	,387
	EPR_PVI	1,211	1	20	,284
	EPR_PVII	,575	1	20	,457
	EPR_PVIII	2,063	1	20	,166

Prueba la hipótesis nula que la varianza de error de la variable dependiente es igual entre grupos.
a. Diseño : Interceptación + TTO
Diseño dentro de sujetos: ADQ

Adquisición segundo componente LCB. Latencia al primer agujero

```
GLM LpA_PI LpA_PII LpA_PIII LpA_PIV LpA_PV LpA_PVI LpA_PVII LpA_PVIII BY TTO
  /WSFACTOR=ADQ 8 Polynomial
  /METHOD=SSTYPE(3)
  /POSTHOC=TTO(SIDAK)
  /EMMEANS=TABLES(OVERALL)
  /EMMEANS=TABLES(ADQ) COMPARE ADJ(SIDAK)
  /EMMEANS=TABLES(TTO*ADQ) COMPARE(TTO) ADJ(SIDAK)
  /EMMEANS=TABLES(TTO*ADQ) COMPARE(ADQ) ADJ(SIDAK)
```

```
/PRINT=DESCRIPTIVE ETASQ OPOWER PARAMETER HOMOGENEITY
/CRITERIA=ALPHA(.05)
/WSDESIGN=ADQ
/DESIGN=TTO.
```

Estadísticos descriptivos

EST		TTO	Media	Desviación estándar	N
Ctrl	LpA_PI	Nic	6,3618	6,02604	11
		Veh	6,2955	4,74002	11
		Total	6,3286	5,29076	22
	LpA_PII	Nic	5,2645	2,43675	11
		Veh	4,8427	2,08791	11
		Total	5,0536	2,22486	22
	LpA_PIII	Nic	3,8564	1,37828	11
		Veh	4,3218	1,80779	11
		Total	4,0891	1,58669	22
	LpA_PIV	Nic	4,1736	2,02111	11
		Veh	3,3900	1,09740	11
		Total	3,7818	1,63692	22
	LpA_PV	Nic	3,4436	1,30196	11
		Veh	2,8682	,98948	11
		Total	3,1559	1,16625	22
	LpA_PVI	Nic	2,8182	1,14080	11
		Veh	2,8118	1,14853	11
		Total	2,8150	1,11709	22
	LpA_PVII	Nic	2,9255	1,10724	11
		Veh	3,3145	1,13870	11
		Total	3,1200	1,11396	22
	LpA_PVIII	Nic	2,4755	,98837	11
		Veh	3,1200	1,51634	11
		Total	2,7977	1,29185	22
Est	LpA_PI	Nic	6,3936	4,59636	11
		Veh	5,0045	2,86349	11
		Total	5,6991	3,80397	22
	LpA_PII	Nic	5,6936	2,13516	11
		Veh	4,1573	1,10750	11
		Total	4,9255	1,83662	22
	LpA_PIII	Nic	4,2755	1,49231	11
		Veh	4,8827	3,97365	11
		Total	4,5791	2,94552	22
	LpA_PIV	Nic	3,4891	1,20789	11
		Veh	4,0882	1,35641	11
		Total	3,7886	1,29030	22
	LpA_PV	Nic	3,6064	1,19219	11
		Veh	3,1364	1,19127	11
		Total	3,3714	1,18762	22
	LpA_PVI	Nic	4,2555	2,45110	11
		Veh	4,0300	2,38092	11
		Total	4,1427	2,36086	22
	LpA_PVII	Nic	4,7973	5,23209	11
		Veh	2,9491	,96750	11

	Total	3,8732	3,79156	22
LpA_PVIII	Nic	3,6291	1,45909	11
	Veh	3,8991	2,40348	11
	Total	3,7641	1,94517	22

Prueba de esfericidad de Mauchly[a]

Medida: MEASURE_1

EST	Efecto inter sujetos	W de Mauchly	Aprox. Chi-cuadrado	gl	Sig.	Épsilon[b]		
						Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite inferior
Ctrl	ADQ	,000	152,946	27	,000	,244	,277	,143
Est	ADQ	,010	80,202	27	,000	,450	,570	,143

Prueba la hipótesis nula que la matriz de covarianzas de error de las variables dependientes con transformación ortonormalizada es proporcional a una matriz de identidad.

a. Diseño : Interceptación + TTO
Diseño dentro de sujetos: ADQ

b. Se puede utilizar para ajustar los grados de libertad para las pruebas promedio de significación. Las pruebas corregidas se visualizan en la tabla de pruebas de efectos dentro de sujetos.

Pruebas de efectos dentro de sujetos

Medida: MEASURE_1

EST	Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad	Potencia observada[a]
Ctrl	ADQ	Esfericidad asumida	238,321	7	34,046	6,405	,000	,243	44,834	1,000
		Greenhouse-Geisser	238,321	1,705	139,801	6,405	,006	,243	10,919	,837
		Huynh-Feldt	238,321	1,941	122,808	6,405	,004	,243	12,429	,872
		Límite inferior	238,321	1,000	238,321	6,405	,020	,243	6,405	,673
	ADQ * TTO	Esfericidad asumida	10,425	7	1,489	,280	,961	,014	1,961	,131
		Greenhouse-Geisser	10,425	1,705	6,115	,280	,722	,014	,478	,088
		Huynh-Feldt	10,425	1,941	5,372	,280	,751	,014	,544	,091
		Límite inferior	10,425	1,000	10,425	,280	,602	,014	,280	,080
	Error(ADQ)	Esfericidad asumida	744,181	140	5,316					
		Greenhouse-Geisser	744,181	34,094	21,827					
		Huynh-Feldt	744,181	38,812	19,174					
		Límite inferior	744,181	20,000	37,209					
Est	ADQ	Esfericidad asumida	88,798	7	12,685	2,076	,050	,094	14,533	,782
		Greenhouse-Geisser	88,798	3,149	28,201	2,076	,109	,094	6,537	,520

		Huynh-Feldt	88,798	3,992	22,244	2,076	,092	,094	8,288	,593
		Límite inferior	88,798	1,000	88,798	2,076	,165	,094	2,076	,279
	ADQ * TTO	Esfericidad asumida	37,319	7	5,331	,873	,530	,042	6,108	,366
		Greenhouse-Geisser	37,319	3,149	11,852	,873	,464	,042	2,747	,235
		Huynh-Feldt	37,319	3,992	9,348	,873	,484	,042	3,483	,266
		Límite inferior	37,319	1,000	37,319	,873	,361	,042	,873	,144
	Error(ADQ)	Esfericidad asumida	855,429	140	6,110					
		Greenhouse-Geisser	855,429	62,974	13,584					
		Huynh-Feldt	855,429	79,842	10,714					
		Límite inferior	855,429	20,000	42,771					

a. Se ha calculado utilizando alpha = ,05

Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error[a]

EST		F	df1	df2	Sig.
Ctrl	LpA_PI	,487	1	20	,493
	LpA_PII	,033	1	20	,857
	LpA_PIII	,282	1	20	,601
	LpA_PIV	1,968	1	20	,176
	LpA_PV	1,631	1	20	,216
	LpA_PVI	,043	1	20	,839
	LpA_PVII	,004	1	20	,950
	LpA_PVIII	4,390	1	20	,049
Est	LpA_PI	,447	1	20	,512
	LpA_PII	3,291	1	20	,085
	LpA_PIII	1,266	1	20	,274
	LpA_PIV	,061	1	20	,807
	LpA_PV	,605	1	20	,446
	LpA_PVI	,020	1	20	,888
	LpA_PVII	3,231	1	20	,087
	LpA_PVIII	3,264	1	20	,086

Prueba la hipótesis nula que la varianza de error de la variable dependiente es igual entre grupos.
a. Diseño : Interceptación + TTO
Diseño dentro de sujetos: ADQ

Adquisición segundo componente LCB. Velocidad

```
GLM Vel_PI Vel_PII Vel_PIII Vel_PIV Vel_PV Vel_PVI Vel_PVII Vel_PVIII BY TTO
  /WSFACTOR=ADQ 8 Polynomial
  /METHOD=SSTYPE(3)
  /POSTHOC=TTO(SIDAK)
```

```
/EMMEANS=TABLES(OVERALL)
/EMMEANS=TABLES(ADQ) COMPARE ADJ(SIDAK)
/EMMEANS=TABLES(TTO*ADQ) COMPARE(TTO) ADJ(SIDAK)
/EMMEANS=TABLES(TTO*ADQ) COMPARE(ADQ) ADJ(SIDAK)
/PRINT=DESCRIPTIVE ETASQ OPOWER PARAMETER HOMOGENEITY
/CRITERIA=ALPHA(.05)
/WSDESIGN=ADQ
/DESIGN=TTO.
```

Estadísticos descriptivos

EST		TTO	Media	Desviación estándar	N
Ctrl	Vel_PI	Nic	9,4330	3,58184	10
		Veh	7,8333	1,55409	9
		Total	8,6753	2,85686	19
	Vel_PII	Nic	9,4880	4,30422	10
		Veh	8,8644	1,94440	9
		Total	9,1926	3,32352	19
	Vel_PIII	Nic	9,8630	3,48969	10
		Veh	9,6767	3,98711	9
		Total	9,7747	3,62815	19
	Vel_PIV	Nic	10,2910	3,59756	10
		Veh	12,0878	3,53682	9
		Total	11,1421	3,58893	19
	Vel_PV	Nic	10,6250	3,27855	10
		Veh	13,5900	4,60053	9
		Total	12,0295	4,13456	19
	Vel_PVI	Nic	12,4160	5,85482	10
		Veh	15,9756	5,06273	9
		Total	14,1021	5,64495	19
	Vel_PVII	Nic	16,8890	6,86878	10
		Veh	14,3933	5,28062	9
		Total	15,7068	6,13371	19
	Vel_PVIII	Nic	16,9250	5,01566	10
		Veh	13,6944	6,07899	9
		Total	15,3947	5,63462	19
Est	Vel_PI	Nic	9,4918	3,06378	11
		Veh	10,7870	2,81920	10
		Total	10,1086	2,95115	21
	Vel_PII	Nic	9,8855	2,05569	11
		Veh	10,9530	3,80266	10
		Total	10,3938	2,98639	21
	Vel_PIII	Nic	11,2145	3,45784	11
		Veh	13,1960	4,54061	10
		Total	12,1581	4,03539	21
	Vel_PIV	Nic	11,0991	4,02588	11
		Veh	14,5730	5,23270	10
		Total	12,7533	4,85655	21
	Vel_PV	Nic	13,6927	3,85134	11
		Veh	15,0350	6,70950	10
		Total	14,3319	5,30529	21
	Vel_PVI	Nic	12,4591	4,64500	11

		Veh	17,5980	7,46887	10
		Total	14,9062	6,54273	21
	Vel_PVII	Nic	13,3700	6,98260	11
		Veh	19,1530	6,55590	10
		Total	16,1238	7,24418	21
	Vel_PVIII	Nic	12,6382	6,13897	11
		Veh	15,9740	4,83856	10
		Total	14,2267	5,68271	21

Prueba de esfericidad de Mauchly[a]

Medida: MEASURE_1

EST	Efecto inter sujetos	W de Mauchly	Aprox. Chi-cuadrado	gl	Sig.	Épsilon[b]		
						Greenhouse-Geisser	Huynh-Feldt	Límite inferior
Ctrl	ADQ	,025	53,185	27	,002	,414	,538	,143
Est	ADQ	,030	57,850	27	,001	,500	,660	,143

Prueba la hipótesis nula que la matriz de covarianzas de error de las variables dependientes con transformación ortonormalizada es proporcional a una matriz de identidad.

a. Diseño : Interceptación + TTO
Diseño dentro de sujetos: ADQ

b. Se puede utilizar para ajustar los grados de libertad para las pruebas promedio de significación. Las pruebas corregidas se visualizan en la tabla de pruebas de efectos dentro de sujetos.

Pruebas de efectos dentro de sujetos

Medida: MEASURE_1

EST	Origen		Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad	Potencia observada[a]
Ctrl	ADQ	Esfericidad asumida	1022,880	7	146,126	8,312	,000	,328	58,186	1,000
		Greenhouse-Geisser	1022,880	2,899	352,826	8,312	,000	,328	24,098	,987
		Huynh-Feldt	1022,880	3,765	271,716	8,312	,000	,328	31,292	,997
		Límite inferior	1022,880	1,000	1022,880	8,312	,010	,328	8,312	,776
	ADQ * TTO	Esfericidad asumida	209,999	7	30,000	1,707	,114	,091	11,946	,677
		Greenhouse-Geisser	209,999	2,899	72,436	1,707	,179	,091	4,947	,412
		Huynh-Feldt	209,999	3,765	55,784	1,707	,163	,091	6,424	,479
		Límite inferior	209,999	1,000	209,999	1,707	,209	,091	1,707	,234
	Error(ADQ)	Esfericidad asumida	2091,959	119	17,579					
		Greenhouse-Geisser	2091,959	49,285	42,446					
		Huynh-Feldt	2091,959	63,997	32,689					
		Límite inferior	2091,959	17,000	123,056					
Est	ADQ	Esfericidad asumida	702,241	7	100,320	5,835	,000	,235	40,848	,999

		Greenhouse-Geisser	702,241	3,503	200,447	5,835	,001	,235	20,444	,963
		Huynh-Feldt	702,241	4,618	152,050	5,835	,000	,235	26,951	,988
		Límite inferior	702,241	1,000	702,241	5,835	,026	,235	5,835	,630
	ADQ * TTO	Esfericidad asumida	120,693	7	17,242	1,003	,432	,050	7,020	,420
		Greenhouse-Geisser	120,693	3,503	34,450	1,003	,406	,050	3,514	,281
		Huynh-Feldt	120,693	4,618	26,133	1,003	,417	,050	4,632	,328
		Límite inferior	120,693	1,000	120,693	1,003	,329	,050	1,003	,158
	Error(ADQ)	Esfericidad asumida	2286,472	133	17,192					
		Greenhouse-Geisser	2286,472	66,564	34,350					
		Huynh-Feldt	2286,472	87,751	26,056					
		Límite inferior	2286,472	19,000	120,341					

a. Se ha calculado utilizando alpha = ,05

Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error[a]

EST		F	df1	df2	Sig.
Ctrl	Vel_PI	2,080	1	17	,167
	Vel_PII	6,445	1	17	,021
	Vel_PIII	,679	1	17	,421
	Vel_PIV	,001	1	17	,982
	Vel_PV	1,237	1	17	,281
	Vel_PVI	,074	1	17	,788
	Vel_PVII	1,023	1	17	,326
	Vel_PVIII	1,488	1	17	,239
Est	Vel_PI	,013	1	19	,910
	Vel_PII	2,898	1	19	,105
	Vel_PIII	,319	1	19	,579
	Vel_PIV	,870	1	19	,363
	Vel_PV	2,139	1	19	,160
	Vel_PVI	1,809	1	19	,194
	Vel_PVII	,136	1	19	,716
	Vel_PVIII	,031	1	19	,863

Prueba la hipótesis nula que la varianza de error de la variable dependiente es igual entre grupos.
a. Diseño : Interceptación + TTO
Diseño dentro de sujetos: ADQ

Recobro primer componente LCB. Latencia de llegada al agujero meta

```
GLM Lat_PVIII Lat_PSC BY TTO
  /WSFACTOR=Ensayo 2 Polynomial
  /METHOD=SSTYPE(3)
```

```
/POSTHOC=TTO(SIDAK)
/PLOT=PROFILE(Ensayo*TTO)
/EMMEANS=TABLES(OVERALL)
/EMMEANS=TABLES(Ensayo) COMPARE ADJ(SIDAK)
/EMMEANS=TABLES(TTO*Ensayo) COMPARE(TTO) ADJ(SIDAK)
/EMMEANS=TABLES(TTO*Ensayo) COMPARE(Ensayo) ADJ(SIDAK)
/PRINT=DESCRIPTIVE ETASQ OPOWER PARAMETER HOMOGENEITY
/CRITERIA=ALPHA(.05)
/WSDESIGN=Ensayo
/DESIGN=TTO.
```

Estadísticos descriptivos

EST		TTO	Media	Desviación estándar	N
Ctrl	Lat_PVIII	Nic	9,7327	11,08950	11
		Veh	9,6827	8,28166	11
		Total	9,7077	9,55097	22
	Lat_PSC	Nic	19,1264	15,30181	11
		Veh	39,7427	37,25351	11
		Total	29,4345	29,72684	22
Est	Lat_PVIII	Nic	10,6691	11,11983	11
		Veh	17,6745	13,97165	11
		Total	14,1718	12,83317	22
	Lat_PSC	Nic	61,6800	76,51973	11
		Veh	40,8791	53,73649	11
		Total	51,2795	65,39569	22

Pruebas de contrastes dentro de sujetos

Medida: MEASURE_1

EST	Origen	Ensayo	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad	Potencia observada[a]
Ctrl	Ensayo	Lineal	4280,621	1	4280,621	12,366	,002	,382	12,366	,917
	Ensayo * TTO	Lineal	1174,521	1	1174,521	3,393	,080	,145	3,393	,418
	Error(Ensayo)	Lineal	6922,970	20	346,149					
Est	Ensayo	Lineal	15146,818	1	15146,818	6,284	,021	,239	6,284	,665
	Ensayo * TTO	Lineal	2126,283	1	2126,283	,882	,359	,042	,882	,146
	Error(Ensayo)	Lineal	48205,051	20	2410,253					

a. Se ha calculado utilizando alpha = ,05

Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error[a]

EST		F	df1	df2	Sig.
Ctrl	Lat_PVIII	,254	1	20	,620
	Lat_PSC	6,829	1	20	,017
Est	Lat_PVIII	1,484	1	20	,237
	Lat_PSC	1,755	1	20	,200

Prueba la hipótesis nula que la varianza de error de la variable dependiente es igual entre grupos.
a. Diseño : Interceptación + TTO
Diseño dentro de sujetos: Ensayo

Comparaciones por parejas

Medida: MEASURE_1

EST	TTO	(I) Ensayo	(J) Ensayo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.[b]	95% de intervalo de confianza para diferencia[b]	
							Límite inferior	Límite superior
Ctrl	Nic	1	2	-9,394	7,933	,250	-25,942	7,155
		2	1	9,394	7,933	,250	-7,155	25,942
	Veh	1	2	-30,060*	7,933	,001	-46,608	-13,512
		2	1	30,060*	7,933	,001	13,512	46,608
Est	Nic	1	2	-51,011*	20,934	,024	-94,678	-7,344
		2	1	51,011*	20,934	,024	7,344	94,678
	Veh	1	2	-23,205	20,934	,281	-66,872	20,463
		2	1	23,205	20,934	,281	-20,463	66,872

Se basa en medias marginales estimadas
*. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05.
b. Ajuste para varias comparaciones: Sidak.

Recobro primer componente LCB. Errores ponderados

```
GLM EPR_PVIII EPR_PSC BY TTO
  /WSFACTOR=Ensayo 2 Polynomial
  /METHOD=SSTYPE(3)
  /POSTHOC=TTO(SIDAK)
  /PLOT=PROFILE(Ensayo*TTO)
  /EMMEANS=TABLES(OVERALL)
  /EMMEANS=TABLES(Ensayo) COMPARE ADJ(SIDAK)
  /EMMEANS=TABLES(TTO*Ensayo) COMPARE(TTO) ADJ(SIDAK)
  /EMMEANS=TABLES(TTO*Ensayo) COMPARE(Ensayo) ADJ(SIDAK)
  /PRINT=DESCRIPTIVE ETASQ OPOWER PARAMETER HOMOGENEITY
  /CRITERIA=ALPHA(.05)
  /WSDESIGN=Ensayo
  /DESIGN=TTO.
```

Estadísticos descriptivos

EST		TTO	Media	Desviación estándar	N
Ctrl	EPR_PVIII	Nic	141,4509	165,04449	11
		Veh	134,1982	129,45621	11
		Total	137,8245	144,79464	22
	EPR_PSC	Nic	366,5318	378,79506	11
		Veh	526,8127	456,34296	11
		Total	446,6723	417,39788	22
Est	EPR_PVIII	Nic	125,4964	154,02444	11
		Veh	320,8200	246,17614	11
		Total	223,1582	223,93605	22

	EPR_PSC	Nic	693,7500	919,55543	11
		Veh	711,4727	851,28768	11
		Total	702,6114	864,77238	22

Pruebas de contrastes dentro de sujetos

Medida: MEASURE_1

EST	Origen	Ensayo	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad	Potencia observada[a]
Ctrl	Ensayo	Lineal	1049256,105	1	1049256,105	12,623	,002	,387	12,623	,922
	Ensayo * TTO	Lineal	77185,678	1	77185,678	,929	,347	,044	,929	,151
	Error(Ensayo)	Lineal	1662432,845	20	83121,642					
Est	Ensayo	Lineal	2528628,889	1	2528628,889	7,077	,015	,261	7,077	,716
	Ensayo * TTO	Lineal	86740,728	1	86740,728	,243	,628	,012	,243	,076
	Error(Ensayo)	Lineal	7145705,409	20	357285,270					

a. Se ha calculado utilizando alpha = ,05

Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error[a]

EST		F	df1	df2	Sig.
Ctrl	EPR_PVIII	,167	1	20	,687
	EPR_PSC	1,205	1	20	,285
Est	EPR_PVIII	2,063	1	20	,166
	EPR_PSC	,120	1	20	,732

Prueba la hipótesis nula que la varianza de error de la variable dependiente es igual entre grupos.

a. Diseño : Interceptación + TTO
Diseño dentro de sujetos: Ensayo

Comparaciones por parejas

Medida: MEASURE_1

EST	TTO	(I) Ensayo	(J) Ensayo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.[b]	95% de intervalo de confianza para diferencia[b]	
							Límite inferior	Límite superior
Ctrl	Nic	1	2	-225,081	122,935	,082	-481,519	31,357
		2	1	225,081	122,935	,082	-31,357	481,519
	Veh	1	2	-392,615*	122,935	,005	-649,053	-136,177
		2	1	392,615*	122,935	,005	136,177	649,053
Est	Nic	1	2	-568,254*	254,874	,037	-1099,912	-36,595
		2	1	568,254*	254,874	,037	36,595	1099,912
	Veh	1	2	-390,653	254,874	,141	-922,311	141,006
		2	1	390,653	254,874	,141	-141,006	922,311

Se basa en medias marginales estimadas

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05.

b. Ajuste para varias comparaciones: Sidak.

Recobro segundo componente LCB. Latencia al primer agujero

```
GLM LpA_PVIII LpA_PSC BY TTO
  /WSFACTOR=Ensayo 2 Polynomial
  /METHOD=SSTYPE(3)
  /POSTHOC=TTO(SIDAK)
  /PLOT=PROFILE(Ensayo*TTO)
  /EMMEANS=TABLES(OVERALL)
  /EMMEANS=TABLES(Ensayo) COMPARE ADJ(SIDAK)
  /EMMEANS=TABLES(TTO*Ensayo) COMPARE(TTO) ADJ(SIDAK)
  /EMMEANS=TABLES(TTO*Ensayo) COMPARE(Ensayo) ADJ(SIDAK)
  /PRINT=DESCRIPTIVE ETASQ OPOWER PARAMETER HOMOGENEITY
  /CRITERIA=ALPHA(.05)
  /WSDESIGN=Ensayo
  /DESIGN=TTO.
```

Estadísticos descriptivos

EST		TTO	Media	Desviación estándar	N
Ctrl	LpA_PVIII	Nic	2,4755	,98837	11
		Veh	3,1200	1,51634	11
		Total	2,7977	1,29185	22
	LpA_PSC	Nic	3,2609	1,48877	11
		Veh	4,3618	2,38333	11
		Total	3,8114	2,01935	22
Est	LpA_PVIII	Nic	3,6291	1,45909	11
		Veh	3,8991	2,40348	11
		Total	3,7641	1,94517	22
	LpA_PSC	Nic	4,1555	3,21826	11
		Veh	3,6564	1,85192	11
		Total	3,9059	2,57495	22

Pruebas de contrastes dentro de sujetos

Medida: MEASURE_1

EST	Origen	Ensayo	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad	Potencia observada[a]
Ctrl	Ensayo	Lineal	11,302	1	11,302	5,972	,024	,230	5,972	,643
	Ensayo * TTO	Lineal	,573	1	,573	,303	,588	,015	,303	,082
	Error(Ensayo)	Lineal	37,852	20	1,893					
Est	Ensayo	Lineal	,221	1	,221	,066	,801	,003	,066	,057
	Ensayo * TTO	Lineal	1,627	1	1,627	,482	,495	,024	,482	,101
	Error(Ensayo)	Lineal	67,487	20	3,374					

a. Se ha calculado utilizando alpha = ,05

Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error[a]

EST		F	df1	df2	Sig.
Ctrl	LpA_PVIII	4,390	1	20	,049
	LpA_PSC	2,191	1	20	,154
Est	LpA_PVIII	3,264	1	20	,086
	LpA_PSC	,899	1	20	,354

Prueba la hipótesis nula que la varianza de error de la variable dependiente es igual entre grupos.
a. Diseño : Interceptación + TTO
Diseño dentro de sujetos: Ensayo

Comparaciones por parejas

Medida: MEASURE_1

EST	TTO	(I) Ensayo	(J) Ensayo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.[b]	95% de intervalo de confianza para diferencia[b]	
							Límite inferior	Límite superior
Ctrl	Nic	1	2	-,785	,587	,196	-2,009	,438
		2	1	,785	,587	,196	-,438	2,009
	Veh	1	2	-1,242*	,587	,047	-2,465	-,018
		2	1	1,242*	,587	,047	,018	2,465
Est	Nic	1	2	-,526	,783	,509	-2,160	1,108
		2	1	,526	,783	,509	-1,108	2,160
	Veh	1	2	,243	,783	,760	-1,391	1,877
		2	1	-,243	,783	,760	-1,877	1,391

Se basa en medias marginales estimadas
*. La diferencia de medias es significativa en el nivel ,05.
b. Ajuste para varias comparaciones: Sidak.

Adquisición segundo componente LCB. Velocidad

```
GLM Vel_PVIII Vel_PSC BY TTO
  /WSFACTOR=Ensayo 2 Polynomial
  /METHOD=SSTYPE(3)
  /POSTHOC=TTO(SIDAK)
  /PLOT=PROFILE(Ensayo*TTO)
  /EMMEANS=TABLES(OVERALL)
  /EMMEANS=TABLES(Ensayo) COMPARE ADJ(SIDAK)
  /EMMEANS=TABLES(TTO*Ensayo) COMPARE(TTO) ADJ(SIDAK)
  /EMMEANS=TABLES(TTO*Ensayo) COMPARE(Ensayo) ADJ(SIDAK)
  /PRINT=DESCRIPTIVE ETASQ OPOWER PARAMETER HOMOGENEITY
  /CRITERIA=ALPHA(.05)
  /WSDESIGN=Ensayo
  /DESIGN=TTO.
```

Estadísticos descriptivos

EST		TTO	Media	Desviación estándar	N
Ctrl	Vel_PVIII	Nic	16,2345	5,28064	11

		Veh	12,4282	6,19808	11
		Total	14,3314	5,94699	22
	Vel_PSC	Nic	14,6827	6,42676	11
		Veh	13,3382	4,30283	11
		Total	14,0105	5,38127	22
Est	Vel_PVIII	Nic	12,6382	6,13897	11
		Veh	15,8491	4,60892	11
		Total	14,2436	5,54632	22
	Vel_PSC	Nic	15,0109	3,99675	11
		Veh	15,7655	5,16747	11
		Total	15,3882	4,52453	22

Pruebas de contrastes dentro de sujetos

Medida: MEASURE_1

EST	Origen	Ensayo	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Cuadrático promedio	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado	Parámetro de no centralidad	Potencia observada[a]
Ctrl	Ensayo	Lineal	1,133	1	1,133	,051	,824	,003	,051	,055
	Ensayo * TTO	Lineal	16,667	1	16,667	,750	,397	,036	,750	,131
	Error(Ensayo)	Lineal	444,609	20	22,230					
Est	Ensayo	Lineal	14,410	1	14,410	,787	,386	,038	,787	,135
	Ensayo * TTO	Lineal	16,593	1	16,593	,906	,352	,043	,906	,148
	Error(Ensayo)	Lineal	366,153	20	18,308					

a. Se ha calculado utilizando alpha = ,05

Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error[a]

EST		F	df1	df2	Sig.
Ctrl	Vel_PVIII	1,061	1	20	,315
	Vel_PSC	1,881	1	20	,185
Est	Vel_PVIII	,121	1	20	,731
	Vel_PSC	,976	1	20	,335

Prueba la hipótesis nula que la varianza de error de la variable dependiente es igual entre grupos.

a. Diseño : Interceptación + TTO
Diseño dentro de sujetos: Ensayo

Comparaciones por parejas

Medida: MEASURE_1

EST	TTO	(I) Ensayo	(J) Ensayo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.[a]	95% de intervalo de confianza para diferencia[a]	
							Límite inferior	Límite superior
Ctrl	Nic	1	2	1,552	2,010	,449	-2,642	5,746
		2	1	-1,552	2,010	,449	-5,746	2,642
	Veh	1	2	-,910	2,010	,656	-5,104	3,284
		2	1	,910	2,010	,656	-3,284	5,104

Est	Nic	1	2	-2,373	1,824	,208	-6,178	1,433
		2	1	2,373	1,824	,208	-1,433	6,178
	Veh	1	2	,084	1,824	,964	-3,722	3,889
		2	1	-,084	1,824	,964	-3,889	3,722

Se basa en medias marginales estimadas

a. Ajuste para varias comparaciones: Sidak.

Anexo 5. Protocolo de inmunohistoquímica

Protocolo de Inmunohistoquímica – Free Floating

Estudio: Nicotina – Estrés – Barnes Antígeno rastreado: c-Fos

Ac-primario / [:]: ab190289 [1:10 000] Ac-secundario / [:]: BA-1100 [1:500]

Número de pozos: 24 Control (+/-): WAR

Sesión 1: DD/MM/AAAA

- ☐☐☐ 1. Lavar anticongelante con PBS, 3 veces x 3 min.
- ☐☐ 2. Permeabilizar el tejido con PBS-T, 2 veces x 10 min.
- ☐☐☐ 3. Lavar el detergente con PBS, 3 veces x 3 min.
- ☐ 4. Inactivar la peroxidasa endógena con solución de bloqueo EPX x 20 min.
- ☐☐☐☐ 5. Lavar solución de bloqueo con PBS, 4 veces x 3 min
- ☐☐☐ 6. Equilibrar el tejido con PBS-T, 3 veces x 3 min
- ☐ 7. Bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo primario con solución de bloqueo UI Ac-prim x 1h.

  Inició: Terminó: .
- ☐ 8. Incubar el anticuerpo primario con solución de incubación Ac-prim a temperatura ambiente sobre el agitador a 60 rpm.

  Inició: Terminó: .

Sesión 2: DD/MM/AAAA

- ☐☐☐☐☐ 9. Lavar el exceso de Ac-prim con PBS-T, 5 veces x 3 min
- ☐ 10. Incubar el anticuerpo secundario con solución de incubación Ac-sec x 2h.

  Inició: Terminó: .
- ☐☐☐☐ 11. Lavar el exceso de Ac-sec con PBS-T, 4 veces x 3 min. **[¡OJO! Ver paso 13]**
- ☐☐☐☐ 12. Lavar el detergente con PBS, 4 veces x 3 min.
- ☐ 13. Amplificar la señal con solución AB x 2h. **[Preparar 30 min antes de usarse]**

  Inició: Terminó: Se preparó: .
- ☐☐☐ 14. Lavar el exceso de AB con PBS, 3 veces x 3 min.
- ☐ 15. Revelar la señal con solución de revelado, el tiempo de revelado lo determina el experimentador. Este paso se realiza con **luz tenue**.
- ☐☐☐☐ 16. Detener la reacción de revelado con PBS.

SOLUCIONES DE TRABAJO Protocolo de Inmunohistoquímica – Free Floating

PBS (0.01M): Debe disponer de 60 mL por cada pozo para completar todo el procedimiento. Para 1L de PBS 0.01M necesita: • 950 mL de *dd*H_2O. • 50 mL de PB 0.2M. • 9 g de NaCl.	**PBS-T**: Debe disponer de 30 mL por cada pozo para completar todo el procedimiento. Para 1L de PBS-T necesita: • 1 L de PBS 0.01M • 5 mL de Tritón al 100%	**Bloqueo EPX**: Debe disponer de 1 mL por cada pozo. Se debe preparar **justo antes de usarse** y el **orden** de los reactivos es importante. El volumen total corresponde a: • 25% de PB 0.1M. • 50% de Etanol al 100%. • 25% de H_2O_2 al 4%. [1] [1] Agua oxigenada comercial de jgb, antes de usar otra marca asegúrese de que la concentración es la misma.	**Bloqueo UI Ac-prim**: Debe disponer de 2 mL por cada pozo. El volumen total corresponde a: • 80% de PBS-T. • 10% de Gelatina al 2%. • 10% de Suero normal del animal en que haya sido fabricado el Ac-secundario, al 2.5%.
Incubación Ac-prim: Debe disponer de 1 mL por cada pozo. Esta solución se prepara sobre la solución de bloqueo UI Ac-prim, agregue: • Ac-prim. La concentración depende del anticuerpo usado, se debe verificar en protocolos anteriores o en la ficha técnica.	**Incubación Ac-sec**: Debe disponer de 1 mL por cada pozo. El volumen total corresponde a: • 86% de PBS-T. • 10% de Gelatina al 2%. • 4% de Suero fetal bovino. • Ac-sec 1:500. El anticuerpo debe ser contra la especie en que fue fabricado el Ac-primario.	**AB**: Debe disponer de 1 mL por cada pozo. Esta solución se prepara **30 min antes** de usarse, sobre PBS 0.01M: Por cada mL de PBS agregue: • 3 µL de solución A. [2] • 3 µL de solución B. [2] [2] Estos reactivos los encuentra en el kit PK-6100.	**Revelado**: Debe disponer de 1 mL por cada pozo. Se debe preparar **justo antes de usarse** y el **orden** de los reactivos es importante. Sobre *dd*H_2O, por cada mL agregue: • 16.8 µL de Buffer stock. [3] • 20 µL de DAB. [3] • 16 µL de H_2O_2. [3] • 16 µL de $NiCl_2$. [3] [3] Estos reactivos los encuentra en el kit SK-4100.

Anexo 6. Información suplementaria

Tabla 1. Matriz de correlaciones exploratorias Indicadores laberinto de Barnes - Inmunohistoquímica c-Fos

	Lat	**EPR**	Err	Dist	**LpA**	**Vel**	**PVN**	**AcS**	AcC	BLA	CeC	DG	PrL
Lat	1												
EPR	**0.88***	1											
Err	**0.88***	**0.99***	1										
Dist	**0.97***	**0.91***	**0.92***	1									
LpA	0.06	-0.11	-0.12	0.02	1								
Vel	-0.01	0.23	0.27	0.20	-0.21	1							
PVN	-0.24	-0.14	-0.16	-0.26	**-0.48***	-0.05	1						
AcS	0.03	0.15	0.12	0.05	**-0.49***	0.05	0.36	1					
AcC	-0.12	-0.24	-0.23	-0.16	-0.20	-0.01	0.40	0.11	1				
BLA	-0.19	-0.29	-0.28	-0.25	-0.37	-0.25	**0.43***	**0.49***	0.42	1			
CeC	0.19	0.18	0.16	0.13	-0.27	-0.17	0.42	0.07	0.28	**0.46***	1		
DG	-0.06	-0.18	-0.18	-0.08	-0.24	-0.12	**0.45***	0.13	0.28	0.26	0.17	1	
PrL	-0.27	-0.26	-0.25	-0.29	-0.07	-0.23	0.38	0.29	0.10	**0.63***	0.19	-0.06	1

Notas:

Se presentan los coeficientes de correlación de Spearman para cada pareja de variables.

Indicadores laberinto de Barnes: latencia (Lat), errores ponderados rectos (EPR), errores (Err), distancia (Dist), latencia al primer agujero (LpA), Velocidad (Vel).

Estructuras inmunohistoquímica c-Fos: núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), región *Shell* del núcleo acumbens (AcS), región Core del núcleo acumbens (AcC), amígdala basolateral (BLA), núcleo central de la amígdala (CeC), giro dentado hipocampo (DG), corteza prelímbica (PrL)

La variables en negrilla fueron incluidas en la tesis; los coeficientes en negrilla son significativos; * $p < 0.05$

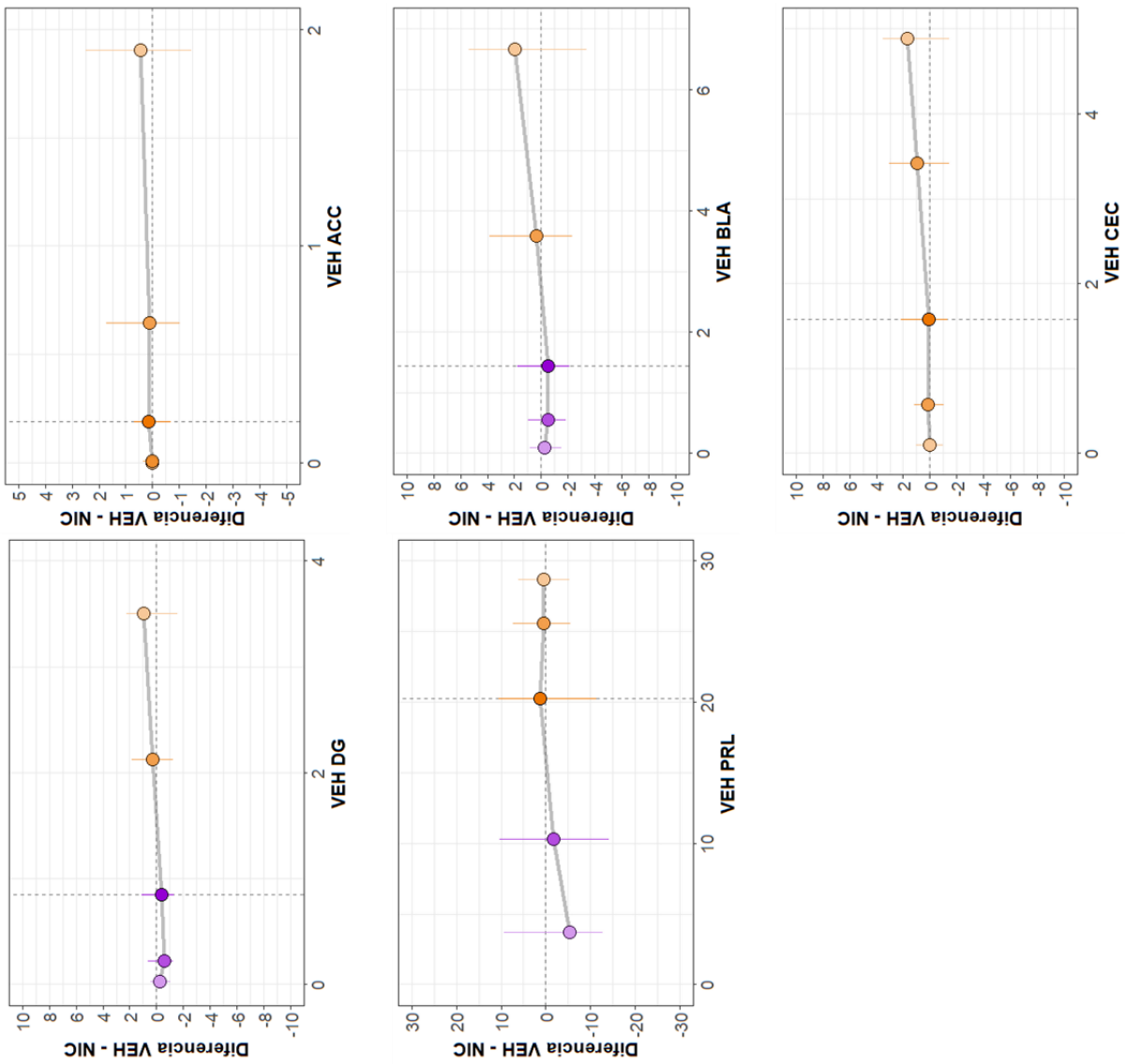


Figura 1. Estructuras suplementarias inmuno c-Fos. Región *Core* del núcleo accumbens (ACC). Amígdala basolateral (BLA). Amígdala central (CEC). Giro dentado (DG). Corteza prelímbica (PRL)