**ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE NEBULIZACIÓN DE NICOTINA PARA EL ESTUDIO DE ADICCIÓN EN RATAS WISTAR**

Bernardo Ángel De Felipe-Lucioa, T. Jiménez-Molinab, A. Cortés-Sola, E. Morgadoa, Claudia Juárez-Portillaa, c

aFacultad de Biología, Universidad Veracruzana, [anheruan@gmail.com](mailto:anheruan@gmail.com), [alcortes@uv.mx](mailto:alcortes@uv.mx); [elmorvi@hotmail.com](mailto:melmorvi@hotmail.com) bFacultad de Química Farmacéutica, Universidad Veracruzana, [tmolina@uv.mx](mailto:tmolina@uv.mx)

cCentro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Veracruzana, [cljuarez@uv.mx](mailto:cljuarez@uv.mx)

**RESUMEN**

El consumo de sustancias psicoactivas se ha convertido en un problema de salud, económico y social. Los avances recientes en el entendimiento de las bases neurobiológicas de la adicción a drogas específicas, como la nicotina, han derivado en el desarrollo de modelos animales de estudio en laboratorio. Así, los mecanismos que regulan la transición entre el uso ocasional al uso recurrente de las drogas han sido descritos utilizando los modelos animales. De manera general, se tienen dos tipos de modelo de consumo: la autoadministración y la administración forzada. Esta última a través de la vía intragástrica, intraperitoneal y subcutánea ocasionando estrés en los animales y distando de las vías de administración convencionalmente utilizadas por los humanos. En cada caso se busca expresar los niveles de hiperactividad característicos del consumo de dicha droga dependiendo de la dosis administrada. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue validar y estandarizar el método de nebulización forzada de nicotina, droga cuya vía de consumo es principalmente a través de la inhalación. Se utilizaron ratas Wistar macho (n=7), mantenidas en condiciones de bioterio bajo un ciclo de luz/oscuridad 12/12h (encendido a las 07:00 h), con agua y alimento *ad libitum*. Durante 4 días, la actividad locomotora de los sujetos fue evaluada utilizando la prueba de campo abierto (5 min) en siete condiciones experimentales: 1) administración de 0.35 mg/kg de nicotina vía subcutánea, como control; nebulización durante 15 minutos de 2) agua destilada, solución de nicotina 3) 0.5 mg/ml, 4) 1.0 mg/ml, 5) 1.5 mg/ml, 6) 2.0 mg/ml y 7) 2.5 mg/ml. Los resultados indicaron que, durante los 4 días experimentales, la actividad locomotora aumentó en los sujetos nebulizados con la solución de nicotina 2.5mg/ml, similar a lo reportado con la administración subcutánea de 0.35 mg/kg de nicotina. Esto sugiere que el método de nebulización forzada es un modelo eficaz para la investigación sobre los efectos de la administración de drogas como la nicotina, simulando la administración de esta droga en humanos.

**1. INTRODUCCIÓN**

Las drogas de abuso son aquellas sustancias psicoactivas que son utilizadas para producir algún tipo de placer, promoviendo la dependencia del individuo a su uso. Se clasifican según sus efectos en: alucinógenas, depresoras o estimulantes (OMS, 1993). De entre ellas, la nicotina es una droga estimulante consumida principalmente por inhalación de tabaco, cuyo uso recreativo termina convirtiéndose en adictivo, representando la principal causa de muertes prevenibles en el mundo (OMS, 2011). Los avances recientes en el entendimiento de las bases neurobiológicas de la adicción a nicotina se deben al desarrollo de modelos animales, donde se emplea la autoadministración o la administración forzada de nicotina. Este último implica una manipulación importante sobre los individuos, provocando estrés y nerviosismo, respuestas que pueden influir y afectar en la experimentación.

El objetivo del presente trabajo es validar el método de nebulización como vía de administración forzada de nicotina y establecer la concentración requerida para promover los mismos efectos hiperactivos que se han observado en otras vías de administración tradicionales. Este método de administración podría reducir el miedo y estrés causado en los animales en comparación con métodos tradicionales, donde existe mayor manipulación y afección física. Adicionalmente, la administración de nicotina por la vía respiratoria simula de forma más precisa las condiciones humanas de consumo de dicha droga.

**2. TEORÍA**

Una característica de la nicotina es que además de tener efectos estimulantes, también puede actuar como sedante (Gilbert, 1979), dependiendo de la dosis (Rev. en Leshner, 2001). Para el estudio de la nicotina como droga de abuso, se utilizan modelos animales donde se busca simular las condiciones humanas de su consumo. En dichos modelos se espera que la dosis utilizada de nicotina actúe sobre los circuitos neurales relacionados a las drogas de abuso. La activación del sistema límbico por nicotina se manifiesta conductualmente por el aumento de la actividad motora (Reavill y Stolerman, 1990), así como la aparición de algunos signos somáticos como ptosis, fasciculación facial, golpeteo de dientes o incremento en los pestañeos (Hildebrand *et al*., 1997).

Los métodos de administración de nicotina más utilizados en modelos animales son: vía intragástrica, intraperitoneal y subcutánea. Algunos trabajos que han utilizado la vía de administración subcutánea en ratas han utilizado dosis de nicotina en el rango de 0.1 – 0.5 mg/kg y se ha observado un aumento en la actividad motora que puede durar hasta 80 minutos (Benwell y Balfour, 1992; Ksir *et al.*, 1985; Nisell *et* al., 1996). Mathieu-Kia y colaboradores (1998) reportaron la activación de estructuras límbicas utilizando una dosis de 0.35 mg/kg de nicotina, manifestándose conductualmente por una hiperactividad. Por otra parte, la vía de administración por inhalación (nebulización), vía de administración común para diversas drogas de abuso, ha sido únicamente reportada por Keith (2013) para el estudio de metanfetaminas.

Una forma de evaluar la actividad motora en ratas es con ayuda de la prueba de campo abierto, donde se mide el tiempo de deambulación (tiempo en movimiento) y el número de cuadros cruzados, durante un periodo de 5 minutos, variables que indican de manera general la motricidad animal (Prud y Belzung, 2003). Además, se cuantifican otras variables como conducta exploratoria, acicalamiento, inmovilidad y defecación. (Bronikowski *et al*., 2001). En el presente trabajo se consideró el tiempo de deambulación y el número de cuadros cruzados para evaluar la actividad motora después de la administración de nicotina por nebulización.

**3. PARTE EXPERIMENTAL**

*Alojamiento de animales*

Se utilizaron ratas macho Wistar adultas (n=7), con peso aproximado de 300g, alojadas y mantenidas en el Centro de Investigaciones Biomédicas de Xalapa, Veracruz, México. Las ratas se alojaron en grupo (4 por caja) en cajas de policarbonato (47 x 58 x 19 cm) bajo condiciones de luz-oscuridad 12/12 (encendido a las 07:00 h), con alimento (Purina Rat Chow) y agua *ad libitum,* y temperatura constante de 22±1 °C. Todos los procedimientos utilizados en este experimento están regulados por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

*Aparato experimental*

La dosificación de nicotina y vapor de agua se realizó en cajas de policarbonato (37 x 53 x 19 cm) divididas en seis compartimentos triangulares (37 x 25 x 19 cm) con láminas de acrílico transparentes y sellados con silicona líquida. En el centro de la caja se colocó un tubo de policloruro de vinilo de una pulgada de diámetro x 25 cm de altura, de manera que una parte del tubo sobresaliese de la superficie de la caja y que a su vez funcione como punto de unión de las láminas de acrílico, que delimitan los compartimentos en la caja. En el tubo se hicieron verticalmente cuatro orificios de aproximadamente 3 mm de diámetro, separados equitativamente en el largo del tubo, de manera que el vapor se distribuyera por igual en todos los compartimentos. En cada procedimiento la caja se cerró con tapas de plástico removibles, con un orificio en el centro para la salida del tubo principal. El extremo del tubo principal se conectó durante cada nebulización a la manguera del nebulizador de pistón (Hergom 403B), que coinciden en diámetro, y se selló con papel parafina durante cada procedimiento para impedir el escape del vapor.

*Diseño experimental*

Los animales se asignaron al azar en cada uno de los tratamientos siguientes para recibir nebulización de: solución de nicotina 1) 0.5 mg/ml, 2) 1.0 mg/ml, 3) 1.5 mg/ml, 4) 2.0 mg/ml, 5) 2.5 mg/ml, 6) agua destilada y 7) 0.35 mg/kg de nicotina vía subcutánea como control. Cada sujeto se nebulizó diariamente a las 12:00 h con 6ml de solución de nicotina o agua destilada, según correspondiera, durante 15 minutos. De manera paralela el control fue administrado con 1ml de solución de nicotina vía subcutánea en el área dorsal. Los sujetos fueron trasladados desde las cajas hospederas hasta las cajas de nebulización para recibir su tratamiento y al finalizar se regresaron a sus cajas de alojamiento. Este procedimiento se repitió durante 4 días. Las soluciones de nicotina utilizadas en la nebulización fueron preparadas a partir de tartrato ácido de nicotina (Sigma, N5260) diluida en agua destilada en las concentraciones anteriormente indicadas. Para la administración subcutánea se diluyeron los 0.35 mg/kg indicados de nicotina en solución salina fisiológica.

*Análisis conductual*

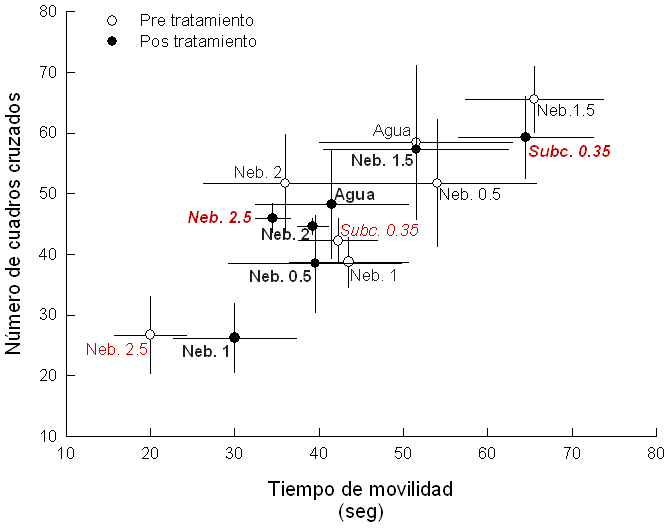
La actividad motora se evaluó por medio de pruebas de campo abierto (5 minutos) en cajas de policarbonato (37 x 53 x 19 cm), marcadas en la base de la caja con líneas negras, formando 12 cuadros de 11 x 11 cm. Al inicio de cada prueba los sujetos fueron colocados en una esquina del campo, en posición paralela a la pared de la caja. Las pruebas de campo abierto se realizaron antes e inmediatamente después de cada nebulización e inyección. Cada prueba fue grabada con una videocámara (Sony DCR-SX40) colocada en la parte superior del campo para su posterior análisis. Se cuantificó la actividad ambulatoria de los sujetos y el número de cuadros que cruzaron en el transcurso de 5 minutos.

*Análisis de datos*

Se realizó un análisis descriptivo de los datos utilizando un gráfico de dispersión bivariada considerando los promedios y los errores estándar correspondientes a las pseudorréplicas de cada sujeto para cada uno de los tratamientos. La dispersión incluyó el contraste entre pre- y postratamiento. Los análisis se realizaron en el programa estadístico SigmaPlot (v.10.0).

**4. RESULTADOS**

La dispersión de los promedios muestra que la nebulización con la concentración 2.5 mg/ml de nicotina aumentó el número de cuadros cruzados con respecto al pretratamiento en 10 ± 2 (Fig. 1). Igualmente, el tiempo en movimiento aumentó después de la nebulización con la concentración 2.5 mg/ml, en 8.4 ± 2.4 seg. Con la administración subcutánea de 0.35 mg/kg de nicotina, se observó un aumento de 10 ± 2 en el número de cuadros cruzados con respecto al pretratamiento, así como en el tiempo en movimiento, 22.3 ± 8.1 seg. Estas dos concentraciones fueron las únicas que mostraron, dentro de la nube de dispersión, un posible contraste estadístico, el cual requiere de un mayor número de muestra. Por otra parte, las concentraciones inferiores a 2.5 mg/ml no mostraron contraste después de la nebulización con nicotina, tanto en número de cuadros cruzados, como en tiempo en movimiento. Adicionalmente, se observaron signos somáticos espontáneos y momentáneos, tales como golpeteo de dientes, temblor de cabeza y fasciculación facial, principalmente durante la nebulización de nicotina con la concentración 2.5 mg/ml y algunas veces con 2.0 mg/ml. Asimismo, los sujetos manipulados para nebulización no mostraron reacciones que sugieran un estado de estrés (pelo erizado, defecación, chillidos), contrario a lo observado durante la administración subcutánea.



Pretratamiento

Postratamiento

**Figura 1**. Efecto de la nebulización de nicotina sobre la actividad motriz. El gráfico de dispersión muestra el comportamiento de dos variables (número de cuadros cruzados y tiempo de movilidad) antes y después de recibir el tratamiento de nebulización de nicotina en diferentes concentraciones. Note que con la concentración 2.5 mg/ml de nicotina nebulizada ambas variables aumentan con respecto al pretratamiento, similar a lo observado en el control (0.35 mg/kg de nicotina) utilizando la vía subcutánea. Las líneas horizontales y verticales corresponden al error estándar.

**5. DISCUSIÓN Y CONLUSIÓN**

En este estudio desarrollamos un modelo animal de administración forzada que simula la forma de consumo de nicotina en humanos, utilizando la vía intranasal. Una ventaja que presenta este modelo es la reducción del estrés, como consecuencia de la disminución en la manipulación de los sujetos para la administración de la droga. Nuestras observaciones indicaron que tras la nebulización de nicotina en una concentración de 2.5mg/ml durante las cuatro sesiones, se presentó la hiperactividad característica causada por esta droga (aumento en el número de cuadros cruzados y el tiempo deambulante), similar a lo reportado con la administración subcutánea de 0.35mg/kg (Mathieu-Kia *et* al., 1998). En el presente estudio se pudo validar el método de nebulización para la administración de nicotina, útil para el estudio de la adicción a nicotina en ratas Wistar. Este aumento en la actividad motriz sólo fue observado con la concentración de 2.5mg/ml, pero no con el resto de las concentraciones estudiadas, indicando la efectividad de esta concentración para producir el efecto hiperactivo en ratas, de manera similar a otros métodos de administración, como la subcutánea (Benwell y Balfour, 1992; Ksir *et al.*, 1985; Nisell *et* al., 1996). Se ha reportado el incremento de la actividad motriz junto con la activación de estructuras límbicas posterior a la administración subcutánea de nicotina (Mathieu-Kia *et* al., 1998). Nuestros resultados sugieren la activación de estructuras del sistema límbico, desconociendo el neurocircuito que promueve este incremento en la actividad motriz, abriendo posibilidades a nuevos estudios. Concluimos que el método de nebulización forzada es un modelo eficaz para la investigación sobre los efectos de la administración de drogas como la nicotina, simulando la administración de esta droga en humanos.

**BIBLIOGRAFÍA**

1. C. Ksir, R. Hakan D. P. Hall Jr, K. J. Kellart, “Exposure to nicotine enhances the behavioral stimulant effect of nicotine and increases binding of [3H]acetylcholine to nicotinic receptors”, Neuropharmacology, Vol. 24, No. 6, 1984, pp. 527-531.
2. C. Reavill, I. P. Stolerman, “Locomotor activity in rats after administration of nicotinic agonists intracerebrally”, British Journal of Pharmacology, Vol. 99, 1990, pp. 273-278.
3. D. R. Keith, C. L. Hart, M. Robotham, M. Tariq, J. Le Sauter, R. Silver, “Time of day influences the voluntary intake and behavioral response to methamphetamine and food reward”, Pharmacology, Biochemistry and Behavior, Vol. 110, 2013, pp. 117-126.
4. E. Hildebrand, G. G. Nomikos, C. Bondjers, M. Nisell, T. H. Svensson, "Behavioral manifestations of the nicotine abstinence síndrome in the rat: pripheral versus central mechanisms”, Psychopharmacology, Vol. 129, 1997, pp. 348-356.
5. G. Gilbert, “Paradoxical tranquilizing and emotion-reducing effects of nicotine”, American Psychological Association, Vol. 86, No. 4, 1979. pp. 643-661.
6. I. Leshner, “Nicotine Addiction. Research Report Series. National Institute on Drug Abuse”, NIH Publication, Vol.1, 2011, p. 4342.
7. L. Prut, C. Belzung, “The open field as a paradigm to measure the effect of drugs on anxiety-like behaviors: a review”, European Journal of Pharmacology, Vol. 463, 2003, pp. 3-33.
8. M. Bronikowski, P. A. Carter, J. G. Swallow, I. A. Girard, J. S., Rhodes, T. Garland Jr., “Open-field behavior of house mice selectively bred for high voluntary wheel-running”, Behavior Genetics Vol. 31, No. 3, 2001, pp. 09-316.
9. M. E. M. Benwell, D. J. K. Balfour, “The effects of acute and repeated nicotine treatment on nucleaus accumbens dopamine and locomotor activity”, British Journal of Pharmacology, Vol. 105, 1992, pp. 849-856.
10. M. Mathieu-Kia, C. Pages, M.J. Besson, “Inducibility of c-Fos protein in visuo-motor system and limbic structures after acute and repeated administration of nicotine in the rat”, Synapse, Vol. 29, 1998, pp. 343-354.
11. M. Nisell, G. G. Nomikos, P. Hertel, G. Panagis, T. H. Svensson, “Condition.independent sensitization of locomotor stimulation and mesocortical dopamine release following chronic nicotine treatment in the rat”, Synapse, Vol. 22, 1996, pp. 369-381.
12. OMS, “WHO expert committee on drug dependence. Twenty-eighth report”, in *Serie de Reportes Técnicos No. 836* (Organización Mundial de la Salud, Ginebra, 1993).
13. OMS, “WHO report on the global tobacco epidemic, 2011: warning about the dangers of tobacco”, in *Serie de Reportes Técnicos No. 3* (Organización Mundial de la Salud, Italia, 2011).