



Universidad Autónoma del Estado de México

Facultad de Ciencias

**EFFECTO DE LA NICOTINA SOBRE LA CONDUCTA SOCIAL DE RATAS MACHO  
JUVENILES CRIADAS CON SEPARACIÓN MATERNA**

TESIS

que para obtener el título de Bióloga presenta:

**Fabiola Sarahí Gutiérrez Figueroa**

Director:

Dr. Arturo Venebra Muñoz

Co-director:

Dr. Luis Ángel López Muciño

Toluca, Estado de México, febrero 2024.

# ÍNDICE

<b>1 ABREVIACIONES</b> .....	<b>4</b>
<b>2 RESUMEN</b> .....	<b>6</b>
<b>3 ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>4 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>10</b>
<b>5 ANTECEDENTES</b> .....	<b>13</b>
<b>5.1 Circuito social</b> .....	13
5.1.1 <i>Sistema de recompensa y red de comportamiento social</i> .....	13
5.1.2 <i>Sistema olfativo en el procesamiento de información social</i> .....	15
<b>5.2 Conductas sociales innatas</b> .....	17
5.2.1 <i>Fase de detección</i> .....	18
5.2.2 <i>Fase de acercamiento</i> .....	19
5.2.3 <i>Fase de investigación</i> .....	20
5.2.4 <i>Fase de consumación o acción</i> .....	21
5.2.5 <i>Socialización</i> .....	23
<b>5.3 Estrés</b> .....	24
5.3.1 <i>Estrés postnatal</i> .....	27
<b>5.4 Separación materna</b> .....	28
5.4.1 <i>Separación materna sobre la conducta social</i> .....	30
<b>5.5 Psicofarmacología de la nicotina</b> .....	33
5.5.1 <i>Farmacocinética y farmacodinamia de la nicotina</i> .....	33
5.5.2 <i>Receptores de acetilcolina (AChRs)</i> .....	34
5.5.3 <i>Receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR)</i> .....	34
5.5.4 <i>Mecanismo de acción y neurocircuito</i> .....	35
<b>5.6 Nicotina e interacción social</b> .....	38
<b>6 JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>41</b>
<b>7 HIPÓTESIS</b> .....	<b>42</b>
<b>8 OBJETIVOS</b> .....	<b>42</b>
<b>8.1 General:</b> .....	42
8.1.1 <i>Específicos:</i> .....	42
<b>9 MÉTODO</b> .....	<b>43</b>
<b>9.1 Animales, alojamiento y manipulación</b> .....	43
<b>9.1.1 Grupos</b> .....	43
9.1.2 <i>Registro de peso</i> .....	44
<b>9.2 Pruebas y estimulación</b> .....	44

9.2.1 <i>Separación materna</i> .....	44
9.2.2 <i>Área de prueba</i> .....	45
9.2.3 <i>Habitación del área de prueba</i> .....	45
9.2.4 <i>Prueba de investigación social</i> .....	46
<b>9.3 Dosis vehículo</b> .....	<b>46</b>
<b>9.4 Dosis de nicotina</b> .....	<b>46</b>
<b>9.5 Procedimiento para los grupos</b> .....	<b>47</b>
9.5.1 <i>Vehículo-Cuidado materno</i> .....	47
9.5.2 <i>Vehículo-Separación materna</i> .....	47
9.5.3 <i>Nicotina-Cuidado materno</i> .....	48
9.5.4 <i>Nicotina-Separación materna</i> .....	48
<b>9.6 Análisis de la conducta</b> .....	<b>49</b>
9.6.1 <i>Análisis estadístico</i> .....	49
<b>10 RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
<b>10.1 Peso</b> .....	51
<b>10.2 Investigación social</b> .....	52
<b>10.3 Exploración ambiental</b> .....	53
<b>10.4 Acercamientos</b> .....	54
<b>10.5 Acicalamiento</b> .....	55
<b>10.6 Latencia</b> .....	56
<b>10.7 Intento de traspaso</b> .....	57
<b>11 DISCUSIÓN</b> .....	<b>58</b>
<b>11.1 Peso</b> .....	58
<b>11.2 Investigación social</b> .....	59
<b>11.3 Exploración ambiental</b> .....	61
<b>11.4 Acercamientos</b> .....	62
<b>11.5 Acicalamiento</b> .....	63
<b>11.6 Latencia</b> .....	64
<b>11.7 Intento de traspaso</b> .....	64
<b>12 CONCLUSIÓN</b> .....	<b>66</b>
<b>13 REFERENCIAS</b> .....	<b>67</b>

# 1 ABREVIACIONES

- ACh** (*acetylcholine*): acetilcolina.
- AChE** (*acetylcholinesterase*): acetilcolinesterasa.
- AChRs** (*acetylcholine receptors*): receptores de acetilcolina.
- ACo** (*anterior cortical amygdala*): amígdala cortical anterior.
- AH** (*anterior hypothalamus*): hipotálamo anterior.
- AO** (*anterior olfactory nucleus*): núcleo olfatorio anterior.
- AOB** (*accessory olfactory bulb*): bulbo olfatorio accesorio.
- AVP** (*arginine vasopressin*): arginina vasopresina.
- BLA** (*basolateral amygdala*): amígdala basolateral.
- BNST** (*bed nucleus of the stria terminalis*): núcleo del lecho de la estría terminal.
- CA1** (*cornu Ammonis 1*): cuerno de Amón 1 del hipocampo.
- CeA** (*central amygdala*): amígdala central.
- CORT** (*serum corticosterone*): corticosterona sérica.
- CRH**: (*corticotropin-releasing hormone*): hormona liberadora de corticotropina.
- DRN** (*dorsal raphe nucleus*): núcleo dorsal del rafe.
- Ent** (*entorhinal cortex*): corteza entorrinal.
- GPCR** (*G protein coupled receptors*): receptores acoplados a proteínas G.
- GR** (*glucocorticoid receptor*): receptor de glucocorticoides.
- HIP**: (*hippocampus*): hipocampo.
- HPA**: (*Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis*): eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal.
- LS** (*lateral septum*): septum lateral.
- mAChRs** (*muscarinic acetylcholine receptors*): receptores muscarínicos de acetilcolina.
- MeA**: (*medial amygdala*): amígdala medial.
- MOB** (*main olfactory bulb*): bulbo olfatorio principal.
- MOE** (*main olfactory epithelium*): epitelio olfatorio principal.
- mPFC** (*medial prefrontal cortex*): corteza prefrontal medial.
- MR** (*mineralocorticoid receptor*): receptor de mineralocorticoides.
- NAc** (*nucleus accumbens*): núcleo accumbens.
- NAcCo** (*nucleus accumbens core*): núcleo accumbens core.
- NAcSh** (*nucleus accumbens shell*): núcleo accumbens shell.

**nAChRs** (*nicotinic acetylcholine receptors*): receptores nicotínicos de acetilcolina.

**OSN** (*olfactory sensory neurons*): neuronas sensoriales olfativas.

**PFC** (*prefrontal cortex*): corteza prefrontal o córtex prefrontal.

**POA** (*preoptic area*): área preóptica.

**PAG/CG** (*periaqueductal gray/central gray*): sustancia gris periacueductal/sustancia gris central.

**Pir** (*piriform cortex*): corteza piriforme.

**PVN** (*paraventricular nucleus of the hypothalamus*): núcleo paraventricular del hipotálamo.

**SHRP** (*stress-hyporesponsive period*): periodo de hiporespuesta al estrés.

**STR** (*striatum*): cuerpo estriado.

**TU** (*olfactory turbercle*): tubérculo olfatorio.

**VMH** (*ventromedial hypothalamus*): hipotálamo ventromedial.

**VNO** (*vomeronasal organ*): órgano vomeronasal.

**VP** (*ventral pallidum*): pálido ventral.

**VSN** (*vomeronasal sensory neurons*): neuronas sensoriales vomeronasales.

**VTA** (*ventral tegmental area*): área tegmental ventral.

## 2 RESUMEN

El cuidado materno es sumamente importante en los primeros días postnatales, pues disminuye la ansiedad, mejora la resiliencia al estrés en la vida adulta y favorece un correcto desarrollo neuronal. Por el contrario, se ha observado que la separación materna provoca alteraciones en el desarrollo de regiones involucradas en la cognición y funciones afectivas.

En un estudio previo se observó que crías de rata sometidas a separación materna en los primeros días de vida, pasan menor tiempo interactuando con individuos novedosos en la adultez, a comparación de aquellos sujetos que no son sometidos a separación materna, lo cual sugiere que la separación materna disminuye la motivación de socializar en la vida adulta.

Por otro lado, se ha observado que la nicotina produce un efecto ansiolítico, tanto en humanos como en animales la nicotina produce un efecto ansiolítico. De hecho, las personas que consumen cigarrillos de tabaco reportan un efecto calmante y disminución del estrés, así como la facilitación para socializar y, en algunos casos, una reducción de depresión. Así mismo, se ha observado que la nicotina administrada en ratas aumenta la interacción social en comparación de ratas con administración de un vehículo, el efecto de la nicotina sobre individuos que han sido sometidos a separación sólo ha sido reportado en protocolos que miden aprendizaje y memoria, y en los síntomas de algunos trastornos psiquiátricos ocasionados por la separación materna. En otras palabras, aún no hay estudios que exploren el efecto de la nicotina sobre la interacción social en individuos sometidos a separación materna.

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la nicotina sobre la conducta social de ratas Wistar criadas con separación materna ante un sujeto novedoso. En este sentido, ratas macho de la cepa Wistar fueron sometidas a separación materna por 4 horas diarias (9:00 hrs -13:00 hrs), desde el día postnatal (DPN) 1 hasta el 21. Posteriormente en el DPN 53 se les administró nicotina (0.0075 mg/kg, vía intraperitoneal) o un vehículo (1 ml/kg, vía intraperitoneal) y se realizó una prueba de novedad social.

El grupo sometido a separación materna y administración de nicotina presentó diferencias significativas con respecto a su grupo control. Es decir, invirtió más tiempo investigando al

individuo novedoso, acicalándose, tuvo un mayor número de acercamientos, un menor tiempo de latencia en el primer acercamiento y también un menor tiempo explorando el área de prueba.

Esto sugiere que la nicotina puede mejorar aspectos de la conducta social en individuos con alteraciones inducidas por la separación materna.

### 3 ABSTRACT

Maternal care is extremely important in the first postnatal days, as it reduces anxiety, improves resilience to stress in adult life and promotes correct neuronal development. On the contrary, it has been observed that maternal separation causes alterations in the development of regions involved in cognition and affective functions.

In a previous study, it was observed that rat pups subjected to maternal separation in the first days of life spend less time interacting with novel individuals in adulthood, compared to those subjects who are not subjected to maternal separation, which suggests that maternal separation decreases the motivation to socialize in adult life.

On the other hand, it has been observed that nicotine produces an anxiolytic effect in both humans and animals. In fact, people who consume tobacco cigarettes report a calming effect and decreased stress, as well as facilitation in socializing and, in some cases, a reduction in depression. Likewise, it has been observed that nicotine administered to rats increases social interaction compared to rats administered a vehicle. The effect of nicotine on individuals who have been subjected to separation has only been reported in protocols that measure learning and memory, and in the symptoms of some psychiatric disorders caused by maternal separation. In other words, there are still no studies that explore the effect of nicotine on social interaction in individuals undergoing maternal separation.

The objective of the study was to evaluate the effect of nicotine on the social behavior of Wistar rats raised with maternal separation in front of a novel subject. In this sense, male rats of the Wistar strain were subjected to maternal separation for 4 hours daily (9:00 hrs - 13:00 hrs), from postnatal day (PND) 1 to 21. Subsequently, on PND 53, they were administered nicotine (0.0075 mg/kg, intraperitoneally) or a vehicle (1 ml/kg, intraperitoneally) and a social novelty test was performed.

The group subjected to maternal separation and nicotine administration presented significant differences with respect to their control group. That is, he spent more time investigating the novel individual, grooming himself, had a greater number of approaches, a shorter latency time in the first approach, and also less time exploring the test area.

This suggests that nicotine can improve aspects of social behavior in individuals with alterations induced by maternal separation.

## 4 INTRODUCCIÓN

Existe evidencia de que la temprana exposición a un entorno adverso y situaciones de estrés en los primeros años de vida puede aumentar la vulnerabilidad de padecer trastornos psicopatológicos y el abuso de sustancias en la vida adulta (Čater y Majdič, 2021). Por lo que se afirma que el cuidado materno es de suma importancia para un correcto desarrollo cerebral (Champagne *et al.*, 2003).

Se ha observado que la separación materna (SM) afecta el desarrollo postnatal del cerebro en regiones involucradas en la cognición, conducta, funciones afectivas, y aquellas involucradas en la expresión de respuestas endocrinas al estrés (Becker *et al.*, 2006; Čater y Majdič, 2021). De manera similar, a nivel conductual puede causar trastornos del estado de ánimo, problemas de ansiedad (Aisa *et al.*, 2007; Becker *et al.*, 2006), depresión y anhedonia (Marais *et al.*, 2008; Houwing, 2019) e incluso causar déficits en la memoria y aprendizaje (Aisa *et al.*, 2007). Adicionalmente, aumenta las conductas agresivas en los juegos de pelea en ratas macho en la vida adulta (Veneema y Neumann, 2009); y disminuye el tiempo de interacción social ante un individuo novedoso (Kambali *et al.*, 2019; Mejía-Chávez *et al.*, 2021).

Los períodos prolongados de separación materna influyen en el desarrollo de respuestas del eje hipotalámico-pituitario-suprarrenal (HPA), principalmente en los DPN 1-14 que es donde se lleva a cabo un período de hiporrespuesta al estrés (SHRP), provocando alteraciones en las respuestas del HPA al estrés en la vida adulta y en la maduración cerebral. De ahí que durante los primeros días postnatales sean tan importantes conductas maternas como el acicalamiento y el lamido para disminuir los niveles de corticoides en la circulación. Así mismo, se ha reportado que un alto cuidado materno en las primeras etapas de vida fomenta un comportamiento empático en ratas en la edad adulta (Liu *et al.*, 2000; Asadi *et al.*, 2021).

A nivel cerebral la SM disminuye la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en la corteza prefrontal medial (mPFC), en el núcleo accumbens (NAc) y en la región CA1 del hipocampo; también provoca cambios en la densidad dendrítica y número de espinas dendríticas en la amígdala y la mPFC, lo cual puede estar relacionado con trastornos mentales (Wang *et al.*, 2015). Así mismo, se ha reportado un aumento en el número de neuronas inmunorreactivas a c-Fos en el sistema dopaminérgico y núcleos hipotalámicos (paraventricular y supraóptico) ante la novedad social (Gómez-Gómez *et al.*, 2019). En cambio,

la SM disminuye los niveles de c-Fos en regiones cerebrales involucradas en la conducta social y sistema de recompensa como la mPFC, NAc, núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), septum lateral (LS), amígdala medial (MeA), y amígdala basolateral (BLA) lo cual se puede ver reflejado en la aparición de trastornos del comportamiento más adelante (Mejía-Chávez *et al.*, 2021).

Por otro lado, estudios con ratas, han reportado que la nicotina (0.05, 0.1 y 0.25 mg/kg) produce un efecto ansiolítico y aumenta el tiempo de interacción social (Cheeta *et al.*, 2021); e incluso, la mayoría de las personas fumadoras y con adicción, afirman tener un efecto reductor de ansiedad (Irvine *et al.*, 2001). Estudios en humanos han informado un efecto antidepresivo al consumir nicotina (Ferguson *et al.*, 2000; McClernon *et al.*, 2006); además, el consumo es mayor en personas con depresión o trastornos neuropsiquiátricos (Glassman, 1993; Quattrocki *et al.*, 2000). De manera similar, los modelos murinos han reportado que la nicotina puede actuar como un antidepresivo debido a la estimulación de receptores nicotínicos (Semba *et al.*, 1998; Tizabi *et al.*, 2010).

No obstante, en pruebas de interacción social, la nicotina puede tener un efecto ansiolítico o ansiogénico dosis-dependiente, en donde se presente un efecto ansiolítico a dosis bajas a comparación de dosis altas; así como del tiempo entre la inyección y la prueba (File *et al.*, 1998; Irvine *et al.*, 1999). De la misma forma, se ha observado que el estrés por aislamiento social aumenta la sensibilidad de los efectos ansiolíticos y ansiogénicos de la nicotina (Cheeta *et al.*, 2001), el efecto ansiolítico está mediado por el núcleo dorsal del rafe (DRN), mientras que los efectos ansiogénicos por el hipocampo dorsal y el LS (File *et al.*, 2000; Cheeta *et al.*, 2001). Adicionalmente, se ha encontrado que la nicotina mejora la cognición como las funciones motoras finas, la atención, memoria de trabajo y episódica, por lo que se inicia y mantiene su consumo en personas con déficits cognitivos o trastornos psiquiátricos primarios (Valentine y Sofuoglu, 2018).

En este sentido, es posible que las deficiencias en el cuidado materno estén vinculadas a un incremento en el consumo de nicotina dados sus efectos sobre la conducta. Datos reportados por la ENCODAT 2016-2017 muestran que el 19.9% de la población adulta (18-65 años) del Estado de México fuma tabaco y el 6.7% fuma en promedio 7.4 cigarros al día. Además, la encuesta nacional de adicciones en 2011 reportó que en México las personas fumadoras activas inician su consumo promedio de nicotina entre la adolescencia (14.1 años) y su etapa juvenil

(20.4 años), principalmente en lugares sociales como bares, cantinas, discotecas, el hogar o en lugares donde se puede llegar a sentir estrés o ansiedad como la escuela y el trabajo (Barrera-Núñez, 2023). Por otra parte, ENSANUT 2021 reportó que el 15% de niños menores de cinco años recibieron cuidado inadecuado durante la última semana, porque los dejaron solos o al cuidado de otra niña (o) menor de 10 años.

No obstante, el consumo de nicotina puede conducir a una serie de consecuencias perjudiciales para la salud pues, aunque la nicotina es la sustancia adictiva del tabaco, al menos 69 sustancias químicas del humo del tabaco son cancerígenas (NIDA, 2021). De ahí que el consumo de tabaco esté asociado con cáncer de pulmón, pues el 80% -90% de los casos son provocados por el tabaquismo. Así mismo, el consumo de tabaco ha sido asociado con otros tipos de cáncer como el de boca, faringe, laringe, esófago, estómago, páncreas, cuello uterino, riñón y vejiga, mieloides agudos, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), bronquitis crónica y enfisema (NIDA, 2021).

Por consiguiente, los resultados de este trabajo pueden ayudar a comprender la influencia del ambiente temprano en el funcionamiento del cerebro en edades posteriores y su importancia en el desarrollo de los circuitos cerebrales. Además, aportará datos a una posible explicación en la relación entre las relaciones maternas pobres o negligentes y la aparición de enfermedades neuropsiquiátricas como la depresión, ansiedad, agresión impulsiva, conductas antisociales y adicciones. Y, en etapas posteriores, contribuir al desarrollo de políticas sociales y estrategias para reducir el consumo de drogas y mejorar el bienestar social, conductual, psicológico y fisiológico; mediante intervenciones focalizadas en la identificación y prevención en grupos con alta vulnerabilidad a través de la investigación científica.

Por lo que ahora, se pretende investigar los efectos de la nicotina sobre los déficits sociales causados por la separación materna en ratas macho juveniles sometidas a separación materna (SM) durante un encuentro social novedoso.

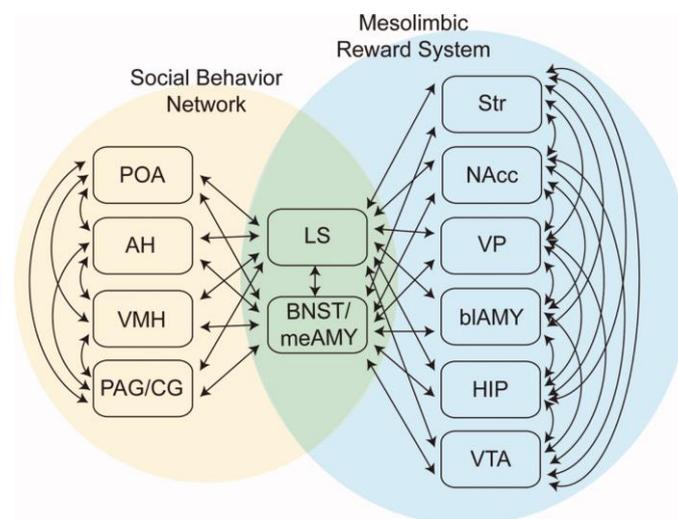
## 5 ANTECEDENTES

### 5.1 Circuito social

Todas las especies expresan comportamientos sociales innatos, atribuidos a circuitos neuronales programados durante el desarrollo. Algunos de estos comportamientos son el apareamiento, lucha y crianza, necesarios para la supervivencia de cualquier especie. Sin embargo, pueden variar según el estado reproductivo, las experiencias sociales o factores internos y externos. Es por esta flexibilidad que solamente se realizan estos comportamientos en el momento y objetivo correcto, minimizando así el costo y riesgo asociado conductual (Wei *et al.*, 2021).

#### 5.1.1 Sistema de recompensa y red de comportamiento social

Neuman (1999) describió el comportamiento social como una “red de comportamiento social” que engloba múltiples conductas sociales. El sistema de recompensa mesolímbico (sistema dopaminérgico del mesencéfalo, entre otros) y la red de comportamiento social (SBN “Social Behavior Network”) son circuitos neuronales que evalúan la importancia de estímulos y regulan el comportamiento social en mamíferos (Deco y Rolls, 2005; Wickens *et al.*, 2007). Esta red de comportamiento social está formada principalmente por regiones telencefálicas y proyecciones dopaminérgicas del VTA del mesencéfalo (*Figura 1*) (Goodson *et al.*, 2005).



*Figura 1.* Nodos que conectan la red de comportamiento social y el sistema de recompensa mesolímbico. Se muestran las regiones involucradas en la red de comportamiento social (izquierda) y el sistema de recompensa mesolímbico (derecha) y las regiones involucradas en ambos sistemas (centro). Las flechas indican las conexiones anatómicas entre las dos regiones.

Hipotálamo anterior (AH); amígdala basolateral (blAMY)/(BLA); núcleo del lecho de la estría terminal/amígdala medial (BNST/meAMY)/(BNST/MeA); hipocampo (HIP); tabique lateral (LS); núcleo accumbens (NAcc)/(NAc); gris periacueductal/gris central (PAG/CG); área preóptica (POA); cuerpo estriado (Str); hipotálamo ventromedial (VMH); pálido ventral (VP); área tegmental ventral (VTA). Tomado de O'Connel y Hoffman (2011).

El sistema de recompensa mesolímbico y la SBN en conjunto forman una red de toma de decisiones sociales (SDM "Social Decision-Making"). Esta red desarrolla las respuestas a estímulos sociales como no sociales, y, refuerzan las respuestas a estímulos sociales como la reproducción, el cuidar la descendencia o ganar una pelea (*Tabla 1*) (Goodson y Kabelik, 2009). Ambos sistemas (mesolímbico y SBN) están unidos anatómicamente por conexiones bidireccionales entre diversas áreas del cerebro, así como por los nodos compartidos entre LS y BNST. De esta manera, ambos circuitos se complementan y regulan los procesos de evaluación de la relevancia de los estímulos y el resultado conductual (O'Connel y Hoffman, 2011).

El sistema de recompensa mesolímbico se encarga de evaluar la importancia de un estímulo ambiental para generar la respuesta conductual adecuada, para la correcta ejecución de este sistema es de vital importancia es la inervación dopaminérgica del NAc que se origina en el VTA. El sistema de recompensa convencional también incluye BLA, LS, VP, striatum (STR), HIP y BNST y en la mayoría de los mamíferos también la PFC (Cardinal *et al.*, 2002; Wickens *et al.*, 2007).

Y, por otro lado, los nodos centrales del SBN están involucrados en múltiples comportamientos sociales y contienen receptores de hormonas esteroides sexuales, cada una de las regiones del SBN son importantes en la regulación del comportamiento reproductivo entre los que se encuentran el comportamiento sexual típico masculino y femenino y el cuidado parental, así como para el control de las conductas agresivas. No obstante, el comportamiento sexual masculino está mediado principalmente por la región POA, en tanto que el femenino por el VMH (Newman, 1999).

En suma, el sistema de recompensa mesolímbico y el SBN, trabajando en conjunto, regulan el comportamiento. La información fluye fácilmente entre ambos sistemas por medio de dos nodos compartidos: el LS y el BNST. Estas dos regiones desempeñan un papel fundamental en

el comportamiento social y en el procesamiento de recompensas. Además, median la información que proviene de estímulos sociales, como la manifestación de agresión hacia un intruso o el despliegue de la conducta sexual hacia una potencial pareja (O’Connel y Hoffman, 2011).

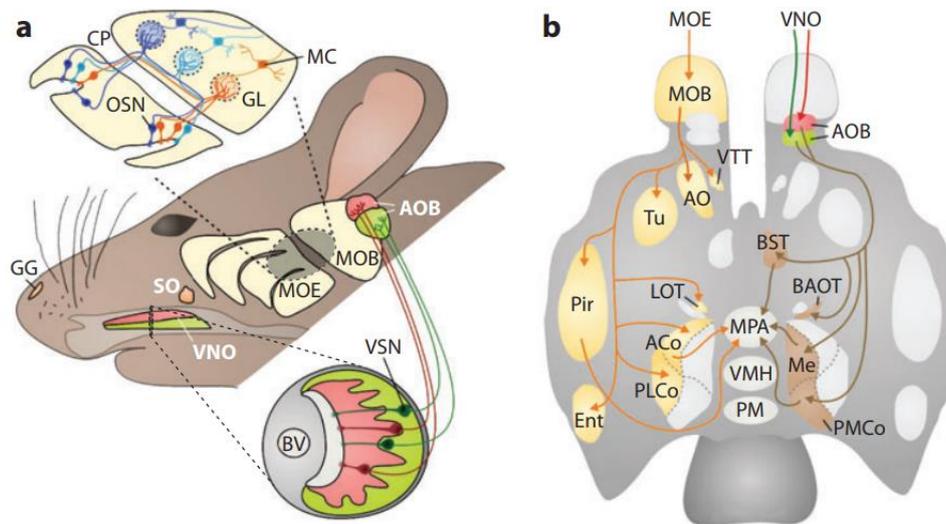
*Tabla 1.* Regiones del cerebro involucradas en el comportamiento social y sus funciones. Modificado de O’Connel y Hoffman, (2011).

<b>Región</b>	<b>Función</b>
AH	agresión, reproducción, cuidado parental
BLA	agresión, cuidado parental
BNST	motivación, cuidado parental, reproducción, respuesta al estrés
HIP	aprendizaje espacial
LS	aprendizaje emocional, afiliación/reconocimiento social, reproducción, cuidado parental
MeA	agresión, reproducción, cuidado parental, reconocimiento social
NAc	aprendizaje emocional, impulsividad, motivación, cuidado parental
PAG/CG	reproducción, vocalización
POA	agresión, reproducción, cuidado parental
STR	comportamiento compulsivo
VMH	agresión, reproducción, cuidado parental
VP	aprendizaje emocional, cuidado parental
VTA	motivación, reproducción, cuidado parental

### 5.1.2 Sistema olfativo en el procesamiento de información social

El sistema olfativo es el encargado de detectar y procesar información, este detecta sustancias químicas volátiles y las almacena en la corteza cerebral para poder recordarlas, está formado principalmente por MOE y VNO (Shepard, 2006; Kobayakawa *et al.*, 2007). Primero, las

moléculas volátiles se detectan por el MOE que posteriormente se unen a GPCR que se encuentran en los cilios de las OSN, las cuales proyectan sus axones al MOB, este tiene células mitrales que extienden sus axones a través del tracto olfatorio lateral hasta regiones centrales cerebrales como al AO, ACo, Tu, Pir, Ent (*Figura 2*) (Baum y Kelliher, 2009).



*Figura 2.* Vías de proyección de MOE y VNO. a) Las OSN en el MOE se proyectan a través de la placa cribiforme (CP) hasta los glomérulos (GL) del MOB. OSN (morado, azul y naranja) que expresan los mismos receptores convergen en un solo glomérulo en el MOB. Células mitrales (MC) del MOB extienden una dendrita apical hacia el GL contiguo y extienden los axones hasta el prosencéfalo. Las neuronas sensoriales vomeronasales (VSN) extienden los axones desde el VNO hasta el bulbo olfatorio accesorio (AOB). VSN en la zona apical del VNO (rojo, izquierda) proyectan al AOB rostral; VSN en la zona basal del VNO (verde, derecha) proyectan al AOB caudal. Vaso sanguíneo (BV); ganglio de Brueneberg (GG); órgano septal (SO). b) Vías de proyección al prosencéfalo del MOB (naranja, izquierda) y el AOB (marrón, derecha) al cerebro anterior. Venia tectal ventral (VTV); núcleo olfatorio anterior (AO); tubérculo olfatorio (Tu); corteza piriforme (Pir); corteza entorrinal (Ent); núcleo del tracto olfatorio lateral (LOTE); amígdala cortical anterior (ACo); amígdala cortical posterolateral (PLCo); núcleo cama de la estría terminal (BST); núcleo del lecho del tracto olfatorio accesorio (BAOT); amígdala medial (Me)/(MeA); amígdala cortical posteromedial (PMCo); área preóptica medial (MPA); hipotálamo ventromedial (VMH); núcleo premamilar (PM). Tomado de Baum y Kelliher (2009).

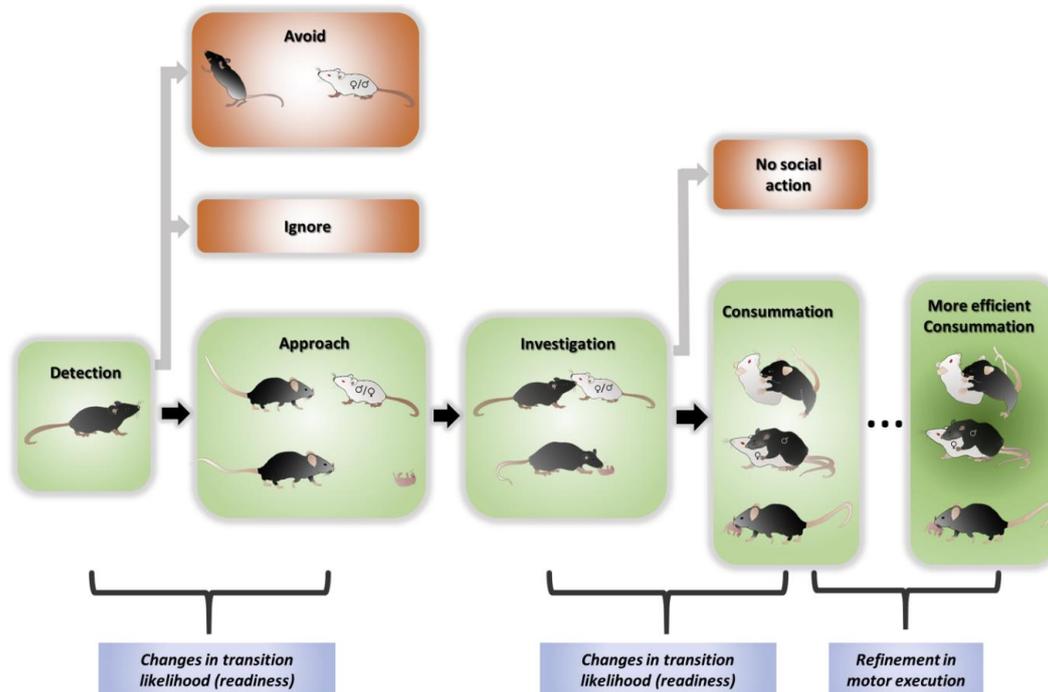
Los olores que son detectados por MOE activan circuitos implicados en procesos corticales y límbicos, y se ha descubierto que las OSN del MOE en murinos no solo detectan olores volátiles del aire, sino también detectan pequeños ligandos peptídicos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), no volátiles que pueden producir cambios en el comportamiento (Spehr *et al.*, 2006).

Los olores emitidos como las feromonas se disuelven en la mucosa nasal y llegan al VNO y se unen al GPCR ubicados en las VSN, estas extienden sus axones hasta el AOB, después las células mitrales del AOB envía sus axones al amígdala vomeronasal y está envía proyecciones a diversos núcleos hipotalámicos directamente o a través de BST (Meredith *et al.*, 1980; Kevetter y Winans *et al.*, 1981) Las interacción entre la amígdala medial y sus proyecciones al VMH son importantes en la regulación de comportamientos reproductivos y de defensa (Choi *et al.*, 2005).

## **5.2 Conductas sociales innatas**

Los comportamientos sociales instintivos, como la reproducción, defensa de territorio o recursos y el cuidado parental, pueden iniciarse sin ser enseñados y son controlados por circuitos neuronales programados durante el desarrollo (Kappeler *et al.*, 2013). Los comportamientos innatos inician con una fase apetitiva que comprende la detección y el acercamiento (o distanciamiento) al estímulo social, esta fase también implica la investigación y exploración del estímulo social (Hashikawa *et al.*, 2016).

Por lo tanto, los comportamientos innatos se dividen en cuatro fases que son detección, acercamiento, investigación, consumación o acción (*Figura 3*) (Wei *et al.*, 2021).



*Figura 3.* Las cuatro fases de las conductas sociales innatas. Las cuatro fases (detección, abordaje, investigación y consumación) se muestran en color verde. Para pasar de la detección al acercamiento y de la investigación a la consumación depende de la experiencia del animal, así como de su estado interno y los factores externos. Tomado de Wei *et al.*, (2021).

### 5.2.1 Fase de detección

Se identifica la presencia y ubicación de un objetivo social, principalmente por medio del olfato. Los roedores detectan señales químicas olfateando las secreciones vaginales de las hembras o marcas de orina de los machos. De igual manera, los roedores pueden localizar un objetivo social por medio de la emisión de vocalizaciones ultrasónicas. Las crías, por ejemplo, emiten estas vocalizaciones cuando están lejos de su madre (*Figura 4*) (Hofer *et al.*, 2002).

Los roedores al detectar señales olfativas específicas manifiestan acciones que les permiten determinar la ubicación de la fuente antes de acercarse o alejarse. Estas acciones incluyen la disminución de velocidad, movimientos rítmicos con la nariz, el movimiento de bigotes y cabeza, a la vez que se modifica la orientación del organismo (Kurnikova *et al.*, 2017). Estos movimientos son generados por el complejo pre-Botzinger (preBotC) y, el generador respiratorio central. En pocas palabras, las señales de olor llegan al preBotC, se acelera la respiración y se generan micro movimientos coordinados (Feldman y Kam, 2015; Deschênes *et al.*, 2016).



Las neuronas dopaminérgicas del VTA se proyectan hacia el NAc, modulando la transmisión sináptica de las neuronas espinosas mediales del cuerpo estriado (MSN), la cual provoca un aumento en la actividad durante el comportamiento y facilita el acercamiento (Tritsch y Sabatini, 2012; Gunaydin *et al.*, 2014). Posteriormente, el NAc se conecta al sistema motor a través de su eferente GABAérgico hacia el VP. Luego, el VP se proyecta hacia la salida motora del tronco encefálico, teniendo objetivos como el tegmento pedunculopontino (PPT), la sustancia nigra (SN) y el núcleo subtalámico (STN), que provoca y dirige la locomoción (*figura 4*) (Smith *et al.*, 2009; Richard *et al.*, 2016).

Regiones de la vía olfativa como el núcleo olfatorio anterior (AON) y Pir proporcionan información al NAc. Estas regiones son importantes para el reconocimiento y discriminación de olores (Smith *et al.*, 2009). Otra región importante es el OT que recibe proyecciones del lado ventral del MOB y se proyecta hacia el VP, formando un circuito hacia el NAc, provocando un enfoque social basado en entradas olfativas específicas (Martel y Baum, 2007; Wesson y Wilson, 2011).

De igual manera, las vocalizaciones ultrasónicas prosociales (USV) activan neuronas del NAc y aumentan los niveles de dopamina en esa región cerebral. Esto se lleva a cabo por medio de la BLA, que recibe entradas auditivas y las proyecta hacia el NAc. Se ha observado, por medio de registros electrofisiológicos que la mayoría de las células de la BLA responde a las USV (Sadananda *et al.*, 2008; Parsana *et al.*, 2012; Willuhn *et al.*, 2014), destacando la importancia de la interacción entre estas dos regiones en la regulación de respuestas sociales y la función del sistema de recompensa.

### 5.2.3 Fase de investigación

La fase de investigación consiste en una completa exploración del estímulo social para obtener información del congénere y, con esa información, pasar a una fase consumatoria o gratificante. De manera interesante, la mayoría de la investigación en esta fase se realiza por medio del olfato (Kepecs *et al.*, 2006). En roedores, el olfato suele enfocarse en zonas faciales y anogenitales para detectar feromonas, además la acción de olfatear puede indicar el estatus social de los dos animales (Liberles, 2014).

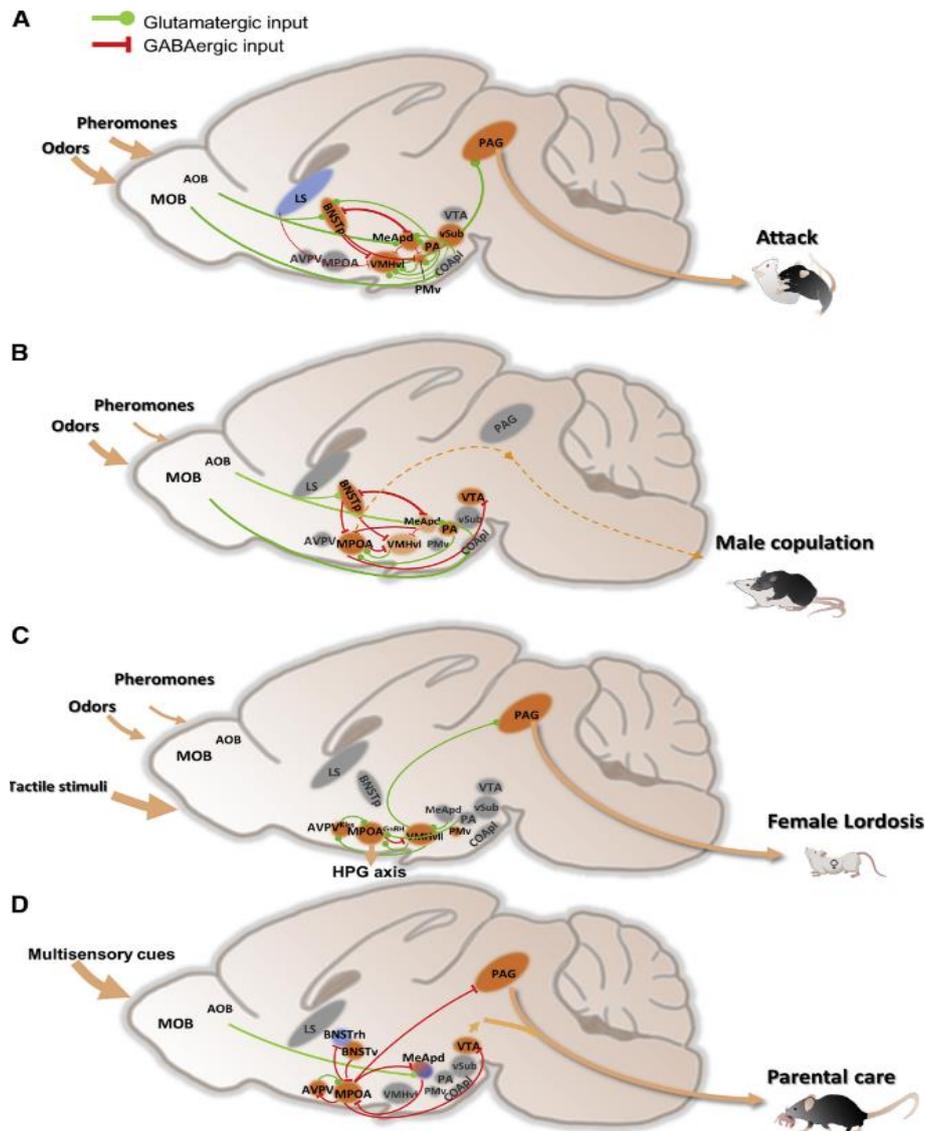
Cuando un individuo tiene un contacto nasal con otro congénere se dirigen las feromonas no volátiles al VNO. Luego se unen a receptores específicos en las VSN, para después pasar la información al AOB, que a su vez se proyecta a la MeA, al BNST, y la amígdala cortical posteromedial (CoApm). Después, la información de las feromonas se envía a núcleos hipotalámicos mediales, los cuales generan comportamientos sociales como la agresión, conducta sexual y cuidado parental (Spehr *et al.*, 2006).

El VNO tiene la capacidad de acumular señales sensoriales. En otras palabras, cada episodio de olfateo aumenta la concentración de feromonas en el VNO, activando así más VSN y regiones posteriores. Esta información transmitida por el VNO ayuda a identificar de manera precisa un objetivo social. (Pankevich *et al.*, 2006; He *et al.*, 2010). Se ha observado que el VNO es esencial para el inicio de una respuesta agresiva, ya que el bloqueo o alteración genética del VNO suprimen el comportamiento agresivo tanto en ratones macho como hembras (Chamero *et al.*, 2011).

Durante la investigación social las señales olfativas también son detectadas por el MOE. Posteriormente, estas señales pasan a través del MOB y convergen con las entradas vomeronasales en las células de la MeA, ya sea de manera directa o a través de la amígdala cortical posterolateral (CoApl). De igual modo, la desactivación genética o química de las células MOE elimina el comportamiento agresivo en ambos sexos y el comportamiento sexual en machos (Wang *et al.*, 2006; Martínez-Marcos, 2009).

#### 5.2.4 Fase de consumación o acción

En esta fase puede haber diversos comportamientos sociales como la agresión, reproducción y comportamiento parental (*Figura 5*) (Wei *et al.*, 2021). El hipotálamo medial posee las células promotoras del comportamiento social, y el bloqueo de la actividad de esta región perjudica esos comportamientos (Sternson, 2013).



*Figura 5.* Esquemas de los circuitos neuronales de comportamientos sociales. (A) Circuito de agresión, (B) Circuito de conducta sexual masculina, (C) Circuito de conducta sexual femenina, (D) Circuito de atención parental. Las regiones azules suprimen el comportamiento, mientras que las regiones naranjas lo promueven. El naranja claro marca regiones que desempeñan papeles menores en el comportamiento. Las regiones grises no son esenciales para los comportamientos o aún no han sido estudiadas. Bulbo olfatorio accesorio (AOB); núcleo periventricular anteroventral (AVPV); parte posterior del núcleo del lecho de la estría terminal (BNSTp); núcleo romboide del núcleo del lecho de la estría terminal (BNSTRh); parte ventral del núcleo del lecho de la estría terminal (BNSTv); amígdala cortical posterolateral (CoApI); tabique lateral (LS); amígdala medial (MeA); área preóptica medial (MPOA); amígdala posterior (PA); gris periacueductal (PAG); núcleo premamilar ventral (PMv); parte ventrolateral del hipotálamo ventromedial (VMHvI); subdivisión lateral de VMHvI (VMHvII); subículo ventral (vSUB); área tegmental ventral (VTA). Tomado de Wei *et al.*, 2021.

Por otro lado, existen dos núcleos hipotalámicos, con células casi exclusivamente glutamatérgicas, claves para generar el comportamiento agresivo y ataques. Estos núcleos comprenden la parte ventrolateral del hipotálamo ventromedial (VMHvl) y el núcleo premamilar ventral (PMv) (*Figura 5 A*) (Lin *et al.*, 2011). De manera similar, la región clave para la conducta sexual masculina es el área preóptica medial (MPOA) y, para la femenina, el VMHvl (*figura 5 B y C*) (Hull y Domínguez, 2007; Micevych y Meisel, 2017). A su vez, el área más relevante para el cuidado parental es el MPOA ya que media el aseo de las crías y la recuperación de crías (*Figura 5 D*) (Numan, 2006).

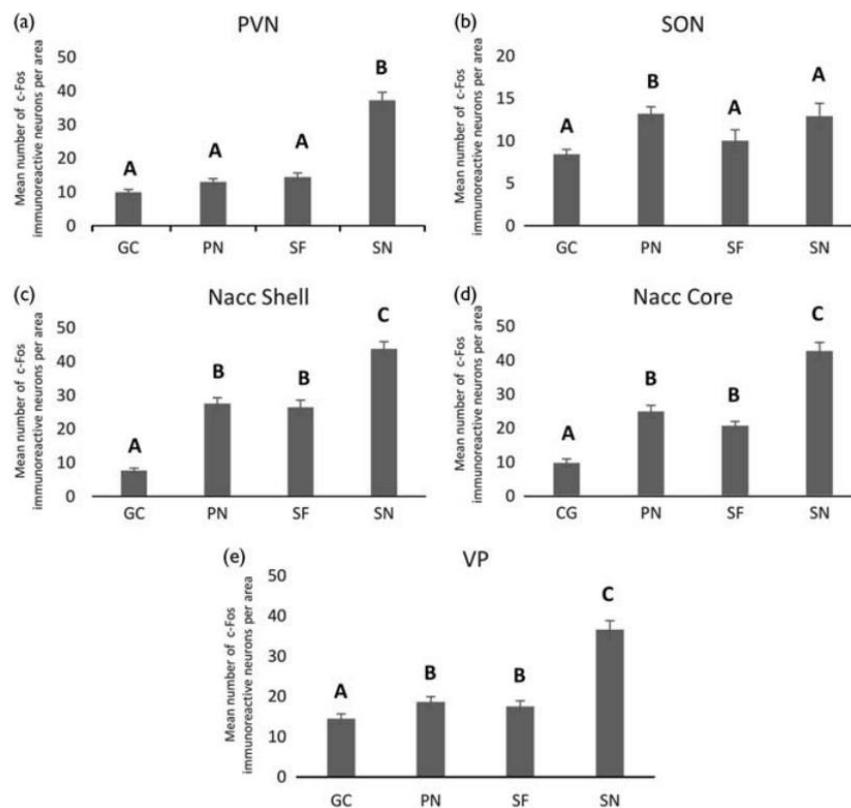
### 5.2.5 Socialización

Las interacciones sociales son importantes para animales y humanos, porque ayudan a mantener un bienestar emocional y el correcto desarrollo de capacidades físicas, cognitivas y sociales. Por lo tanto, la privación de conductas sociales, como el juego social en mamíferos jóvenes, puede provocar alteraciones en la capacidad para afrontar situaciones sociales (Von Frijtag *et al.*, 2002).

Los neurotransmisores encargados de modular el juego social son los opioides, cannabinoides, oxitocina, serotonina y principalmente la dopamina (Trezza *et al.*, 2010). Se ha reportado que durante el juego social aumenta la dopamina, y la administración de antagonistas de dopamina disminuye el juego social, por lo que es importante en los procesos de recompensa (Berridge, 2007).

Estudios han reportado que el NAc es una región que participa en los procesos de recompensa y motivación. Junto con la VTA, la corteza frontal y la amígdala, esta región regula las respuestas positivas del comportamiento de juego social en ratas. El control de estas conductas se realiza mediante conexiones gabaérgicas y glutamatérgicas entre estas regiones mesolímbicas (Ikemoto y Wise, 2004; van Kerkhof *et al.*, 2013). También, se ha observado una mayor actividad en el sistema dopaminérgico mesolímbico durante las interacciones sociales. Por el contrario, se ha sugerido que una deficiente señalización de dopamina se podría traducirse en déficits en el procesamiento de recompensas sociales (Gunaydin y Deisseroth, 2014).

Las pruebas de novedad social han demostrado que el interés por interactuar con individuos nuevos es mayor y más gratificante en animales juveniles que en animales adultos (Smith *et al.*, 2015). Un estudio realizado por Gómez-Gómez *et al.*, (2019) reportó que ratas juveniles muestran un mayor número de células inmunorreactivas a c-Fos en regiones cerebrales pertenecientes al sistema de recompensa (p. ej., PVN) al interactuar con un individuo novedoso, a comparación de un individuo familiar o un objeto. Basados en estos hallazgos, los autores propusieron que la novedad social podría ser un estímulo altamente gratificante en individuos juveniles (*Figura 6*) (Gómez-Gómez *et al.*, 2019).



*Figura 6.* Promedio de neuronas inmunorreactivas a c-Fos. el núcleo paraventricular (PVN), núcleo supraóptico (SON), núcleo accumbens shell y core (Nacc Shell y Nacc Core) y pálido ventral (VP) de ratas expuestas a diferentes estímulos: grupo control (GC), novedad ambiental (PN), familiaridad social (SF) y novedad social (SN). Las letras (A, B, C) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos. Tomada de Gómez-Gómez *et al.* (2019).

### 5.3 Estrés

La respuesta al estrés es una de las funciones más importantes en todas las especies, representando un proceso controlado que involucra tanto regiones cerebrales corticales y como

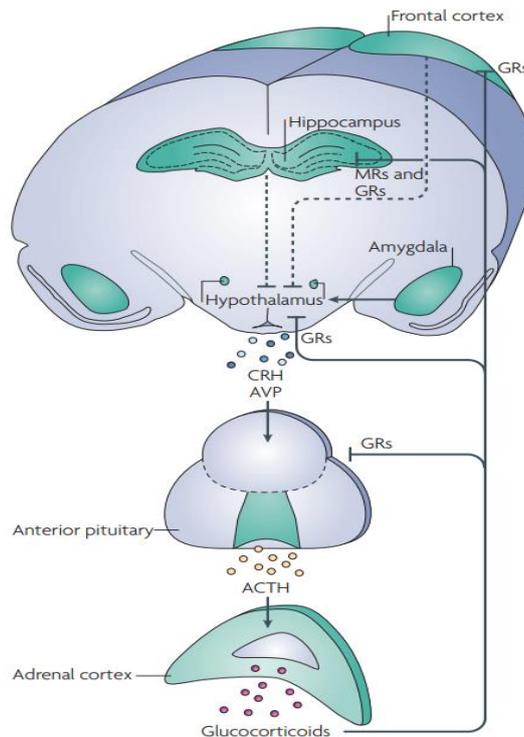
subcorticales. En conjunto, estas regiones producen respuestas de lucha o huida (fight or flight) para promover el bienestar y la supervivencia (Silveira *et al.*, 2018).

Seymour Levine propuso que el estrés es una situación que consta de diversos componentes. El primero de ellos es la entrada, momento en que se percibe y se evalúa el factor estresante; el segundo es el procesamiento de la información estresante, y; el último es la respuesta de salida o estrés. Estos tres componentes interactúan para restaurar la homeostasis a través de adaptaciones fisiológicas y de comportamiento (Levine, 2005).

Un componente esencial para que un individuo pueda afrontar el estrés es el eje HPA. La activación de este eje garantiza una respuesta conductual adecuada al factor estresante. Así, ante un factor estresante, el PVN secreta la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la arginina vasopresina (AVP). Posteriormente, estas activan la hipófisis anterior e inducen la secreción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH). A su vez, la ACTH activa la corteza suprarrenal y libera corticosteroides como el cortisol (humanos) y corticosterona (CORT) en roedores, productos finales del eje HPA (*Figura 7*) (Nishi, 2020).

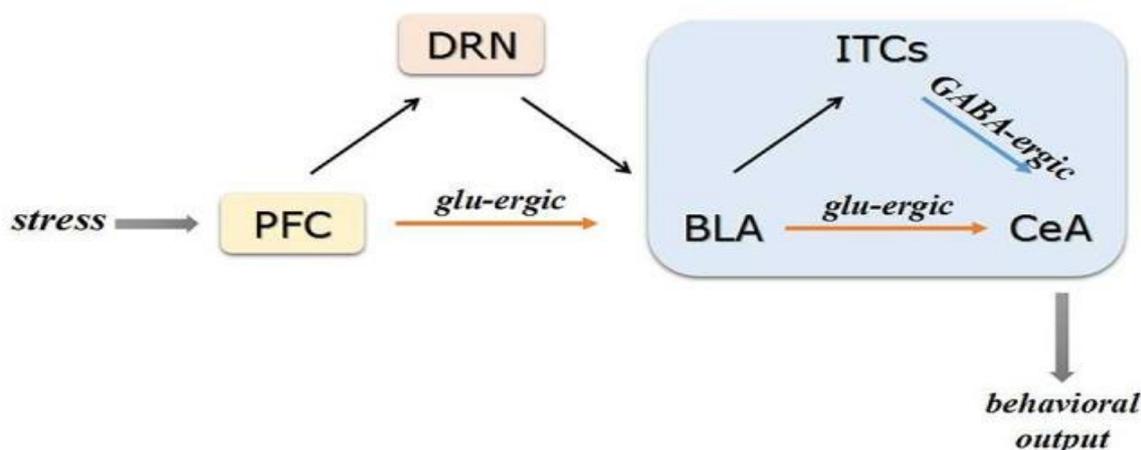
El cerebro detecta una amenaza por medio de componentes del sistema autónomo, neuroendocrino, inmunológico y metabólico. Estos componentes no solo afectan la función del HPA, sino que también son afectados por la actividad del HPA. Además, están implicados en cambios fisiopatológicos provocados por estrés crónico, desde experiencias en la vida temprana hasta la vida adulta (Lupin *et al.*, 2015).

La actividad del eje HPA está regulada por regiones mesolímbicas como el hipocampo, amígdala y CPF. En este caso, hipocampo se encarga de traducir las señales neuronales de estrés y actúa como inhibidor de la actividad basal del HPA y de la terminación de respuesta al estrés a través de sus altas concentraciones de MR y GR. Por su parte, el PVN recibe y coordina la información neuroendocrina, autónoma, cognitiva y emocional; en otras palabras, es el responsable de iniciar la secreción de glucocorticoides (CRH y AVP) (Phillips *et al.*, 2006).



*Figura 7.* Sistema del estrés. Las neuronas parvocelulares de la región medial del PVN liberan CRH y AVP, posteriormente se secreta ACTH de la glándula pituitaria para la producción de glucocorticoides en la corteza suprarrenal. La médula suprarrenal libera catecolaminas (adrenalina y noradrenalina). La capacidad de respuesta del eje HPA al estrés está determinada en parte por la capacidad de los glucocorticoides para regular la liberación de ACTH y CRH mediante la unión a dos receptores de corticosteroides, el GR (receptor de glucocorticoides) y MR (receptor de mineralocorticoides). La amígdala participa en el procesamiento del miedo y activa el eje HPA para provocar la respuesta al estrés necesaria para afrontar el desafío. Después de la activación del sistema, y una vez que el estresante percibido ha disminuido, se activan bucles de retroalimentación en varios niveles del sistema como la amígdala, hipocampo y corteza para cerrar el HPA y volver a un punto homeostático. Tomada de Lupien *et al.* (2015).

La amígdala y su microcircuito formado por la MeA y CeA, tiene un papel importante en la respuesta al estrés. La amígdala no sólo recibe información del mPFC, sino que también la transmite a otras regiones del cerebro. Específicamente, las neuronas mPFC proyectan hacia las neuronas de la BLA, y posteriormente llega a la CeA de la amígdala. Finalmente se dirige a regiones del cerebro involucradas en las respuestas fisiológicas y conductuales al estrés, incluyendo el hipotálamo y áreas del tallo cerebral (*Figura 8*) (Zhang *et al.*, 2018).



*Figura 8.* Circuito amigdalino (CPF-BLA-CeA) involucrado en la respuesta al estrés. La CPF transmite información a través de proyecciones glutamatergicas a la BLA. Las neuronas glutamatergicas del BLA se proyectan a la CeA directa o indirectamente a través de interneuronas GABAérgicas de las ITC (grupos de células intercaladas). Las proyecciones de CeA se dirigen a regiones o circuitos cerebrales implicados en respuestas fisiológicas y conductuales al estrés gluérgico y glutamatergico. El CPF puede afectar el sistema BLA GABAérgico mediante la regulación de las neuronas del DRN (núcleo dorsal del rafe) 5-HT en condiciones de estrés. Tomado de Zhang *et al.*, (2018).

### 5.3.1 Estrés postnatal

El estrés en la vida temprana (ELS) puede ocasionar efectos negativos duraderos en la función cerebral, desarrollo cognitivo y emocional, así como un aumento en el riesgo de padecer alguna psicopatología en la edad adulta (Van Bodegom *et al.* 2017).

En humanos las situaciones de mayor estrés se han dividido en tres tipos: perturbación, privación y negligencia y/o abuso. Los modelos en animales tratan de replicar esas situaciones de estrés para estudiar sus efectos. Tal es el caso de la separación materna (SM), privación materna y el modelo de anidación limitado, pues se ha observado que estas adversidades provocan alteraciones inmediatas y a largo plazo del eje HPA tanto en animales como en humanos. Estos modelos adquieren relevancia, pues, entornos adversos durante la etapa neonatal afectan el establecimiento de la regulación neurobiológica del comportamiento y capacidad de respuesta del estrés (Pryce *et al.*, 2005; Suchecki, 2018).

Estas alteraciones pueden manifestarse en la vida adulta a través del desarrollo de déficits cognitivos, tales como problemas en la atención, memoria a largo plazo y de trabajo, aprendizaje, así como una mayor probabilidad de padecer, depresión y ansiedad (Aisa *et al.*, 2007; Becker *et al.*, 2006). Además, se ha observado una conexión entre el abuso de sustancias y trastornos de estrés (Weinstock, 2008; Faravelli *et al.*, 2012); Así mismo, estas alteraciones pueden afectar comportamiento social (Veenema y Neumann, 2006).

Después del nacimiento, ocurre un período de hiporrespuesta al estrés (SHRP) en ratas desde el día postnatal (DPN) 3/4 al 14. Durante este periodo, la exposición a corticosteroides en el cerebro disminuye y los niveles basales de ACTH son más altos y, en consecuencia, existe una relativa falta de respuesta a estrés externo. En este sentido, una menor atención resulta en un desarrollo prematuro de la capacidad de respuesta a la corticosterona, ocasionando una exageración o atenuación de la actividad del eje HPA provocando posteriores psicopatologías (Schmidt *et al.*, 2003).

Respecto a eventos estresantes postnatales regulan negativamente el sistema de recompensa dopaminérgico, lo que resulta en una disminución de la sensibilidad a la recompensa. Dicha disfunción está asociada con la depresión crónica, la pérdida de placer, o falta de motivación (anhedonia) (Baik, 2020). Además, se ha observado que el estrés intenso, crónico e impredecible inhibe la liberación de dopamina inducida por estrés prolongado (Cabib y Puglisi-Allegra, 2012).

Los déficits en el procesamiento de recompensas por estrés resultan principalmente en trastorno depresivo mayor (TDM), en trastornos por uso de sustancias, trastorno de estrés postraumático (TEPT), esquizofrenia, TDAH y trastorno de conducta (Novick *et al.*, 2018).

#### **5.4 Separación materna**

Uno de los modelos murinos más utilizado para imitar los abusos en la infancia, como la privación social y negligencia, es la separación materna (SM). La SM consiste en separar a las crías de su madre durante cierto tiempo en los primeros días de vida. Cabe mencionar que este modelo induce un aumento en los comportamientos depresivos y ansiosos en la edad adulta (Haller *et al.*, 2014).

Los problemas inducidos por la SM en roedores surgen debido a que la relación madre-cría, que abarca alimentación, estimulación táctil, acicalamiento, normalmente reduce la actividad del eje HPA y del SHRP. Por el contrario, la SM produce una hiperactivación del eje HPA y SHRP, aumentando los niveles de ACTH y corticosterona sérica (CORT), alcanzando su punto máximo después de varias horas. Como consecuencia, se deteriora el SHRP y hay una liberación excesiva de CORT en el cerebro, seguida de un aumento en los niveles de corticosteroides en la sangre. Este proceso activa los GR, alterando la función y estructura del cerebro en las etapas de desarrollo y generando efectos duraderos en la plasticidad cerebral y comportamiento en etapas posteriores de la vida (Nishi, 2020).

De igual manera, las consecuencias de la SM dependen de la duración (horas o minutos) y del número de días. Es decir, períodos prolongados de SM (3 horas o más cada día) provoca que las crías salgan del SHRP, aumentando la actividad del PVN y de corticosterona basal inducida por el estrés. Por el contrario, un período de entre 3 minutos a 3 horas son insuficientes para lograrlo, a menos que se repita diariamente. Entonces, puede llegar a sensibilizar la respuesta al estrés por corticosterona y crecimiento suprarrenal. Sin embargo, un período de 15 minutos disminuye la depresión, ansiedad y las respuestas al estrés en la vida adulta (Schmidt *et al.*, 2004; Levine, 2005).

La SM provoca desesperación en las crías e induce la repetida estimulación por glucocorticoides y catecolaminas, resultando en depresión unipolar y bipolar, así como en trastornos de ansiedad, comportamiento anhedónico y un deterioro en las vías de recompensa dopaminérgica (Nishi, 2020).

En estudios de preferencia de lugar condicionada, se ha reportado que la SM disminuye el comportamiento de búsqueda de recompensas por “alimentos naturales sabrosos”; por el contrario, aumenta el efecto de recompensa con drogas y etanol. Estos datos sugieren que la SM aumenta la vulnerabilidad al abuso de sustancias cuando se expone a los individuos a drogas o alcohol en la edad adulta, y disminuye la motivación de búsqueda de recompensas naturales (Koob y Volkow, 2010). También se han reportado déficits cognitivos en memoria y tarea de reconocimiento (Asia *et al.*, 2007). Además, afecta el aprendizaje y la memoria del miedo, expresando recuerdos duraderos de asociaciones de miedo aprendidas en el pasado (Chocyk *et al.*, 2014).

A nivel cerebral, se ha detectado que afecta regiones que involucran funciones cognitivas. Por ejemplo, se ha observado que la SM aumenta densidad dendrítica en la mPFC y aumenta el volumen de la amígdala (Ovtscharoff y Braun, 2001; Lupien *et al.*, 2011). De igual forma, disminuye la expresión de BDNF en la mPFC, en el NAc y en CA1, y provoca cambios en la densidad dendrítica y número de espinas dendríticas en la mPFC y amígdala (Wang *et al.*, 2015).

#### 5.4.1 Separación materna sobre la conducta social

En los humanos existen tres tipos de experiencias adversas en la vida temprana que conducen a la agresión y comportamiento antisocial en la edad adulta: 1) falta de vínculos fuertes con los padres (negligencia emocional temprana), 2) exclusión social y soledad (negligencia social temprana), 3) exposición a estrés durante la infancia y pubertad (Heim y Nemeroff, 2001). La SM en roedores se emplea para estudiar los cambios en los comportamientos sociales (juego y pelea) inducidos por estas experiencias adversas en la vida temprana.

Individuos juveniles y adultos, expuestos a SM, exhiben comportamiento social inapropiado y agresivo (Nishi, 2020). Veenema *et al.* (2006), mediante una prueba de intruso-residente, reportaron que machos adultos expuestos a la SM aumentan sus niveles de agresión al introducir en su jaula a otro individuo novedoso. De manera similar, se ha observado que, en el juego social, machos juveniles sometidos a SM presentaban conductas agresivas hacia un individuo novedoso en mayor cantidad, como ataques a la nuca, mordidas y menos características de juego sumiso (*Figura 9*). Los datos aportados por estos estudios sugieren que la exposición a la SM altera la forma de afrontar situaciones de conflicto social a lo largo de la vida (Veneema y Neumann, 2009).

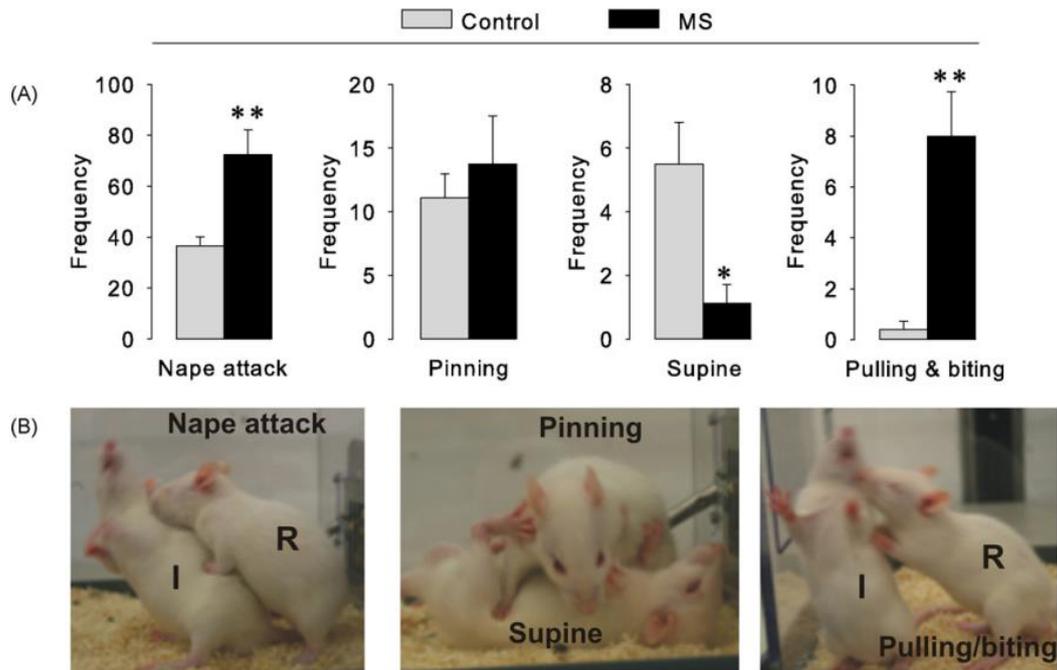
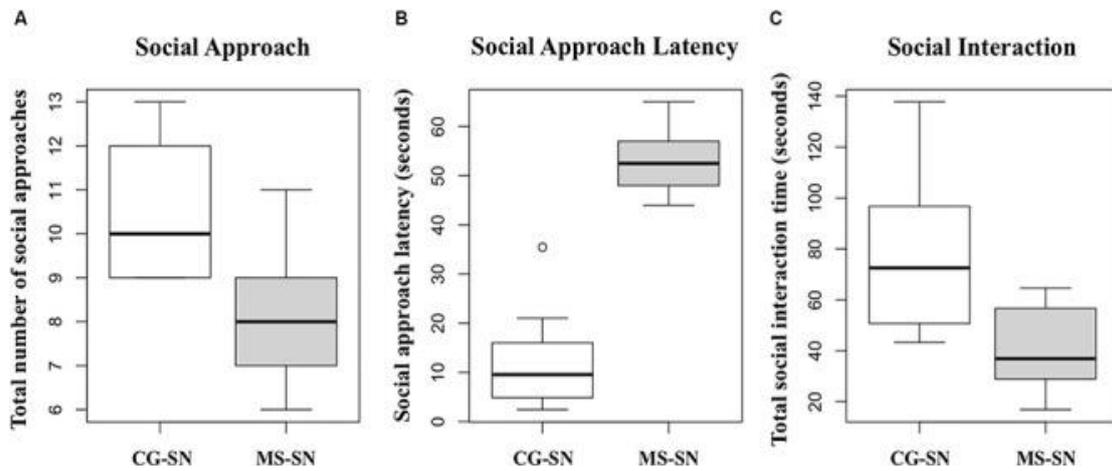


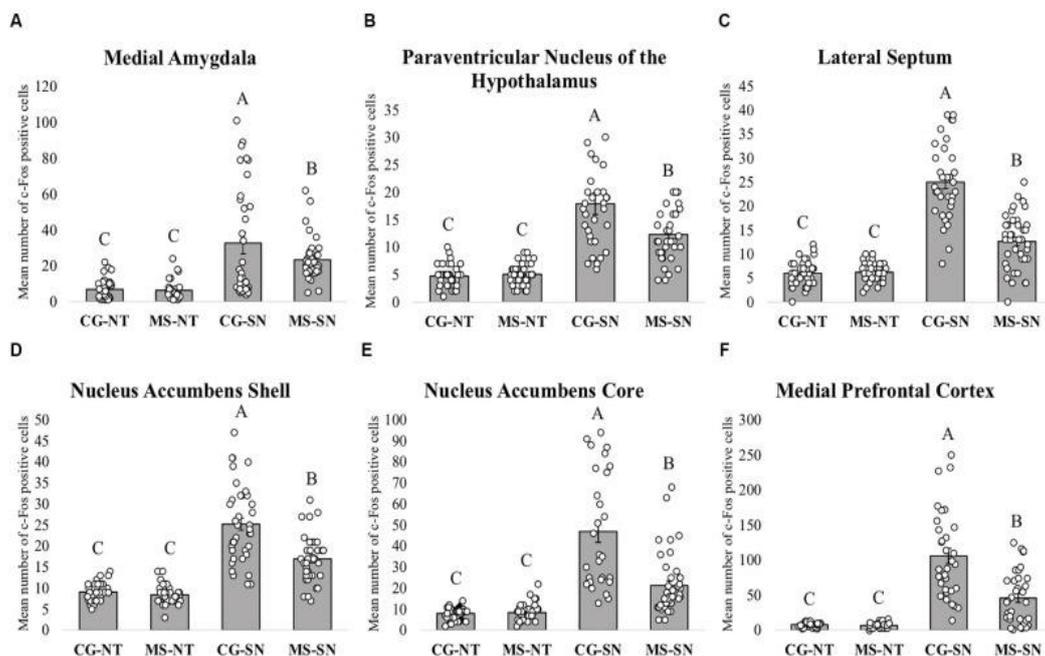
Figura 9. Efectos de la separación materna (MS) sobre juego de pelea. Frecuencia de ataques a la nuca del oponente (nape attack), posturas sumisas (supine) de ratas jóvenes durante el juego, y mordidas hacia el oponente (pulling/biting), tacleo del oponente (pinning). Residente (R), una rata macho juvenil intrusa (I). Tomado de Veneema y Neumann (2009).

Mejía-Chávez *et al.* (2021), realizaron un estudio que consistió en separar a las crías de su madre del DPN 1-21 durante 4 horas al día (9:00 h-13:00 h). En el día 53 realizaron una prueba de novedad social, la cual consiste en colocar a dos individuos de diferente camada en una jaula separados por una malla y así observar conducta de socialización, evitando conductas agresivas. En el estudio encontraron que las ratas con SM dedicaron menos tiempo a interactuar con el individuo novedoso, tuvieron menor número de acercamientos y mayor tiempo de latencia a comparación de los individuos sin SM (Figura 10).



**Figura 10.** Conductas sociales medidas. (A) Número total de acercamientos sociales. (B) Latencia del enfoque social. (C) Tiempo total de interacción social. CG-SN: grupo Control Sujetos-Novedad Social; MS-SN: grupo Separación Materna-Novedad Social, tomada de Mejía-Chávez *et al.*, 2021.

Además, en el mismo estudio se comparó el número de células positivas a c-Fos en mPFC, NAcSh, NAcCo, MeA, LS y PVN; regiones cerebrales que forman parte de la red de conducta social y sistema de recompensa. Se encontró que la SM redujo el número de células c-Fos positivas en esas áreas (*Figura 11*). Los autores concluyeron que la SM reduce la capacidad de núcleos cerebrales, posiblemente contribuyendo a la aparición de trastornos del comportamiento (Mejía-Chávez *et al.*, 2021).



*Figura 11.* Células c-Fos positivas. (A) Número medio de células c-Fos positivas en la MeA. (B) Número medio de células c-Fos positivas en el PVN. (C) Número medio de células c-Fos positivas en el LS. (D) Número medio de células c-Fos positivas en el NAcSh. (E) Número medio de c-Fos positivos en el NAcCo. (F) Número medio de células c-Fos positivas en la mPFC. Sujetos de control-grupo sin prueba: CG-NT. Grupo Separación Materna Sin Prueba; MS-NT. Grupo de Sujetos de Control-Novedad Social: CG-SN: Grupo Separación Materna Novedad Social: MS-SN. Las letras A, B y C sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos, tomada de Mejía-Chávez *et al.*, 2021.

## 5.5 Psicofarmacología de la nicotina

La nicotina es un alcaloide que se encuentra en la planta del tabaco (*Nicotiniana tabacum*). Induce un patrón de conducta adictiva, por lo que se considera una droga que altera el funcionamiento de diversos sistemas biológicos, siendo el principal el sistema nervioso (Molero-Chamizo y Muñoz-Negro, 2005). La capacidad reforzadora de la nicotina depende del sexo; es decir, tanto en humanos como en ratas, la motivación para obtener nicotina, así como sus efectos es mayor en hembras que en machos (Donny *et al.*, 2000; Klein *et al.*, 2004). La psicofarmacología de la nicotina ha demostrado diversos efectos, entre lo que se encuentran su efecto ansiolítico, antidepresivo y neuroprotector; respuestas que se han atribuido al efecto de la nicotina sobre la actividad del nervio vago y su conexión con el hipotálamo (Goodsell, 2004).

### 5.5.1 Farmacocinética y farmacodinamia de la nicotina

Cuando la nicotina es fumada e inhalada, se absorbe rápidamente por los pulmones y, llega al cerebro entre 10 a 20 segundos, más rápido que por vía intravenosa, produciendo un fuerte refuerzo conductual (Benowitz, 1990). Su absorción inicia por las membranas biológicas de la boca, después pasa a vía pulmonar y alvéolos pulmonares para posteriormente pasar a flujo sanguíneo, tejidos corporales y cerebro (Balfour y Fagerstrom, 1996). Las concentraciones en la sangre empiezan a decrecer a los 30 minutos y dado que no se puede eliminar enzimáticamente en el espacio sináptico, los receptores pueden volver a estimularse tras su desensibilización hasta que la nicotina se elimina aproximadamente a las 2 horas. No obstante, la vía de administración ya sea pulmonar o parenteral, determina el tiempo de acción en sistema nervioso central (Yildiz, 2004).

Los cigarrillos contienen entre 10-20 mg de nicotina y, la dosis letal para los humanos es de 60 mg (Koob y Le Moal, 2000). Cuando se consume, la mayor parte de la nicotina (80%-90%) es metabolizada en el hígado y sus metabolitos cotinina y óxido-N-nicotina son excretados en la orina. Aproximadamente el 4% de la nicotina es convertida en óxido-N-nicotina que se excreta en gran medida en la orina. El 70% de la nicotina es convertida a cotinina que es metabolizada y su vida media es de 19 horas (Koob y Le Moal, 2000). La tolerancia farmacodinámica que presenta puede ser aguda, o sea que puede desarrollarse a los pocos minutos y terminar a las pocas horas, o; la crónica, que aparece a los pocos días y puede permanecer meses (Fà *et al.*, 2000).

### 5.5.2 Receptores de acetilcolina (AChRs)

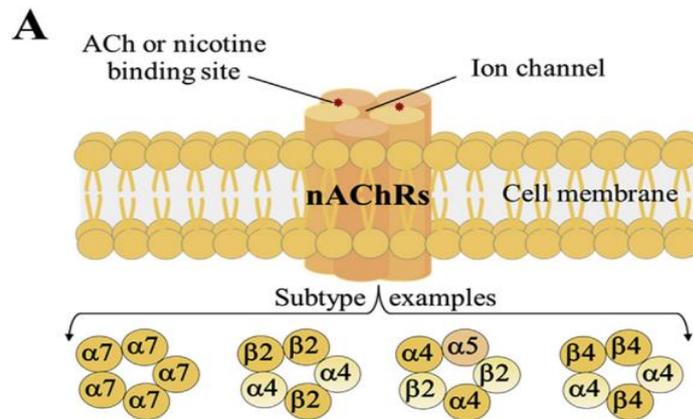
Los receptores de acetilcolina (AChRs) se han clasificado en nicotínicos (nAChR) y muscarínicos (mAChR). Ambos desempeñan funciones importantes y básicas como la respiración, digestión, memoria, adicción ritmo circadiano, presión arterial, control de frecuencia y ritmos cardíacos. (Alkam y Nabeshima, 2019).

### 5.5.3 Receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR)

Los nAChR, son polipéptidos transmembrana que poseen subunidades que forman canales iónicos selectivos permeables a  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , y  $\text{K}^+$  (*Figura 12*). Estos receptores se encuentran ubicados en las membranas plasmáticas de las neuronas del sistema nervioso central (SNC) y el sistema periférico; de las células posganglionares en todos los ganglios autónomos y; de los músculos inervados por fibras motoras somáticas (Pappano, 2015). Los nAChR en el cerebro de los mamíferos están compuestos por subunidades  $\alpha$  ( $\alpha 2$ -  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$  y  $\alpha 10$ ), y tres subunidades  $\beta$  ( $\beta 2$  a  $\beta 4$ ), que se localizan en células ganglionares y no neuronales (*Figura 12 A*) (Posadas *et al.*, 2013). Los subtipos  $\alpha 4 \beta 2$ ,  $\alpha 3 \beta 4$  y  $\alpha 7$  (homoméricos) son los subtipos de receptores más abundantes y ampliamente distribuidos en el cerebro de los mamíferos y poseen una alta afinidad por la ACh y la nicotina (Millar y Gotti, 2009; Posadas *et al.*, 2013). El subtipo  $\alpha 4 \beta 2$  es el principal receptor que media la dependencia de la nicotina.

Estudios en ratones han demostrado que la eliminación del gen  $\beta 2$  elimina los efectos conductuales de la nicotina, inhibiendo la liberación de dopamina en el cerebro y la

administración (Picciotto et al., 1998). De manera similar, ratones con una mutación puntual en un nucleótido en la región de formación de poros (subunidad  $\alpha 4$ ) resulta en un receptor que es hipersensible a los efectos de la nicotina (Tapper *et al.*, 2004).



**B** The half-lives of the two agonists of nAChRs.

Agonists	In the blood circulation	In the synaptic cleft
ACh	< 2 seconds	< 1 second
Nicotine	$\approx 2^*$ or $8^{**}$ hours	Unknown

\* In adults. \*\* In newborns.

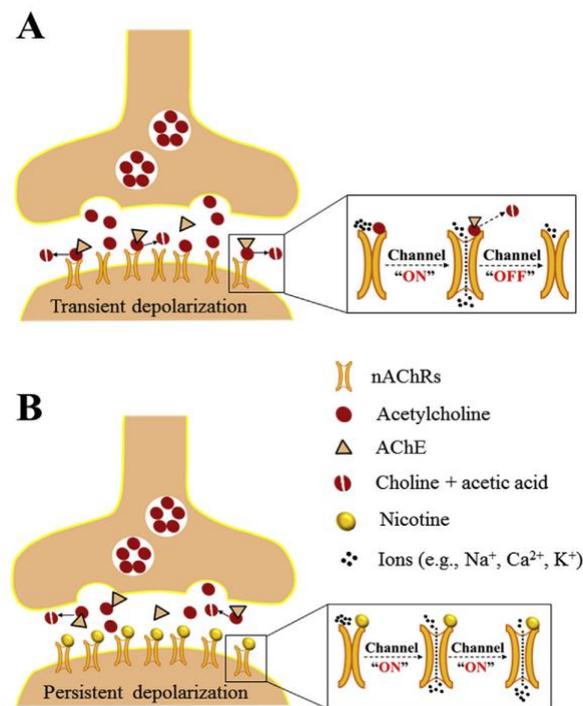
Figura 12. Receptores nicotínicos de acetilcolina y vida media de sus dos agonistas (nicotina y ACh). A: Los nAChRs son polipéptidos transmembrana, sus subunidades forman canales iónicos selectivos de cationes. La ACh y la nicotina se unen a los nAChR para ejercer sus efectos. B: Vida media de la Ach y nicotina en la circulación sanguínea y hendidura sináptica. Tomado de Alkam y Nabeshima (2019).

#### 5.5.4 Mecanismo de acción y neurocircuito

El efecto excitador de la nicotina se debe principalmente a su capacidad de abrir los canales de sodio en las neuronas cuyas membranas poseen nAChR (Yildiz, 2004). La nicotina, como la ACh, activan los nAChR y despolarizan las neuronas del SNC y, de los órganos diana de todo el cuerpo. A través de sitios de unión en los nAChR, la nicotina activa y cambia las estructuras tridimensionales de los receptores para abrir un canal iónico permitiendo la entrada de cationes ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , y  $\text{K}^+$ ) lo que resulta en una rápida despolarización de la célula.

Por otra parte, la ACh se libera a través de la membrana presináptica y se difunde a través de la hendidura sináptica, tanto en el SNC como en el periférico, donde se une a los nAChR en la membrana postsináptica; un segundo después de la liberación de ACh, la enzima

acetilcolinesterasa (AChE) hidroliza la ACh en colina y ácido acético resultando en la interrupción de la función de ACh (*Figura, 12 A*) (Quick y Lester, 2002). Por el contrario, la nicotina tiene una función estimulante prolongada, dado que la AChE no puede hidrolizar rápidamente la nicotina como la ACh en la hendidura sináptica (*figura 12 B*) (Krejci *et al.*, 2006, Pappano, 2015).



*Figura 13.* La acetilcolina y nicotina actúan a través de receptores nicotínicos de acetilcolina. A. La ACh estimula y abre los canales iónicos selectivos de cationes nAChR, que son permeables a Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, y K<sup>+</sup>, para provocar la despolarización de las células diana. Su efecto es breve ya que tan pronto como la ACh se une a los nAChR, la AChE en la hendidura sináptica hidroliza la ACh en colina y ácido acético provocando que los canales iónicos se cierren. B. La nicotina estimula y abre los canales los canales iónicos selectivos de cationes nAChR para provocar la despolarización de la célula diana. Su efecto es duradero ya que después de unirse a los nAChR, no se hidroliza rápidamente para volverse ineficaz como la ACh y, el canal iónico permanece abierto. Tomado de Alkam y Nabeshima (2019).

La nicotina actúa sobre diversas subunidades del nAChR, en la vía mesolímbica del refuerzo estimula las neuronas dopaminérgicas del VTA, liberando inmediatamente dopamina en el NAc y provocando un efecto reforzador; por lo tanto, el efecto reforzador de la nicotina se inicia en el VTA, específicamente en los nAChR de las neuronas dopaminérgicas del sistema

mesolímbico (figura 14) (Nisell *et al.*, 1994; Smolka *et al.*, 2004). También aumenta la velocidad de activación de las neuronas dopaminérgicas en el VTA y la sustancia nigra, realizada a través del subtipo  $\alpha 4 \beta 2$  (Koob y Le Moal, 2006).

La estimulación de los nAChR centrales por la nicotina da como resultado la liberación de dopamina en el cerebro, y otros neurotransmisores que median diversos comportamientos de la nicotina, como ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), acetilcolina, noradrenalina, serotonina, glutamato y endorfinas. La dopamina se libera en el área mesolímbica, el cuerpo estriado y la corteza frontal (Dani y De Biasi, 2001; Nestler, 2005). Se ha observado por medio de imágenes cerebrales que la nicotina aumenta de forma aguda la actividad en la CPF, el tálamo y el sistema visual, esto coincide con la activación de circuitos cerebrales talámicos y de los ganglios corticobasales (Brody, 2006).

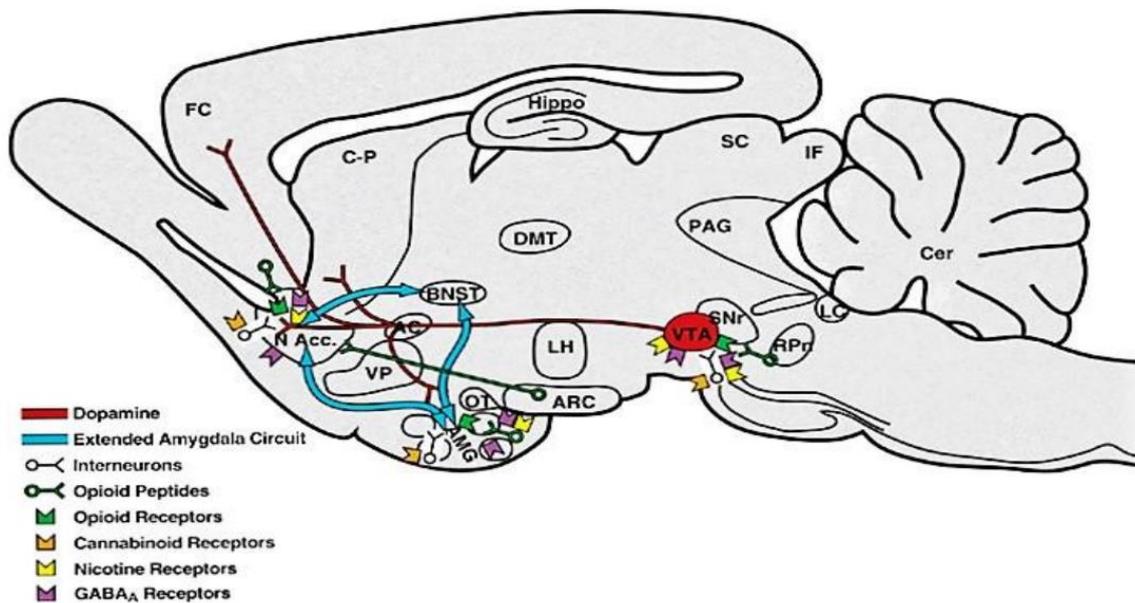


Figura 14. Sección sagital de las vías y receptores implicados en las acciones de refuerzo de la nicotina. La nicotina activa los nAChR en el VTA, NAcc y amígdala, ya sea directa o indirectamente a través de acciones sobre interneuronas. También puede activar la liberación de péptidos opioides en el NAcc o amígdala independientemente del sistema de dopamina. Corteza frontal (FC), hipocampo (Hippo), núcleo cama de la estría terminal (BNST), núcleo accumbens (NAcc)/(Nac), pálido ventral (VP), amígdala (AMY), área tegmental ventral (VTA). Tomado de Koob, (2013).

La nicotina inhibe la actividad de la enzima monoaminoxidasa A y B conocida como MAO del cerebro, con lo que aumenta los niveles de neurotransmisores monoaminérgicos como la

dopamina y norepinefrina en la sinapsis, por lo que aumentan los efectos de la nicotina y se facilita la adicción. En el caso de las ratas la inhibición de la MAO facilita la adquisición de la autoadministración de nicotina por lo que la inhibición de la MAO interactúa con la nicotina para reforzar la dependencia (Lewis *et al.*, 2007).

## **5.6 Nicotina e interacción social**

Las personas fumadoras, principalmente adolescentes, reportan efectos calmantes y reductores de ansiedad como razones para fumar. Por otro lado, se ha sugerido que el fumar aumenta la socialización, pues los fumadores socializan en áreas donde se permite fumar; de igual modo, se respalda el fumar como una ayuda para socializar y; en general, los estudios en humanos revelan que el contexto social influye en la motivación para fumar (Martin y Sayette, 2018).

En ratas, se ha informado que la nicotina tiene efectos ansiolíticos, particularmente en pruebas de interacción social. No obstante, el efecto depende de la dosis, con dosis bajas (0.001-0.1 mg/Kg) hay un efecto ansiolítico y aumenta la interacción social; por el contrario, con dosis altas (0.5-1.0 mg/Kg) aparece un efecto ansiogénico y disminuye la interacción social, después de 30 minutos de una inyección intraperitoneal (File *et al.*, 1998; Irvine, 2001).

El efecto ansiolítico de la nicotina, el desarrollo de tolerancia y abstinencia, están mediados por el DRN. En cambio, el efecto ansiogénico está mediado por el hipocampo dorsal y LS (File *et al.*, 2000). Así, por ejemplo, en un estudio en donde se dividieron animales en los grupos vehículo o nicotina, y los colocaron en un compartimiento de aislamiento (Iso) o con un compañero de juego (Soc), se observó que el grupo con administración de nicotina (0.01 y 0.03 mg/Kg) dedicó más tiempo al compartimiento con un compañero de juego social (*Figura 15*). Estos hallazgos indican que la nicotina y las recompensas sociales interactúan de forma sinérgica en ratas adolescentes generando una mayor recompensa en comparación con la administración separada de cualquiera de estas dos recompensas. (Thiel *et al.*, 2009).

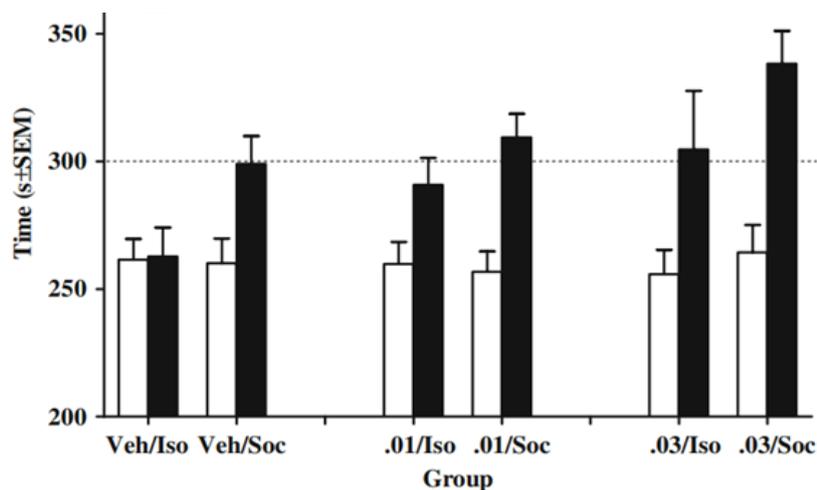


Figura 15. Nicotina (0.01, 0.03 mg/Kg) y recompensa social. Antes de la prueba (barras blancas) vs. después de la prueba (barras negras). Tomado de Thiel *et al.*, (2009).

Cheeta *et al.*, (2001) midieron el tiempo de interacción social (segundos) en ratas aisladas, o en grupo de 5 individuos, durante 7 días. Los parámetros para medir la interacción fueron: olfatear, seguir, acicalar a la pareja, boxear y luchar. Después, 30 minutos antes de la prueba de interacción social les administraron diversas dosis de nicotina vía subcutánea (0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.45 mg/Kg) o un vehículo (agua destilada). En los individuos alojados individualmente, las dosis de nicotina 0.05, 0.1 y 0.25 mg/Kg aumentaron significativamente el tiempo dedicado a la interacción social; en cambio, en los alojados en grupo solo la dosis de 0.025 mg/kg aumentó significativamente la interacción social (*figura 16*).

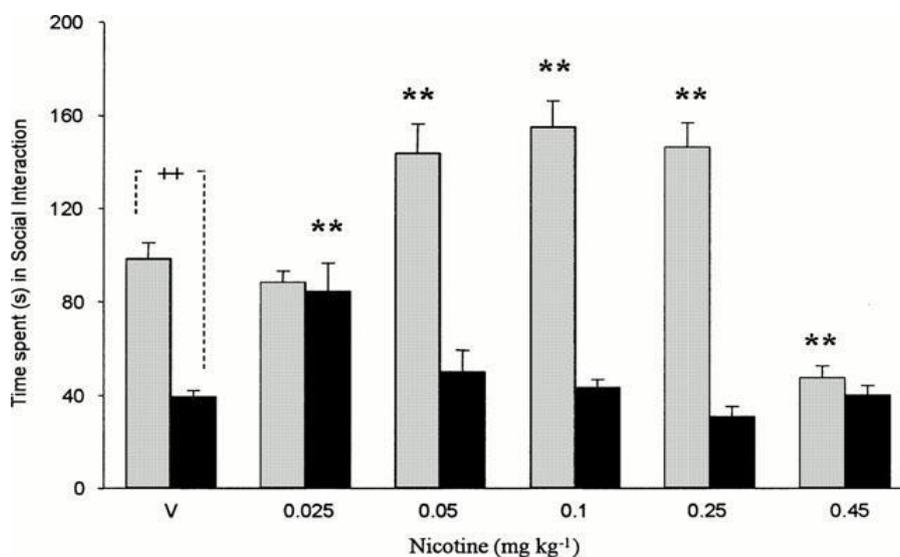


Figura 16. Tiempo medio invertido en interacción social. Ratas alojadas individualmente (barras sombreadas) o en grupos sociales de cinco (barras negras) durante 7 días y luego

analizadas 30 minutos después de la inyección con vehículo o (-) nicotina (0,025 – 0,45 mg kg sc). +, \*: diferencias significativas. Tomada de Cheeta., *et al.* 2001.

Los resultados antes mencionados sugieren que un período de aislamiento social en la edad adulta puede afectar la respuesta a la nicotina. Sin embargo, en ambos alojamientos (en aislamiento o en grupo) la nicotina tiene efectos ansiolíticos aumentando la interacción social (Cheeta *et al.*, 2001).

## **6 JUSTIFICACIÓN**

El laboratorio de plasticidad cerebral ha reportado recientemente que la separación materna reduce la interacción social en ratas. Se ha reportado que la nicotina aumenta la interacción social. De ahí que el laboratorio está interesado en investigar los efectos de la nicotina sobre los déficits conductuales provocados por la separación materna. El estudio es importante porque, como se ha mencionado anteriormente, contribuirá con información para comprender las posibles explicaciones sobre la conexión entre relaciones maternas deficientes, o negligentes, y la manifestación de enfermedades neuropsiquiátricas, como las conductas antisociales y las adicciones. Más aún, en etapas posteriores, podría contribuir al desarrollo de políticas sociales y estrategias para reducir el consumo de drogas y mejorar el bienestar social, conductual, psicológico y fisiológico mediante intervenciones focalizadas en la identificación y prevención en grupos con alta vulnerabilidad a través de la investigación científica.

## **7 HIPÓTESIS**

La administración de nicotina reduce efectos nocivos generados por la separación materna ante la interacción social, aumentando la socialización en la adultez.

## **8 OBJETIVOS**

### **8.1 General:**

Evaluar los efectos de la nicotina sobre la interacción de novedad social en ratas macho juveniles sometidas a separación materna.

#### *8.1.1 Específicos:*

- Analizar la conducta social de ratas macho juveniles con separación materna.
- Analizar la conducta social de ratas macho juveniles con separación materna y administración de nicotina.

## 9 MÉTODO

### 9.1 Animales, alojamiento y manipulación

Se utilizaron 24 ratas macho Wistar de 53 días de edad (juveniles), se obtuvieron por medio de cruces controladas para tener conocimiento sobre su camada de procedencia. Los animales estuvieron alojados en el bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx). Se mantuvieron en condiciones de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Se alojaron en cajas individuales de bioterio estándar (polipropileno de 25 cm de ancho, 40 cm de largo y 15 cm de alto) con tapa de acero inoxidable con cama de viruta de madera. La limpieza de jaulas se realizaba 3 veces a la semana desde el inicio al final del experimento y se les colocaba agua y alimento *ad libitum*. Se mantuvo un ciclo de luz-oscuridad de 12:12, la luz se encendía a las 9:00 pm y se apagaba a las 9:00 am, si se requería iluminación durante la fase oscura se utilizaba un foco de luz roja. Se mantuvo una temperatura de 20°C a 26°C y una humedad relativa de 40% a 50%.

Se dividieron en 8 grupos de los cuales a 4 grupos se les realizó separación materna desde el día postnatal 1 al 21, después del cual se alojaron individualmente las crías en cajas de bioterio estándar hasta el día 53 postnatal. Solo se ocuparon machos para el experimento. El día 53 se llevaron a cabo pruebas de novedad social.

#### 9.1.1 Grupos

Se ocuparon un total de 24 animales divididos en 4 grupos los cuales fueron expuestos a distintos cuidados maternos, tratamiento y a una prueba de novedad social (*Tabla 2*).

Tabla 2. Grupos experimentales.

<b>n</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Dosis</b>	<b>Estimulación neonatal</b>	<b>Prueba</b>	<b>Siglas</b>
6	Vehículo	1 mL/Kg agua inyectable IP	Cuidado materno	Novedad social	Vh-CM
5	Vehículo	1 mL/Kg agua inyectable IP	Separación materna	Novedad social	Vh-SM
7	Nicotina	0.0075 mg/Kg IP	Cuidado materno	Novedad social	N-CM
6	Nicotina	0.0075 mg/Kg IP	Separación materna	Novedad social	N-SM

### 9.1.2 Registro de peso

Las ratas se pesaron cada tercer día después del día 3 postnatal (días 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21 y 53 postnatales), las ratas se colocaban en un contenedor de plástico sobre una báscula eléctrica. Después de pesar a un individuo el contenedor se limpiaba con cloro al 10%, alcohol al 70% y todas las crías eran manipuladas con guantes.

## 9.2 Pruebas y estimulación

Las pruebas de novedad social se llevaron a cabo en el bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx) el día 53 postnatal y se realizaron con iluminación roja. El procedimiento para la separación materna y la descripción del área para las pruebas de investigación social se describen a continuación.

### 9.2.1 Separación materna

La separación materna se realizó de acuerdo con Wang et al. (2015) y Mejía-Chávez et al. (2021), consistió en separar las crías de sus madres 4 horas al día (9:00h-13:00h) durante la

fase de oscuridad del ciclo de luz, desde el día 1 al 21 postnatal. En el tiempo de separación las crías se colocaron en cajas de bioterio estándar con viruta limpia, en grupos mínimo de 4 individuos para mantener su temperatura corporal. Pasado el tiempo de separación las crías se devolvieron a la jaula con su madre.

### 9.2.2 Área de prueba

El área para las pruebas de novedad social se realizó de acuerdo con Gómez-Gómez et al. (2019). Consistió en una jaula de policarbonato de 45 cm<sup>2</sup> de largo, 25 cm<sup>2</sup> de ancho y 20 cm<sup>2</sup> de alto, con una malla metálica con celdas de 0.5 cm<sup>2</sup> como tapa de la jaula y en medio de la jaula una malla metálica con celdas de 1.3 cm<sup>2</sup> (Figura 17), esta malla tenía la función de evitar el contacto cuerpo a cuerpo y agresivo entre los individuos, pero sin impedir el olfateo y el contacto con las vibrisas y las patas.

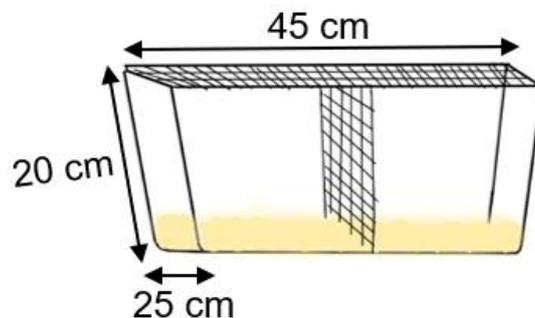


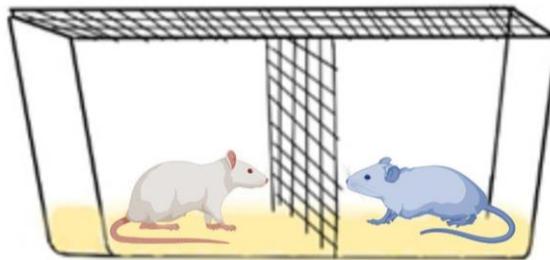
Figura 17. Ilustración del área de prueba.

### 9.2.3 Habitación del área de prueba

La habitación de los individuos se llevó a cabo el día 52 postnatal (un día antes de las pruebas de novedad social) de los grupos. Esta consistió en colocar a cada individuo por separado en la jaula de la prueba por 30 minutos. Pasado el tiempo de habitación se regresaban a su respectiva jaula. Para evitar la impregnación de olores de otros individuos en la jaula y las mallas se limpiaron con jabón, cloro al 10%, y alcohol al 70%, y se colocó viruta limpia, esto se realizó después de cada habitación.

#### 9.2.4 Prueba de investigación social

Las pruebas de investigación social se realizaron el día 53 postnatal entre las 10:00 h-13:00 h, durante la fase oscura del ciclo de luz con luz roja. Una rata era colocada en la jaula y del otro lado de la malla se encontraba un individuo novedoso (de diferente camada) de la misma edad y sexo (*Figura 18*). Se dejaron interactuar durante 10 minutos, las pruebas eran grabadas para posteriormente analizar la conducta. Después de cada prueba se realizaba la limpieza de la jaula y mallas con jabón, cloro al 10%, y alcohol al 70% y se colocó viruta limpia para evitar la impregnación de olores de otros individuos en la jaula.



*Figura 18.* Ilustración del área de prueba. Figura por el autor creada en BioRender.com.

#### 9.3 Dosis vehículo

Se inyectó 1 ml/kg de agua destilada vía intraperitoneal (IP) a los grupos vehículo 15 minutos antes de la prueba de novedad social. La inyección se coloca en la cavidad peritoneal, que se ubica en el cuadrante inferior del abdomen en un ángulo de  $\sim 10^\circ$ , para evitar la perforación o lesión de órganos internos y peritonitis.

#### 9.4 Dosis de nicotina

Se administró 0.0075 mg/kg de nicotina en polvo en un volumen de 1 ml/kg de agua destilada vía intraperitoneal (IP) a los grupos con nicotina 30 minutos antes de la prueba de novedad social.

## 9.5 Procedimiento para los grupos

### 9.5.1 Vehículo-Cuidado materno

Del 1 al 21 día postnatal las ratas permanecieron con su madre, en el día 21 postnatal fueron alojadas en cajas individuales de bioterio estándar con comida y agua *ad libitum*. Las pruebas de novedad social se llevaron a cabo en el día 53 postnatal. Se les inyectó de forma intraperitoneal 1 ml/kg de agua destilada y 15 minutos después se realizaron las pruebas. Se colocó una rata de cada lado de la caja durante 10 minutos y se registró la conducta. Terminada la prueba fueron regresadas a sus jaulas durante aproximadamente 1 hora, pasado el tiempo se sacrificaron y se realizó una perfusión transcardial para la extracción del cerebro (Figura 19).

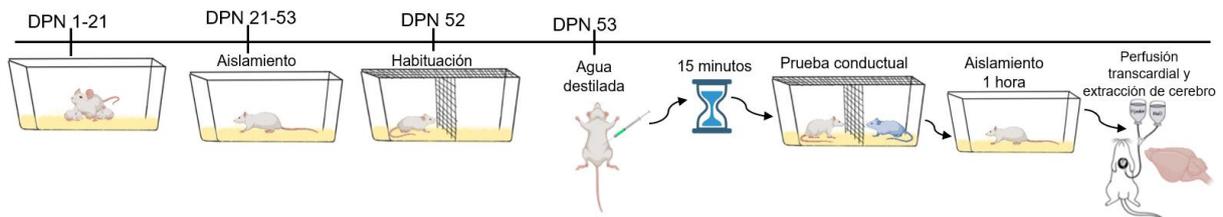


Figura 19. Ilustración del procedimiento para el grupo Vh-CM-NS. Figura por el autor.

### 9.5.2 Vehículo-Separación materna

Del día 1 al 21 día postnatal las ratas fueron separadas de su madre 4 horas al día (9:00 h-13:00 h). En el día 21 postnatal fueron alojadas en cajas individuales de bioterio estándar con comida y agua *ad libitum*. Las pruebas de novedad social se llevaron a cabo en el día 53 postnatal. Se les inyectó de forma intraperitoneal 1 ml/kg de agua destilada y 15 minutos después se realizaron las pruebas. Se colocó una rata de cada lado de la caja durante 10 minutos y se registró la conducta. Terminada la prueba fueron regresadas a sus jaulas durante aproximadamente 1 hora, pasado el tiempo se sacrificaron y se realizó una perfusión transcardial para la extracción del cerebro (Figura 20).

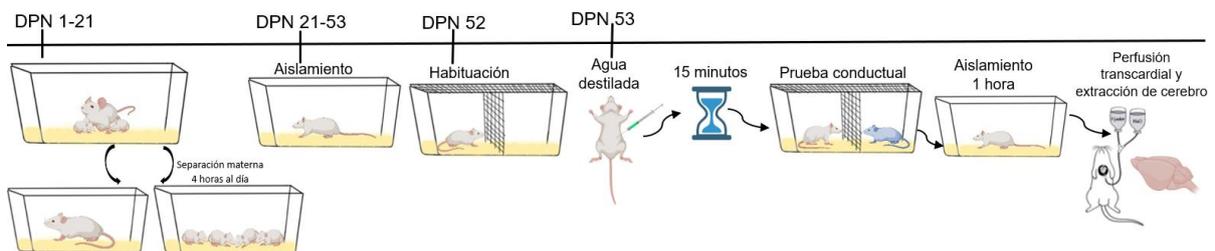


Figura 20. Ilustración del procedimiento para el grupo Vh-SM-NS. Figura por el autor.

### 9.5.3 Nicotina-Cuidado materno

Del 1 al 21 día postnatal las ratas permanecieron con su madre, en el día 21 postnatal fueron alojadas en cajas individuales de bioterio estándar con comida y agua *ad libitum*. Las pruebas de novedad social se llevaron a cabo en el día 53 postnatal. Se les inyectó de forma intraperitoneal 0.0075 mg/kg de nicotina y 30 minutos después se realizaron las pruebas. Se colocó una rata de cada lado de la caja durante 10 minutos y se registró la conducta. Terminada la prueba fueron regresadas a sus jaulas durante aproximadamente 1 hora, pasado el tiempo se sacrificaron y se realizó una perfusión transcárdial para la extracción del cerebro (Figura 21).

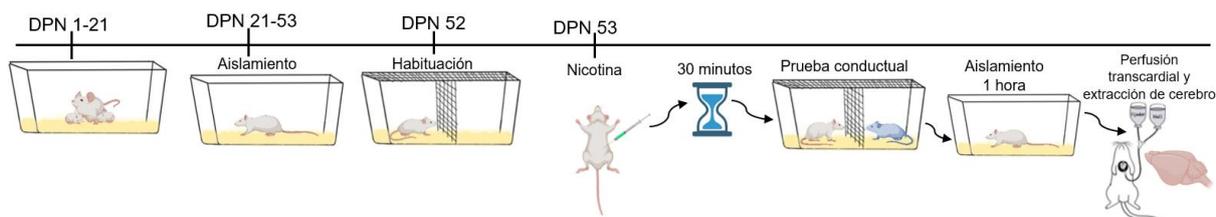


Figura 21. Ilustración del procedimiento para el grupo N-CM-NS. Figura por el autor.

### 9.5.4 Nicotina-Separación materna

Del día 1 al 21 día postnatal las ratas fueron separadas de su madre 4 horas al día (9:00 h-13:00 h). En el día 21 postnatal fueron alojadas en cajas individuales de bioterio estándar con comida y agua *ad libitum*. Las pruebas de novedad social se llevaron a cabo en el día 53 postnatal. Se les inyectó de forma intraperitoneal 0.0075 mg/kg de nicotina y 30 minutos después se realizaron las pruebas. Se colocó una rata de cada lado de la caja durante 10 minutos y se registró la conducta. Terminada la prueba fueron regresadas a sus jaulas durante aproximadamente 1 hora, pasado el tiempo se sacrificaron y se realizó una perfusión transcárdial para la extracción del cerebro (Figura 22).

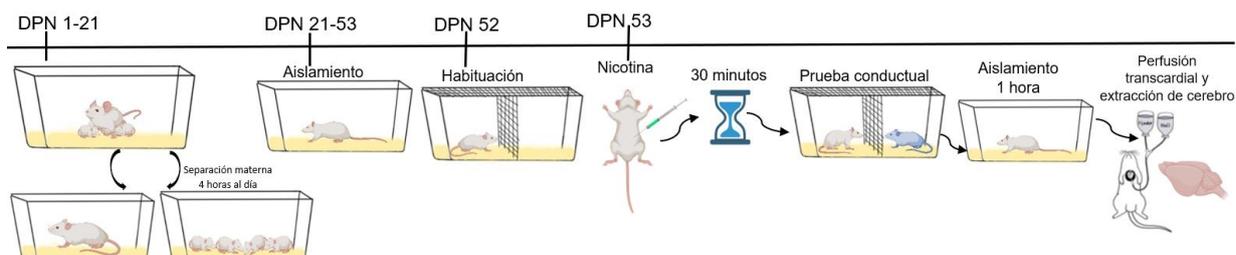


Figura 22. Ilustración del procedimiento para el grupo N-SM-NS. Figura por el autor.

## 9.6 Análisis de la conducta

Se analizaron los videos y se registraron las conductas sociales que fueron: investigación social, exploración ambiental/*rearing*, acercamientos, acicalamiento, latencia y el intento por traspasar la malla. Los parámetros establecidos para el análisis de las diferentes conductas se muestran en la *Tabla 3*.

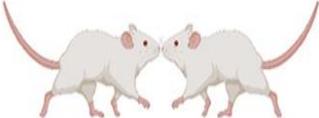
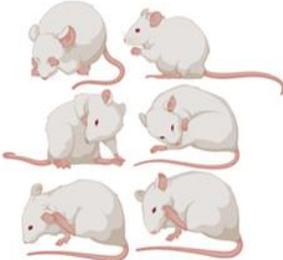
### 9.6.1 Análisis estadístico

Para analizar los datos del peso se utilizó un modelo lineal mixto, los modelos de efectos mixtos permiten el análisis de datos de medidas repetidas y también la estimación de parámetros fijos y la especificación de efectos aleatorios. Además, permiten manejar efectivamente datos perdidos y permiten la inclusión de predictores continuos y categóricos en el mismo análisis. Posteriormente se realizó una prueba *post hoc* de Tukey con un valor de  $p < 0.05$  para determinar la diferencia entre grupos.

Para evaluar la distribución de los datos se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk ( $P > 0.05$ ), cuando los datos no cumplieron la normalidad se procedió a una transformación de los datos. Para los valores de las variables conductuales se analizarán mediante una ANOVA de dos vías ( $P < 0.05$ ) considerando como factores el cuidado (CM/SM) y el tratamiento (Vh/N). Se hará una prueba de Levene para evaluar la homocedasticidad de varianzas ( $P > 0.05$ ) y cuando los resultados sean significativos se procederá a realizar una prueba *post hoc* de Tukey para obtener el valor de la media y error estándar de la media, así como el contraste entre los grupos que presentaron diferencias significativas. Todos los valores se presentarán como media + ESM.

El análisis estadístico se realizó con ayuda del programa R (RCore Team. 2023; RStudio Team, 2023). Las gráficas se realizaron con el programa GraphPad Prism 8.0.2 (263).

Tabla 3. Etograma de las conductas analizadas en la prueba de novedad social.

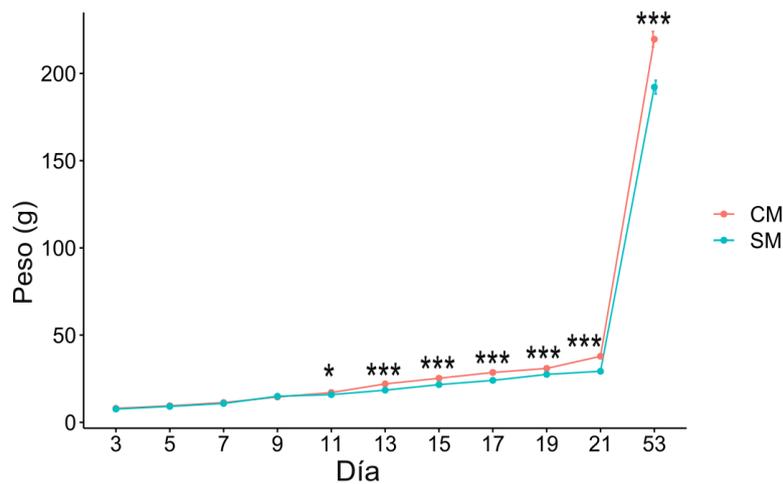
Conducta	Significado	Descripción
<p>Investigación social</p> 	<p>Le proporciona a los animales información sobre un individuo de interés. Es el paso antes del acercamiento. Involucra principalmente el olfato (investigación olfativa) y el tacto (investigación táctil).</p>	<p>Olfateo: Movimientos rápidos de contracción con la nariz en posición elevada o en contacto con el otro individuo.  <i>Whisking</i>: Con las vibrisas el roedor toca o roza rápidamente el individuo novedoso.</p>
<p>Exploración ambiental</p> 	<p>La exploración sirve para proporcionar información de su entorno al animal, y para localizar artículos o individuos en el entorno. Un comportamiento clásico exploratorio es el <i>rearing</i>.</p>	<p><i>Rearing</i>: El animal se para sobre sus patas traseras para explorar el área (Lever et al., 2006). Camina alrededor del entorno, trepa sobre los bordes de la caja, olfatea, extiende o mueve la cabeza.</p>
<p>Acercamientos</p> 	<p>Número total de veces que el roedor se acerca al individuo novedoso (Mejía-Chávez et al., 2021).</p>	<p>El roedor se acerca al individuo novedoso y posteriormente realiza algunas conductas como olfatear, o contacto con vibrisas (Mejía-Chávez et al., 2021).</p>
<p>Acicalamiento</p> 	<p>El acicalamiento en roedores es un comportamiento típico e innato para mantener la limpieza de la piel y el pelaje en condiciones normales/saludables o de estrés (Shiota et al., 2016)</p>	<p>El roedor realiza caricias o rascado con las patas cerca de la nariz (aseo de patas y nariz), desde las vibrisas hasta debajo de los ojos con una pata (aseo facial), movimientos hacia atrás y hacia arriba con ambas patas (cepillado de la cabeza) y lamido general del cuerpo e incluso de la cola y genitales (Kalueff et al., 2018).</p>
<p>Latencia</p> 	<p>Tiempo hasta que ocurre la interacción social (Mejía-Chávez et al., 2021).</p>	<p>El roedor se acerca por primera vez al individuo novedoso (tiempo) (Mejía-Chávez et al., 2021).</p>
<p>Intento de traspaso</p> 	<p>Medida del esfuerzo para cruzar la barrera (Berridge, 2004).</p>	<p>El roedor intenta pasar al otro lado de la malla con el individuo novedoso. Trepa sobre la malla, la muerde o empuja, rasca la viruta cerca de la malla (Mejía-Chávez et al., 2021).</p>

La descripción y el significado de las conductas de investigación social y exploración ambiental/*rearing* se obtuvieron de Stanford's University Mouse Ethogram. Ilustraciones creadas en BioRender.com por el autor.

## 10 RESULTADOS

### 10.1 Peso

Se observó un menor peso en los individuos con SM desde los primeros días (*Figura 24*). No obstante, de acuerdo a la prueba *post hoc* de Tukey, los días donde hubo diferencias significativas en el peso entre CM y SM fueron: día 11 ( $17.067 \pm 0.031$  g vs.  $15.877 \pm 0.031$  g;  $p=0.0123$ ), 13 ( $22.026 \pm 0.034$  g vs.  $18.442 \pm 0.034$  g;  $p<0.0001$ ), 15 ( $25.270 \pm 0.033$  g vs.  $21.616 \pm 0.033$  g;  $p<0.0001$ ), 17 ( $28.577 \pm 0.034$  g vs.  $24.052 \pm 0.034$  g;  $p<0.0001$ ), 19 ( $30.903 \pm 0.032$  g vs.  $27.468 \pm 0.032$  g;  $p<0.0001$ ), 21 ( $37.864 \pm 0.037$  g vs.  $29.269 \pm 0.037$  g;  $p<0.0001$ ) y 53 ( $219.630 \pm 0.032$  g vs.  $192.160 \pm 0.032$  g;  $p<0.0001$ ) (*Figura 23*).



*Figura 23.* Aumento de peso (g) del día postnatal (DPN) 3 al 53. Se muestra el aumento de peso registrado cada tercer día hasta el DPN 21 y luego hasta el día del de la prueba de novedad social (DPN 53). Los datos se muestran como la media  $\pm$  ESM. ‘\*\*\*’ $p < 0.001$  ‘\*\*’ $p < 0.01$  ‘\*’ $p < 0.05$ .



*Figura 24.* Ratas experimentales en el día 5. A) Cuidado materno (CM), B) Separación materna (SM).

## 10.2 Investigación social

De acuerdo con la prueba de Shapiro-Wilk, los datos de investigación social mostraron una distribución no normal ( $p=0.01916$ ). Posteriormente, la prueba de Levene mostró homocedasticidad de varianzas entre los grupos ( $p=0.306$ ) sin transformación de los datos. La prueba de ANOVA reportó un efecto significativo del Cuidado ( $F(1,20)=72.15$ ,  $p=4.56e-8$ ) del Tratamiento ( $F(1,20)=93.76$ ,  $p=5.42e-09$ ) y una interacción entre Cuidado y Tratamiento ( $F(1,20)=12.72$ ,  $p=0.00193$ ). Luego la prueba *post hoc* de Tukey mostró que existen diferencias significativas entre los grupos 1) CM-N ( $179.1 \pm 6.41$  s) y SM-N ( $142.3 \pm 6.92$  s;  $p=0.0046$ ), 2) entre los grupos CM-N ( $179.1 \pm 6.41$  s) y CM-Vh ( $134.5 \pm 6.92$  s;  $p=0.0007$ ), 3) entre los grupos CM-N ( $179.1 \pm 6.41$  s) y SM-Vh ( $48.1 \pm 7.59$  s;  $p<0.0001$ ), 4) entre los grupos SM-N ( $142.3 \pm 6.92$  s) y SM-Vh ( $48.1 \pm 7.59$  s;  $p<0.0001$ ), y 5) entre CM-Vh ( $134.5 \pm 6.92$  s) y SM-Vh ( $48.1 \pm 7.59$  s;  $p<0.0001$ ) (Figura 25).

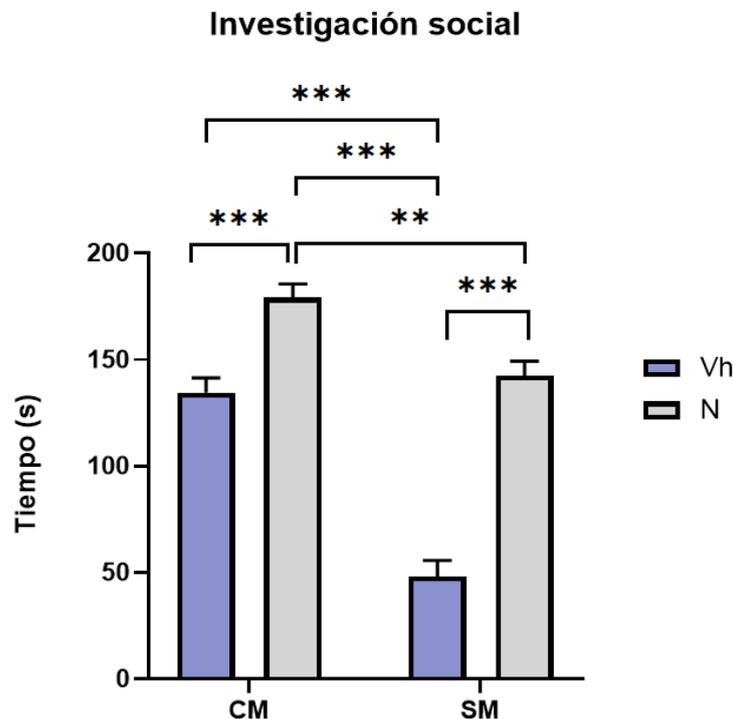


Figura 25. Tiempo promedio de investigación social. En la gráfica se muestra el tiempo promedio (segundos) que los individuos pasaron investigando al individuo novedoso durante los primeros 5 minutos de la prueba de novedad social. Cuidado materno-Vehículo (CM-Vh), Cuidado materno-Nicotina (CM-N), Separación materna-Vehículo (SM-Vh), Separación materna-Nicotina (SM-N). Los datos se presentan como la media  $\pm$  ESM. ‘\*\*\*’ $p < 0.001$  ‘\*\*’ $p < 0.01$  ‘\*’ $p < 0.05$ .

### 10.3 Exploración ambiental

La prueba de Shapiro-Wilk mostró que los datos de exploración ambiental no presentaban una distribución normal ( $p=0.02935$ ), por lo que se utilizó una transformación logarítmica de los datos. Posteriormente, la prueba de Levene mostró homocedasticidad de varianzas entre los grupos ( $p=0.802$ ) con los datos transformados. La prueba de ANOVA reportó un efecto significativo del Cuidado ( $F(1,20)=19.08$ ,  $p=0.000297$ ), un efecto significativo del Tratamiento ( $F(1,20)=15.56$ ,  $p=0.000800$ ) y una interacción entre ambos factores ( $F(1,20)=21.18$ ,  $p=0.000173$ ). La prueba *post hoc* de Tukey demostró diferencias significativas entre los grupos 1) CM-N ( $1.93\pm 0.0268$  s) y SM-Vh ( $2.20\pm 0.0318$  s;  $p<0.0001$ ), 2) entre los grupos SM-N ( $1.94\pm 0.0290$  s) y SM-Vh ( $2.20\pm 0.0318$  s;  $p<0.0001$ ) y 3) entre los grupos CM-Vh ( $1.92\pm 0.0290$  s) y SM-Vh ( $2.20\pm 0.0318$  s;  $p<0.0001$ ) (Figura 26).

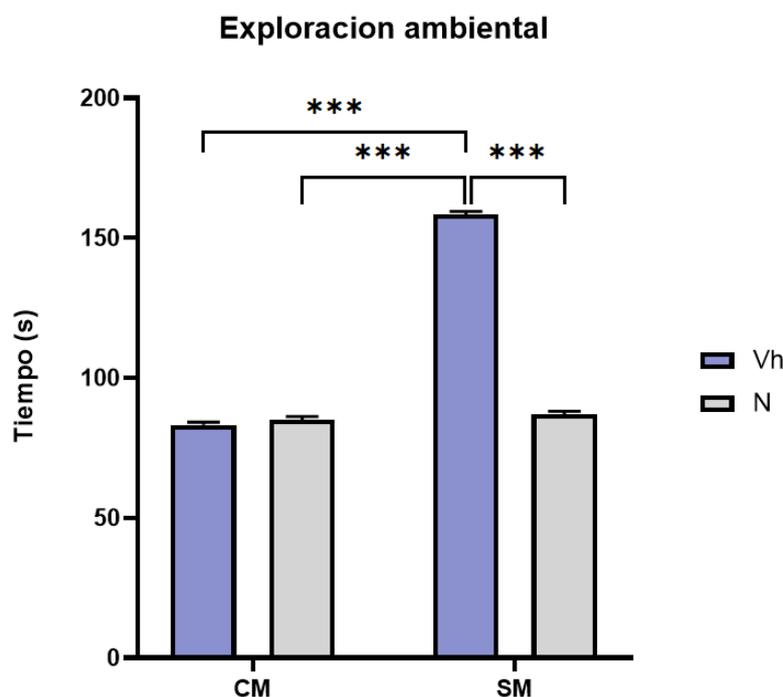


Figura 26. Tiempo promedio de exploración ambiental. En la gráfica se muestra el tiempo promedio (segundos) que los individuos pasaron explorando el área de prueba durante los primeros 5 minutos de la prueba de novedad social. Cuidado materno-Vehículo (CM-Vh), Cuidado materno-Nicotina (CM-N), Separación materna-Vehículo (SM-Vh), Separación materna-Nicotina (SM-N). Los datos se presentan como la media + ESM. ‘\*\*\*\*’ $p < 0.001$  ‘\*\*\*’ $p < 0.01$  ‘\*\*’ $p < 0.05$ .

## 10.4 Acercamientos

De acuerdo con la prueba de Shapiro Wilk, los datos del número total de acercamientos mostraron una distribución no normal ( $p=0.00221$ ). La prueba de Levene mostró homocedasticidad de varianzas entre los grupos ( $p=0.626$ ) sin transformación de los datos. La prueba de ANOVA indicó un efecto significativo del Cuidado ( $F(1,20)=10.46$ ,  $p=0.004161$ ), del tratamiento ( $F(1,20)=22.03$ ,  $p=0.000139$ ), y una interacción entre ambos factores ( $F(1,20)=10.21$ ,  $p=0.004550$ ). La prueba *post hoc* de Tukey demostró que existen diferencias significativas en el número de acercamientos entre los grupos 1) CM-N ( $19.1 \pm 0.862$ ) y SM-Vh ( $11.2 \pm 1.020$ ;  $p < 0.0001$ ), 2) entre los grupos SM-N ( $18.8 \pm 0.931$  acercamientos) y SM-Vh ( $11.2 \pm 1.020$  acercamientos;  $p=0.0001$ ) y 3) entre CM-Vh ( $17.5 \pm 0.931$  acercamientos) y SM-Vh ( $11.2 \pm 1.020$  acercamientos;  $p=0.0010$ ) (Figura 27).

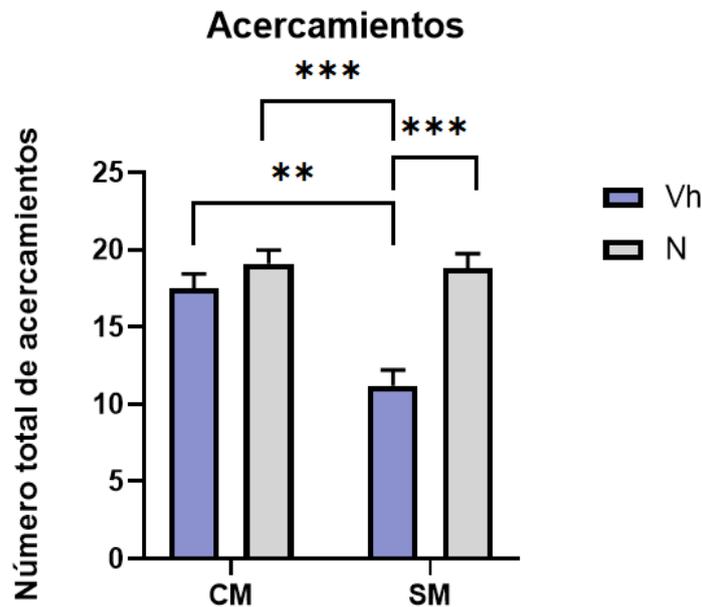


Figura 27. Número total de acercamientos. En la gráfica se muestra el promedio del número de acercamientos con el individuo novedoso que presentaron durante los primeros 5 minutos de la prueba de novedad social. Cuidado materno-Vehículo (CM-Vh), Cuidado materno-Nicotina (CM-N), Separación materna-Vehículo (SM-Vh), Separación materna-Nicotina (SM-N). Los datos se presentan como la media + ESM. ‘\*\*\*’ $p < 0.001$  ‘\*\*’ $p < 0.01$  ‘\*’ $p < 0.05$ .

## 10.5 Acicalamiento

La prueba de Shapiro-Wilk mostró una distribución normal ( $p=0.2746$ ). De igual manera, la prueba de Levene mostró homocedasticidad de varianzas entre los grupos ( $p=0.710$ ). Por su parte, la ANOVA mostró que no hubo un efecto significativo del Cuidado ( $F(1,20)=2.588$ ,  $p=0.123332$ ), y tampoco hubo interacción entre los factores Cuidado y Tratamiento ( $F(1,20)=0.623$ ,  $p=0.439025$ ); pero, si hubo un efecto significativo del Tratamiento ( $F(1,20)=16.198$ ,  $p=0.000664$ ). La prueba *post hoc* de Tukey indicó la existencia de diferencias significativas entre los grupos 1) SM-N ( $11.02 \pm 1.48$  s) y CM-Vh ( $2.71 \pm 1.48$  s;  $p=0.0038$ ), y 2) entre los grupos SM-N ( $11.02 \pm 1.48$  s) y SM-Vh ( $3.78 \pm 1.62$  s;  $p=0.0171$ ) (Figura 28).

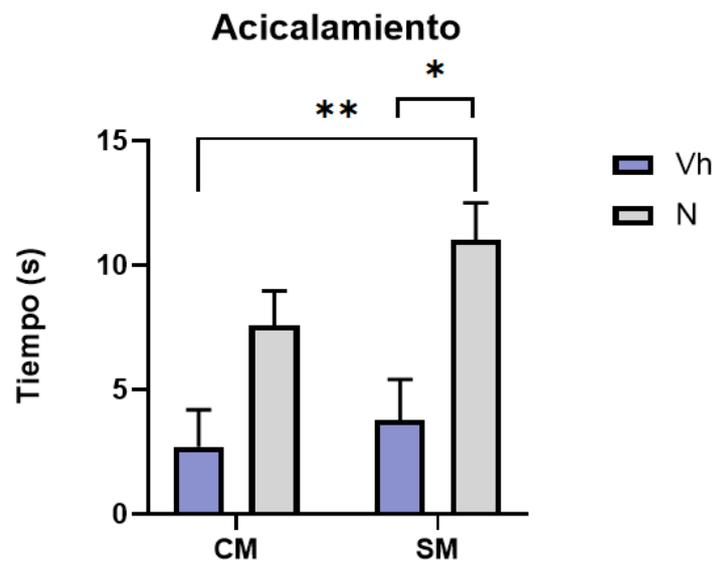


Figura 28. Tiempo promedio de acicalamiento. En la gráfica se muestra el tiempo promedio (segundos) que los individuos pasaron acicalándose durante los primeros 5 minutos de la prueba de novedad social. Cuidado materno-Vehículo (CM-Vh), Cuidado materno-Nicotina (CM-N), Separación materna-Vehículo (SM-Vh), Separación materna-Nicotina (SM-N). Los datos se presentan como la media + ESM. ‘\*\*\*’ $p < 0.001$  ‘\*\*’ $p < 0.01$  ‘\*’ $p < 0.05$ .

## 10.6 Latencia

De acuerdo con la prueba de Shapiro-Wilk, los datos del tiempo de latencia no fueron normales ( $p=4.023e-05$ ) por lo que se utilizó una transformación a raíz cuadrada de los datos. La prueba de Levene indicó homocedasticidad de varianzas entre los grupos ( $p=0.318$ ) con la transformación de los datos. La prueba ANOVA mostró un efecto significativo del Cuidado ( $F(1,20)=60.6$ ,  $p=0.021$ ), un efecto significativo del Tratamiento ( $F(1,20)=120.1$ ,  $p=4.36e-05$ ), y una relación entre ambos factores ( $F(1,20)=126.9$ ,  $p=3.31e-06$ ). La prueba *post hoc* de Tukey indicó que existen diferencias significativas entre los grupos 1) CM-N ( $0.96\pm 0.157$  s) y SM-Vh ( $2.466\pm 0.186$  s;  $p<0.0001$ ), también 2) entre los grupos SM-N ( $0.40\pm 0.170$  s) y SM-Vh ( $2.466\pm 0.186$  s;  $p<0.0001$ ) y 3) entre los grupos CM-Vh ( $0.856\pm 0.170$  s) y SM-Vh ( $2.466\pm 0.186$  s;  $p<0.0001$ ) (Figura 29).

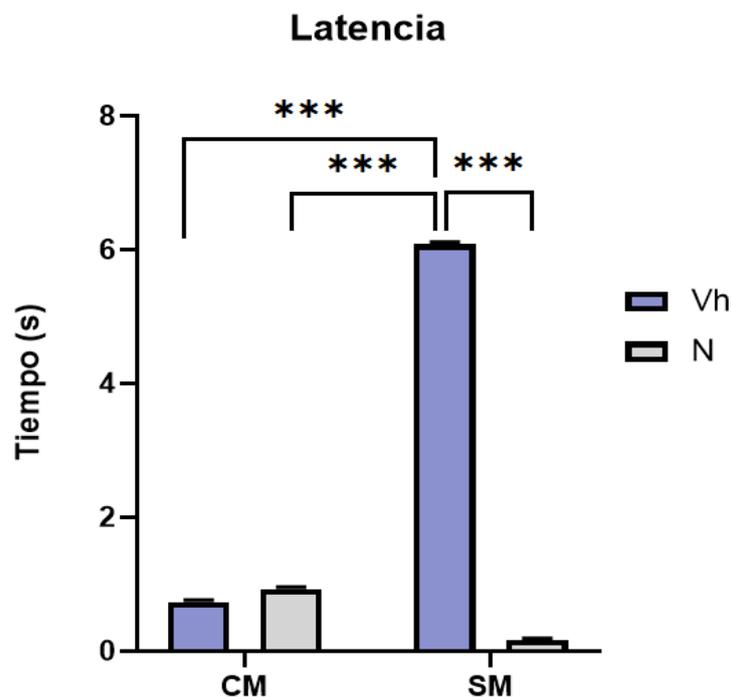


Figura 29. Tiempo promedio de latencia. En la gráfica se muestra el tiempo promedio (segundos) que los individuos tardaron en acercarse por primera vez al individuo novedoso durante los primeros 5 minutos de la prueba de novedad social. Cuidado materno-Vehículo (CM-Vh), Cuidado materno-Nicotina (CM-N), Separación materna-Vehículo (SM-Vh), Separación materna-Nicotina (SM-N). Los datos se presentan como la media  $\pm$  ESM. ‘\*\*\*’  $p < 0.001$  ‘\*\*’  $p < 0.01$  ‘\*’  $p < 0.05$ .

### 10.7 Intento de traspaso

La prueba de Shapiro-Wilk mostró una distribución normal ( $p=0.1441$ ). La prueba de Levene indicó que hay homocedasticidad de varianzas entre los grupos ( $p=0.0138$ ). La prueba de ANOVA mostró que no hubo un efecto significativo del Cuidado ( $F(1,20)=1.06$ ,  $p=0.316$ ) y un efecto significativo del Tratamiento ( $F(1,20)=30.71$ ,  $p=2e-05$ ) y no hay una interacción entre los factores Cuidado y Tratamiento ( $F(1,20)=0.00$ ,  $p=0.997$ ). La prueba *post hoc* de Tukey indicó que existen diferencias significativas entre el grupo 1) CM-N ( $11.49 \pm 5.64$  s) y CM-Vh ( $45.37 \pm 6.10$  s;  $p=0.0043$ ), 2) entre los grupos CM-N ( $11.49 \pm 5.64$  s) y SM-Vh ( $39.34 \pm 6.68$  s;  $p=0.0089$ ), 3) entre los grupos SM-N ( $5.41 \pm 6.10$  s) y CM-Vh ( $45.37 \pm 6.10$  s;  $p=0.0039$ ), y 4) entre los grupos SM-N ( $5.41 \pm 6.10$  s) y SM-Vh ( $39.34 \pm 6.68$  s;  $p=0.0078$ ) (Figura 30).

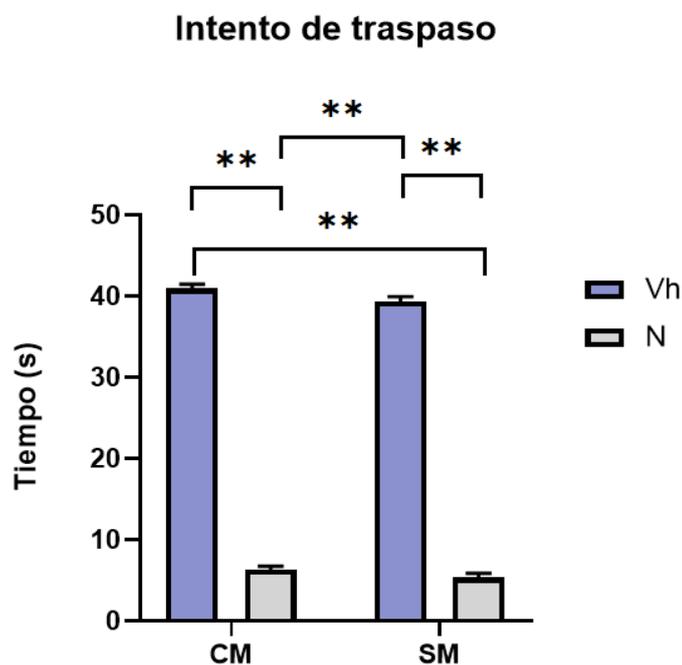


Figura 30. Tiempo promedio de intento de traspaso. En la gráfica se muestra el tiempo promedio (segundos), que los individuos intentaron traspasar la malla hacia el individuo novedoso durante los primeros 5 minutos de la prueba de novedad social. Cuidado materno-Vehículo (CM-Vh), Cuidado materno-Nicotina (CM-N), Separación materna-Vehículo (SM-Vh), Separación materna-Nicotina (SM-N). Los datos se presentan como la media  $\pm$  ESM. ‘\*\*\*’ $p < 0.001$  ‘\*\*’ $p < 0.01$  ‘\*’ $p < 0.05$ .

## 11 DISCUSIÓN

### 11.1 Peso

Los resultados confirman que la separación materna influye negativamente sobre el peso de las crías. Estos resultados se encuentran en línea con estudios previos realizados por otros grupos de investigación (McIntosh *et al.*, 1999; Iwasaki *et al.*, 2000; Litvin *et al.*, 2010).

El peso corporal de las ratas con separación materna fue menor que el de las ratas sin separación materna a partir del DPN 11 (*Figura 23*). De manera similar, Iwasaki *et al.* (2000), reportaron que ratas macho y hembras con SM presentaron menor peso después del destete en comparación con las ratas control. Sin embargo, después de las 12 semanas, las ratas criadas con SM presentan un rebote y llegan a exhibir el mismo peso, o mayor que las ratas control.

En el mismo sentido, ratas de ambos sexos separadas por 3 horas presentan menor peso hasta el DPN 21 a comparación de ratas que solo se separaron 15 minutos y sin separación materna (McIntosh *et al.*, 1999). Tomando en cuenta estos últimos datos, se puede observar que a medida que aumenta el tiempo de separación materna, también aumenta la pérdida de peso. En consonancia con estos resultados, nuestro estudio reveló que la SM de 4 horas también resultó en menor peso de los individuos.

De manera interesante, en un patrón similar a lo observado en nuestros resultados, un tiempo de separación materna de 6 horas mostró que no existen diferencias de pesos en los primeros días postnatales. Sin embargo, después de 2 semanas los grupos con SM de 6 horas empiezan ganar peso más lentamente y, por lo tanto, a presentar un menor peso en comparación con los grupos control y de separación por 15 minutos (Lundberg *et al.*, 2017).

Sin embargo, existen inconsistencias en el efecto de la separación materna sobre el peso. En este sentido, se ha reportado que solo existe un menor peso en los días postnatales 2-13, y posteriormente es igual al de los grupos control (Litvin *et al.*, 2010). Por su parte, Slotten *et al.*, (2006), encontraron que no existen diferencias en el peso de ratas cuando son separadas de la madre por 3 horas en comparación con el grupo control, incluso, en los DPN 60 y 90, ratas con SM pesaban más que las control. Así mismo, Gracia-Rubio *et al.* (2016), reportaron que la SM de 8 horas del DPN 6-16 en ratones, no provocó ningún efecto sobre el peso de ratas. Sin

embargo, esta variabilidad en resultados se puede deber a los diferentes procedimientos y modelos empleados, el tipo de cepa, y duración de la separación.

Una explicación a la disminución del peso podría ser que la SM por más de 2 horas disminuye los niveles de la hormona del crecimiento. Por lo tanto, afectaría el desarrollo de los individuos durante este periodo crítico de crecimiento. Así también, las manipulaciones tempranas afectan las interacciones madre-cría y la disponibilidad de leche materna (Meaney *et al.*, 1993; Vallée *et al.*, 1996). Además, se ha observado que estímulos que inducen estrés leve crónico e impredecible (CUMS) (ej. privación de agua, inversión del ciclo de luz, inclinación de la jaula), más la SM, tienden a disminuir aún más el peso que la SM por sí sola. Más aún, se ha observado que la combinación de ambos factores induce un comportamiento similar a la depresión, siendo la pérdida de peso uno de los síntomas (Huang *et al.*, 2021).

Otra posible explicación es que, al estar separados de su madre, los animales entran en una leve hipotermia, provocando un aumento en los niveles de hormonas tiroideas (tiroxina) y mejorando el metabolismo de las grasas, induciendo así una pérdida de peso (d'Amore *et al.*, 1995). Además, la SM también afecta reguladores de la ingesta de alimentos (leptina, neuropéptido Y, pro-opiomelanocortina y serotonina), disminuyendo el apetito y la ingesta de alimentos (de Souza *et al.*, 2020).

## **11.2 Investigación social**

La interacción social es más gratificante y con mayor frecuencia en individuos jóvenes (Gómez-Gómez *et al.*, 2019). Sin embargo, los resultados de nuestro estudio muestran que la SM disminuyó el tiempo de investigación social (*Figura 25*). En este sentido, se ha reportado que la SM reduce la motivación de participar en actividades placenteras (Huot *et al.*, 2001; Birn *et al.*, 2017). Además, la disminución del tiempo de interacción con un individuo novedoso podría estar relacionado con el aumento de ansiedad y estrés inducidos por la SM, durante una interacción o novedad social (Campos *et al.*, 2013).

Contrario a nuestros hallazgos, existen estudios indicando que la SM no afecta la conducta social. Por ejemplo, Kambali *et al.* (2019), encontraron que ratas sometidas a SM de 6 horas, del DPN 4-14, no muestran diferencias en el tiempo de investigación social en comparación con el grupo control. No obstante, existen otros estudios que si reportan una reducción del

tiempo de investigación social (Lee *et al.*, 2019; Houwing *et al.*, 2019; Mejía-Chávez *et al.*, 2021)

Por ejemplo, Girardi *et al.* (2014), reportaron una disminución en el tiempo de investigación social en individuos sometidos a una SM de 22 horas en el DPN 10. Por su parte, Mejía-Chávez *et al.* (2021), encontraron una reducción en el tiempo de investigación social, al realizar SM del día 1-21 postnatal durante 4 horas. De este modo, nuestros resultados replican el resultado de la metodología, es decir, el procedimiento de separación materna y la prueba de interacción social. Por lo tanto, las diferencias en los resultados de los otros estudios podrían atribuirse al procedimiento y tiempo de SM empleado, la edad y la cepa.

Por ello, el grupo con SM y administración de nicotina presentó un tiempo mayor de investigación social a comparación del grupo con separación materna sin nicotina, aunque no fue mayor que el tiempo de investigación social invertido por aquellos individuos criados con CM y administración de nicotina (*Figura 25*). Estos resultados sugieren que: 1) la nicotina aumenta significativamente el interés social, tanto en individuos con CM como en aquellos con SM y 2) la nicotina reestablece la curiosidad social a niveles basales en individuos con déficits sociales.

Los resultados concuerdan con estudios anteriores, en donde la interacción social aumenta al administrar una baja dosis de nicotina (0.05, 0.1, 0.25 mg/Kg), tanto en ratas que han permanecido en aislamiento como en las que han sido alojadas en grupo, pero disminuye con dosis altas de nicotina (0.45 mg/Kg) (Cheeta *et al.*, 2001). Cabe señalar que el tiempo entre la administración de nicotina y la prueba de interacción social es importante, pues se ha demostrado la interacción social disminuye 5 minutos después de la inyección de nicotina y aumenta después de los 30 minutos (Irvine *et al.*, 1999). En nuestro estudio, se administró una dosis baja (0.075 mg/kg) y la prueba de interacción se realizó 30 minutos después de la administración de nicotina; por lo tanto, se podría sugerir que observamos la fase de mayor aumento en el tiempo de investigación social. Es muy probable que este aumento sea consecuencia de un efecto ansiolítico de la nicotina, pues algunos estudios han reportado que la nicotina disminuye la ansiedad (File *et al.*, 1998, Cheeta *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que la separación materna afecta la capacidad de algunos núcleos cerebrales como la mPFC, NAc, PVN y MeA, áreas implicadas en la conducta social y sistema de

recompensa, lo que tendría consecuencias en la motivación social (Mejía-Chávez *et al.*, 2021). Sumando lo anterior, se ha observado que la SM también afecta el sistema de serotoninérgico y provoca disfunción del sistema central dopaminérgico (He *et al.*, 2020), consistente con una disminución en el interés de interactuar con un individuo novedoso. Sin embargo, la nicotina aumenta la liberación de serotonina en la corteza cerebral y el hipotálamo (Seth *et al.*, 2002). Igualmente, libera dopamina en el NAc a través de la estimulación de neuronas dopaminérgicas del VTA (Molero *et al.*, 2005). Por lo tanto, la estimulación del sistema serotoninérgico y dopaminérgico inducida por la nicotina podría estar detrás del aumento de la investigación social.

### **11.3 Exploración ambiental**

Los resultados muestran que la SM aumentó la exploración ambiental, evidenciando un aumento en el tiempo dedicado al desplazamiento y exploración del entorno, pero una disminución en el tiempo dedicado a investigar al individuo novedoso. Sin embargo, con la administración de nicotina, se observó que la exploración del ambiente disminuyó y el tiempo investigando al individuo novedoso aumentó (*Figura 26*).

Generalmente, los estudios que involucran la SM evalúan el comportamiento exploratorio o actividad locomotora mediante pruebas de campo abierto. En este sentido, algunos estudios han reportado que la SM disminuye la exploración ambiental (Girardi *et al.*, 2014; Bondar *et al.*, 2018; Scopano *et al.*, 2023). No obstante, algunos han reportado que la SM aumenta la actividad locomotora y comportamientos defensivos-exploratorios (Wang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2020).

En modelos animales, la disminución en el tiempo de exploración de un ambiente novedoso puede interpretarse como un aumento en el nivel de miedo y, en el caso de un aumento en el tiempo de exploración, se atribuye a una mayor estimulación en comparación con una condición estándar (Modlinska *et al.*, 2018). Por lo tanto, el hecho de que los animales con SM aumenten el tiempo de exploración ambiental, pero disminuyan el tiempo de investigación social, sugiere que la SM provocó mayor interés por explorar el área de prueba, a pesar de haber sido sometidas a una habituación de 30 minutos un día antes de la prueba de novedad social.

El efecto estimulante de la nicotina depende de la edad, ya que aumenta la locomoción en ratas adolescentes y la reduce en la edad adulta (Cao *et al.*, 2010). No obstante, esto sucede cuando no compite contra otro estímulo, como un individuo novedoso. Se ha observado que una dosis de nicotina de 0.5 mg/Kg aumenta la actividad locomotora, pero una dosis de 0.2 mg/Kg no produce ningún efecto; por el contrario, una dosis de 0.8 mg/Kg disminuye las medidas de exploración en general. Por consiguiente, una dosis alta de nicotina podría reducir el miedo o ansiedad del animal y dosis bajas aumentan la curiosidad en un entorno nuevo (Lee, 1985).

#### **11.4 Acercamientos**

El número de acercamientos del grupo con SM y administración de nicotina (SM-N) fue mayor a comparación del grupo con separación materna y administración del vehículo (SM-Vh) (*Figura 27*), esto sugiere que la nicotina aumenta el número de acercamientos en ratas con SM en comparación con el grupo SM-Vh que disminuye el número de acercamientos.

El aumento en el número de acercamientos en el grupo con nicotina podría atribuirse a que las ratas adolescentes son más sensibles a los efectos gratificantes de la nicotina y menos sensibles a los efectos aversivos. De igual modo, son más sensibles al efecto ansiolítico de la nicotina, por lo que pudo haber aumentado los acercamientos al conespecífico novedoso (Shram *et al.*, 2006). La interacción social en ratas adolescentes disminuye los niveles de CORT inducidos por la novedad, por lo que los efectos gratificantes de la sociabilidad mejoran los efectos gratificantes de la nicotina aumentando la interacción y por ende los acercamientos (Thiel *et al.*, 2009).

Sin embargo, un estudio demostró que la nicotina provoca una disminución tanto en el número de acercamientos sociales, como en el tiempo del acercamiento en ratas. Cabe señalar que, esta disminución podría estar asociada al empleo de una dosis alta de nicotina (0.6 mg/kg) (Pentkowski *et al.*, 2011), lo cual podría explicar inconsistencias con nuestros resultados.

Por su parte, los datos del grupo que solo experimentó SM concuerdan con los resultados de otros estudios (Endo *et al.*, 2021; Mejía-Chávez *et al.*, 2021; Rombaut *et al.*, 2023), en donde la separación materna reduce el número de acercamientos sociales. Por ejemplo, un estudio reportó que la SM realizada del DPN 2 al 21 durante 3 horas al día disminuyó el número de acercamientos, a comparación de un grupo con SM de 15 minutos 3 veces al día (Rombaut et

al., 2023). Además, replicamos los resultados obtenidos por Mejía-Chávez et al., (2021), utilizando el mismo procedimiento de separación materna.

### **11.5 Acicalamiento**

Los individuos del grupo con SM y administración de nicotina (SM-N) pasaron más tiempo acicalándose a comparación del grupo de separación materna sin nicotina (SM-Vh) (*Figura 28*) y, como se ha reportado, la disminución de acicalamiento es un indicador de estrés o ansiedad (van Erp *et al.*, 1994). Por otro lado, la combinación de la SM y la novedad social aumenta los niveles de corticoides, provocando así una hiperactivación de los sistemas de estrés, por lo que conlleva a una reducción en la frecuencia del acicalamiento (Levine, 2002).

Nuestros resultados son consistentes con estudios anteriores. La nicotina, en ratas que no son sometidas a separación materna, aumenta las conductas de aseo (Zarrindast *et al.*, 1998; Casarrubea *et al.*, 2015). Se ha observado que el acicalamiento en ratas es inducido por la nicotina indirectamente a través de un mecanismo dopaminérgico D1; aunque, también pueden estar implicados mecanismos colinérgicos, muscarínicos y nicotínicos; todos ellos involucrados en el efecto ansiolítico de la nicotina (Zarrindast *et al.*, 1998). También se ha observado que estímulos novedosos, en este caso la novedad social y la nicotina, aumentan y mejoran la manifestación de acicalamiento en ratas (Jolles *et al.*, 1979).

En cuanto a la SM, se ha observado que induce una disminución en el tiempo de acicalamiento (Vivinetto *et al.*, 2013; Rombaut et al., 2023). Por otra parte, una SM del DPN 2 al 21 durante 3 horas al día, disminuyó el tiempo de acicalamiento a comparación de un grupo con SM más corta (15 minutos 3 veces al día) y uno control sin SM (Rombaut *et al.*, 2023). De igual manera, una SM de 4.5 horas diarias del DPN1-21 provocó un menor tiempo de acicalamiento a comparación de un grupo control en una prueba de campo abierto (Vivinetto *et al.*, 2013).

El acicalamiento es un comportamiento innato, que a menudo se manifiesta como una reacción a estímulos inesperados, y situaciones de conflicto, por lo que también se ha establecido como índice de habituación. Por lo tanto, otra razón de la disminución del acicalamiento inducido por la SM, aparte de la activación del HPA, es que la SM produce una habituación inapropiada a la novedad, reduciendo las conductas de aseo (Kalueff *et al.*, 2016). Otra posible razón es que

la separación materna provoca que la novedad social sea un estímulo estresante, y no permite una rápida habituación al conespecífico novedoso (Kalueff *et al.*, 2016).

### **11.6 Latencia**

El grupo de SM con administración de nicotina tuvo menor tiempo de latencia en comparación del grupo de SM sin nicotina (SM-Vh) (*Figura 29*). Estos resultados son consistentes con Mejía-Chavéz *et al.*, (2021), en donde la SM aumentó el tiempo de latencia comparado con el grupo control.

No existen trabajos que estudien la latencia de acercamiento social con o sin SM, sin embargo, el aumento en el tiempo que tarda un individuo en acercarse a uno desconocido se atribuye al aumento en los niveles de ansiedad inducidos por la separación materna (Campos *et al.*, 2013). Por otra parte, el efecto de la nicotina, que está mediado por la liberación de neurotransmisores como serotonina y DA en el sistema de recompensa, podría aumentar la motivación de interacción social, provocando que el individuo se acerque rápidamente a investigar al conespecífico novedoso a pesar de haber sido sometido a SM (Dani y De Biasi, 2001).

### **11.7 Intento de traspaso**

El tiempo que invirtieron intentando traspasar al otro lado de la malla fue menor en el grupo de SM con administración de nicotina (SM-N) que el grupo de separación materna sin nicotina (SM-Vh) (*Figura 30*).

Los animales fueron habituados un día antes de la prueba de novedad social para que el ambiente (malla) no fuera un estímulo novedoso, y simplemente proporcionara un contacto físico limitado, sin conductas agresivas y de juego. Sin embargo, permitía el olfato y un contacto entre vibrisas (Gómez-Gómez *et al.*, 2019). Se ha reportado que a pesar de esta restricción (malla), la interacción sigue siendo gratificante y el juego no es necesario para la recompensa social; e incluso, encontrarse con un individuo al otro lado de la malla es más gratificante que la presencia de un objeto no social (Peartree *et al.*, 2011). Por lo tanto, la exposición limitada de dos individuos separados por una barrera es un modelo válido para examinar los efectos de la interacción social (Peartree *et al.*, 2011).

El efecto ansiolítico inducido por la nicotina pudo haber disminuido los intentos de traspaso. En los videos tomados para analizar la conducta social, se observó que los individuos con SM intentaban traspasar al otro lado de una manera ansiosa, ya que llegaron a un punto de intentar romper la malla con los dientes o con golpes, con lo cual sin la malla se pudo haber desencadenado un comportamiento agresivo, y solo buscaban un contacto con la malla y no con el conoespecífico novedoso. En el grupo control (CM-Vh) se observó un intento de traspaso muy sutil, ya que solo rascaban la viruta cerca de la malla. No se encontraron estudios donde se midiera el tiempo de intento de traspaso de la barrera.

## **12 CONCLUSIÓN**

La nicotina compensa los déficits sociales ocasionados por la separación materna, aumentando la interacción social ante un conespecífico novedoso y restableciendo la motivación de socialización. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para estudiar lo que sucede a nivel cerebral y neuroendocrino.

Los resultados coinciden con las observaciones del incremento de la interacción social en ratas con administración de nicotina y disminución de interacción social en ratas con SM, ahora con este estudio logramos observar el efecto e interacción de ambos factores.

Con base en los resultados se sugiere que la nicotina a un nivel clínico podría servir como un antidepresivo por sus efectos ansiolíticos, en personas que han sufrido eventos traumáticos en los primeros años de vida. Sin embargo, se podrían estudiar otras alternativas para revertir los déficits causados por la SM.

## 13 REFERENCIAS

Aisa B., Tordera R., Lasheras B., Del Río J., Ramírez M. J. (2007). Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 32:256–266. doi: 10.1016/j.psyneuen.2006.12.013

Alkam T., Nabeshima T. (2019). Molecular mechanisms for nicotine intoxication. *Neurochem Int*. 125:117-126. doi: 10.1016/j.neuint.2019.02.006.

Asadi E., Khodagholi F., Asadi S., Mohammadi-Kamsorkh H., Kaveh N., Maleki A. (2021). Quality of early-life maternal care predicts empathy-like behavior in adult male rats: Linking empathy to BDNF gene expression in associated brain regions. *Brain Res*. 15:1767-147568. doi: 10.1016/j.brainres.2021.147568.

Balfour D. J., Fagerström K. O. (1996). Pharmacology of nicotine and its therapeutic use in smoking cessation and neurodegenerative disorders. *Pharmacol Ther*. 72(1):51-81. doi: 10.1016/s0163-7258(96)00099-x

Baum M. J. Kelliher, K. R. (2009). Complementary roles of the main and accessory olfactory systems in mammalian mate recognition. *Annu Rev Physiol*. 71:141-60. doi: 10.1146/annurev.physiol.010908.163137

Becker K., Abraham A., Kindler J., Helmeke C., Braun K. (2007). Exposure to neonatal separation stress alters exploratory behavior and corticotropin releasing factor expression in neurons in the amygdala and hippocampus. *Developmental Neurobiology*. 67(5):617–629. doi: 10.1002/dneu

Baik J. H. (2020). Stress and the dopaminergic reward system. *Exp Mol Med*. 52(12):1879-1890. doi: 10.1038/s12276-020-00532-4

Benowitz N. L. (1990). Clinical pharmacology of inhaled drugs of abuse: implications in understanding nicotine dependence. *NIDA Res Monogr*. 99:12-29.

Berridge K. C. (2004). Motivation concepts in behavioral neuroscience. *Physiology & Behavior*. 81:179-209. doi: 10.1016/j.physbeh.2004.02.004

Berridge K. C. (2007). The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology (Berl)*. 191(3):391-431. doi: 10.1007/s00213-006-0578-x

Birn R. M., Roeber B. J., Pollak S. D. (2017). Early childhood stress exposure, reward pathways, and adult decision making. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 114(51):13549-13554. doi: 10.1073/pnas.1708791114

Bondar N. P., Lepeshko A. A., Reshetnikov V. V. (2018). Effects of Early-Life Stress on Social and Anxiety-Like Behaviors in Adult Mice: Sex-Specific Effects. *Behav Neurol*. 1538931. doi: 10.1155/2018/1538931

Brody A. L. (2006). Functional brain imaging of tobacco use and dependence. *J Psychiatr Res*. 40(5):404-18. doi: 10.1016/j.jpsychires.2005.04.012

Cabib S., Puglisi-Allegra S., (2012). The mesoaccumbens dopamine in coping with stress. *Neurosci Biobehav Rev*. 36(1):79-89. doi: 10.1016/j.neubiorev.2011.04.012

Campos A. C., Fogaça M. V., Aguiar D., and Guimaraes F. S. (2013). Animal models of anxiety disorders and stress. *Braz. J. Psychiatry*. 35:S101–S111. doi: 10.1590/1516-4446-2013-1139

Cao J., Belluzzi J.D., Loughlin S. E., Dao J. M., Chen Y., Leslie F. M. (2010). Locomotor and stress responses to nicotine differ in adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 96(1):82-90. doi: 10.1016/j.pbb.2010.04.010

Čater M., Majdič G. (2021). How early maternal deprivation changes the brain and behavior?. *European Journal of Neuroscience*. 00:1–18. doi: <https://doi.org/10.1111/ejn.15238>

Cardinal R.N., Parkinson J. A., Hall J., Everitt B. J. (2002). Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neurosci Biobehav Rev*. 26: 321–352. doi: 10.1016/s0149-7634(02)00007-6

Casarrubea M., Davies C., Faulisi F., Pierucci M., Colangeli R., Partridge L., Chambers S., Cassar D., Valentino M., Muscat R., Benigno A., Crescimanno G., Di Giovanni G. (2015). Acute nicotine induces anxiety and disrupts temporal pattern organization of rat exploratory behavior in hole-board: a potential role for the lateral habenula. *Front Cell Neurosci.* 9:197. doi: 10.3389/fncel.2015.00197

Champagne F. A., Francis D. D., Mar A., Meaney M. J. (2003). Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol Behav.* 79(3):359-71. doi: 10.1016/s0031-9384(03)00149-5

Cheeta S., Irvine E., File S. E. (2001). Social isolation modifies nicotine's effects in animal tests of anxiety. *British Journal of Pharmacology.* 132(7):1389–1395. doi: 10.1038/sj.bjp.0703991

Cheeta S., Irvine E. E., Kenny P. J., File S. E. (2001). The dorsal raphe nucleus is a crucial structure mediating nicotine's anxiolytic effects and the development of tolerance and withdrawal responses. *Psychopharmacology (Berl).* 155(1):78-85. doi: 10.1007/s002130100681

Choi G. B., Dong H. W., Murphy A. J., Valenzuela D. M., Yancopoulos G. D., Swanson L. W., Anderson D. J. (2005). Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. *Neuron.* 46:647–60. doi: 10.1016/j.neuron.2005.04.011

Chocyk A., Przyborowska A., Makuch W., Majcher-Maślanka I., Dudys D., Wedzony K. (2014). Los efectos de la adversidad temprana en los recuerdos de miedo en ratas adolescentes y su persistencia hasta la edad adulta. *Comportamiento. Res. cerebral.* 264:161–172. doi: 10.1016/j.bbr.2014.01.040

d'Amore A., Mazzucchelli A., Loizzo A. (1995). Long-term changes induced by neonatal handling in the nociceptive threshold and body weight in mice. *Physiol Behav.* 57(6):1195-7. doi: 10.1016/0031-9384(94)00303-m

Dani J. A., De Biasi M. (2001). Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacol Biochem Behav.* 70(4):439-46. doi: 10.1016/s0091-3057(01)00652-9

Deschênes M., Kurnikova A., Elbaz M., Kleinfeld D. (2016). Circuits in the Ventral Medulla That Phase-Lock Motoneurons for Coordinated Sniffing and Whisking. *Neural Plast.* 2016:7493048. doi: 10.1155/2016/7493048

de Souza J. A., da Silva M. C., Costa F. C. O., de Matos R. J. B., de Farias-Campina R. C., do Amaral-Almeida L.C., da Silva A. A. M., Cavalcante T. C. F., Tavares G. A., de Souza S. L. (2020). Early life stress induced by maternal separation during lactation alters the eating behavior and serotonin system in middle-aged rat female offspring. *Pharmacol Biochem Behav.* 192:172908. doi: 10.1016/j.pbb.2020.172908

Donny E. C., Caggiula A. R., Rowell P. P., Gharib M. A., Maldovan V., Booth S., Mielke M. M., Hoffman A., McCallum S. (2000). Nicotine self-administration in rats: estrous cycle effects, sex differences and nicotinic receptor binding. *Psychopharmacology (Berl.)* 151(4):392-405. doi: 10.1007/s002130000497.

Endo N., Makinodan M., Mannari-Sasagawa T., Horii-Hayashi N., Somayama N., Komori T., Kishimoto T., Nishi M. (2021). The effects of maternal separation on behaviours under social-housing environments in adult male C57BL/6 mice. *Sci Rep.* 11(1):527. doi: 10.1038/s41598-020-80206-3

Fà M., Carcangiu G., Passino N., Ghiglieri V., Gessa G.L., Mereu G. (2000). Cigarette smoke inhalation stimulates dopaminergic neurons in rats. *Neuroreport.* 11(16):3637-9. doi: 10.1097/00001756-200011090-00047

Feldman J. L., Kam K. (2015). Facing the challenge of mammalian neural microcircuits: taking a few breaths may help. *J Physiol.* 593(1):3-23. doi: 10.1113/jphysiol.2014.277632

Faravelli C., Lo Sauro C., Godini L., Lelli L., Benni L., Pietrini F. (2012). Childhood stressful events, HPA axis and anxiety disorders. *World J. Psychiatry* 2: 13–25. doi: 10.5498/wjp.v2.i1.13

Ferguson S. M., Brodtkin J. D., Lloyd G. K., Menzaghi F. (2000). Antidepressant-like effects of the subtype-selective nicotinic acetylcholine receptor agonist, SIB-1508Y, in the learned helplessness rat model of depression. *Psychopharmacology*.152:295–303. doi: 10.1007/s002130000531

File S. E., Cheeta S., Kenny P. J. (2000). Neurobiological mechanisms by which nicotine mediates different types of anxiety. *Eur J Pharmacol*. 393(1-3):231-6. doi: 10.1016/s0014-2999(99)00889-4.

File S. E., Kenny P. J., Ouagazzal A. M. (1998). Bimodal modulation by nicotine of anxiety in the social interaction test: role of the dorsal hippocampus. *Behav Neurosci*. 112(6):1423-9. doi: 10.1037//0735-7044.112.6.1423

Girardi N. C. E., Zanta N. C., Suchecki D. (2014). Neonatal stress induced affective changes in adolescent Wistar rats: early signs of schizophrenia-like behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 8:319. doi: 10.3389/fnbeh.2014.00319

Glassman A. H. (1993). Cigarette smoking: Implications for psychiatric illness. *Am J Psychiatry*. 150:546–553. doi: 10.1176/ajp.150.4.546

Gómez-Gómez Y. M., Sánchez-Aparicio P., Mejía-Chávez S., García-García F., Pascual-Mathey L.I., Aguilera-Reyes U., Galicia O., Venebra-Muñoz A. (2019). C-Fos immunoreactivity in the hypothalamus and reward system of young rats after social novelty exposure. *NeuroReport*. 30:510-515. doi: 10.1097/WNR.0000000000001236

Goodsell DS. (2004). The molecular perspective: nicotine and nitrosamines. *Oncologist*. 9(3):353-4. doi: 10.1634/theoncologist.9-3-353

Goodson J. L., Evans A. K., Soma K. K. (2005). Neural responses to aggressive challenge correlate with behavior in nonbreeding sparrows. *Neuroreport* 16: 1719–1723. doi: 10.1097/01.wnr.0000183898.47160.15

Goodson J. L., Kabelik D., Kelly A. M., Rinaldi J., Klatt J. D. (2009). Midbrain dopamine neurons reflect affiliation phenotypes in finches and are tightly coupled to courtship. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 8737–8742. doi: 10.1073/pnas.0811821106

Gracia-Rubio I., Moscoso-Castro M., Pozo O. J., Marcos J., Nadal R., Valverde O. (2016). Maternal separation induces neuroinflammation and long-lasting emotional alterations in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 65:104–17. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.09.003

Gunaydin L. A., Grosenick L., Finkelstein J. C., Kauvar I. V., Fenno L. E., Adhikari A., Lammel S., Mirzabekov J. J., Airan R. D., Zalocusky K. A., Tye K. M., Anikeeva P., Malenka R. C., Deisseroth K. (2014). Natural neural projection dynamics underlying social behavior. *Cell*. 157(7):1535-51. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.017

Gunaydin L. A., Grosenick, L. Finkelstein J. C., Kauvar I. V., Fenno L. E., Adhikari A., Lammel S., Mirzabekov J. J., Airan R. D., Zalocusky K. A., Tye K. M., Anikeeva P., Malenka R. C., Deisseroth K. (2014). Natural neural projection dynamics underlying social behavior. *Cell*. 157(7):1535-51. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.017

Haller J., Harold G., Sandi C., Neumann I.D. (2014). Effects of Adverse Early-Life Events on Aggression and Anti-Social Behaviours in Animals and Humans. *J. Neuroendocr*. 26:724–738. doi: 10.1111/jne.12182

Hamel L., Thangarasa T., Samadi O., Ito R. (2017). Caudal Nucleus Accumbens Core Is Critical in the Regulation of Cue-Elicited Approach-Avoidance Decisions. *eNeuro*. 4(1):0330-16.2017. doi: 10.1523/ENEURO.0330-16.2017

Hashikawa K., Hashikawa Y., Falkner A., Lin D. (2016). The neural circuits of mating and fighting in male mice. *Curr Opin Neurobiol*. 38:27-37. doi: 10.1016/j.conb.2016.01.006

He K. J., Zhang Y. T., Wei S. Z., Jiang S. M., Xu L., Ren C., Wang F. (2020). Impact of Maternal Separation on Dopamine System and its Association with Parkinson's Disease. *Neuromolecular Medicine*. 22(3):335-340. doi: 10.1007/s12017-019-08587-x

Heim C., Nemeroff C.B. (2001). The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: Preclinical and clinical studies. *Boil. Psychiatry*. 49:1023–1039. doi: 10.1016/S0006-3223(01)01157-X

Hofer M. A., Shair H. N., Brunelli S. A. (2002). Ultrasonic vocalizations in rat and mouse pups. *Curr Protoc Neurosci*. 8:8-14. doi: 10.1002/0471142301.ns0814s17

Houwing D. J., Ramsteijn A. S., Riemersma I. W., Olivier J. D. A. (2019). Maternal separation induces anhedonia in female heterozygous serotonin transporter knockout rats. *Behav Brain Res*. 356:204-207. doi: 10.1016/j.bbr.2018.08.031

Huang J., Shen C., Ye R., Shi Y., Li W. (2021). The Effect of Early Maternal Separation Combined With Adolescent Chronic Unpredictable Mild Stress on Behavior and Synaptic Plasticity in Adult Female Rats. *Front Psychiatry*. 12:539299. doi: 10.3389/fpsy.2021.539299

Huot R. L., Thirivikraman K. V., Meaney M. J., Plotsky P. M. (2001). Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology*. 158(4):366–373. doi: 10.1007/s002130100701

Hull E. M., Dominguez J. M. (2007). Sexual behavior in male rodents. *Horm Behav*. 52(1):45-55. doi: 10.1016/j.yhbeh.2007.03.030

Ikemoto S., Wise R. A. (2004). Mapping of chemical trigger zones for reward. *Neuropharmacology*. 1:190-201. doi: 10.1016/j.neuropharm

Iwasaki S., Inoue, K., Kiriike N., Hikiji K. (2000). Effect of maternal separation on feeding behavior of rats in later life. *Physiol Behav*. 70(5):551-6. doi: 10.1016/s0031-9384(00)00305-x

Irvine E. E., Cheeta S., File S. E. (1999). Time-course of changes in the social interaction test of anxiety following acute and chronic administration of nicotine. *Behav Pharmacol*. 10(6-7):691-7. doi: 10.1097/00008877-199911000-00016

Irvine E. E., Bagnalasta M., Marcon C., Motta C., Tessari M., File S. E., Chiamulera C. (2001). Nicotine self-administration and withdrawal: modulation of anxiety in the social interaction test in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 153(3):315-20. doi: 10.1007/s002130000586

Jolles J., Rompa-Barendregt J., Gispen W. (1979). Novelty and grooming behavior in the rat. *Behavioral and Neural Biology*. 25(4):563–72. doi: 10.1016/S0163-1047(79)90362-5

Kalueff A. V., Stewart A. M., Song C., Berridge K. C., Graybiel A. M., Fentress J. C. (2016). Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nature Reviews Neuroscience*. 17:45-59. doi: 10.1038/nrn.2015.8

Kambali M. Y., Anshu K., Kutty B. M., Muddashetty R. S., Laxmi T.R. (2019). Effect of early maternal separation stress on attention, spatial learning and social interaction behaviour. *Experimental Brain Research*. 237:1993–2010. doi: <https://doi.org/10.1007/s00221-019-05567-2>

Kappeler P. M., Barrett L., Blumstein D. T., Clutton-Brock T. H. (2013). Constraints and flexibility in mammalian social behaviour: introduction and synthesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 368(1618):20120337. doi: 10.1098/rstb.2012.0337

Kepecs A., Uchida N., Mainen Z. F. (2006). The sniff as a unit of olfactory processing. *Chem Senses*. 31(2):167-79. doi: 10.1093/chemse/bjj016

Kevetter G. A., Winans S. S. (1981). Connections of the corticomедial amygdala in the golden hamster. I. Efferents of the “vomeronasal amygdala.” *J. Comp. Neurol*. 197:81–98. doi: 10.1002/cne.901970107

Klein L. C., Stine M. M., Vandenberg D. J., Whetzel C. A., Kamens H. M. (2004). Sex differences in voluntary oral nicotine consumption by adolescent mice: a dose-response experiment. *Pharmacol Biochem Behav*. 78(1):13-25. doi: 10.1016/j.pbb.2004.01.005

Koob G. F. (2013). Addiction is a reward deficit and stress surfeit disorder. *Frontiers in psychiatry*. 4 (72): 1-18. doi: 10.3389/fpsy.2013.00072

- Koob G. F., Le Moal, M. (2000). *Neurobiology of addiction*. Academic Press.
- Koob G. F., Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology*. 35:1051. doi: 10.1038/npp.2010.4
- Krejci E., Valenzuela I. M.-P., Ameziane R., Akaaboune M. (2006). Acetylcholinesterase dynamics at the neuromuscular junction of live animals. *J Biol Chem*. 281(15):10347–10354. doi: 10.1074/jbc.M507502200
- Kurnikova A., Moore J. D., Liao S. M., Deschênes M., Kleinfeld D. (2017). Coordination of Orofacial Motor Actions into Exploratory Behavior by Rat. *Curr Biol*. 27(5):688-696. doi: 10.1016/j.cub.2017.01.013
- Lee E. H. (1985). Effects of nicotine on exploratory behavior in rats: correlation with regional brain monoamine levels. *Behav Brain Res*. 17(1):59-66. doi: 10.1016/0166-4328(85)90007-5
- Lee E., Rhim I., Lee J. W., Ghim J. W., Lee S., Kim E., Jung M. W. (2016). Enhanced neuronal activity in the medial prefrontal cortex during social approach behavior. *The Journal of Neuroscience*. 36:6926–6936. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0307-16.2016
- Lever C., Burton, S., & O'keefe, J. (2006). Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. *Reviews in the Neurosciences*, 17:111–133. doi: 10.1515/REVNEURO.2006.17.1-2.111
- Levine S. (2001). Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiology and Behavior*. 73:255-260. doi: 10.1016/s0031-9384(01)00496-6
- Levine S. (2005). Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology*. 30(10):939-46. doi: 10.1016/j.psyneuen.2005.03
- Lewis A., Miller J. H., Lea R. A. (2007). Monoamine oxidase and tobacco dependence. *Neurotoxicology*. 28(1):182-95. doi: 10.1016/j.neuro.2006.05.019

Liberles S. D. (2014). Mammalian pheromones. *Annu Rev Physiol.* 76:151-75. doi: 10.1146/annurev-physiol-021113-170334

Lin D., Boyle M. P., Dollar P., Lee H., Lein E. S., Perona P., Anderson D. J. (2011). Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. *Nature.* 470(7333):221-6. doi: 10.1038/nature09736

Litvin Y., Tovote P., Pentkowski N. S., Zeyda T., King L. B., Vasconcellos A. J., Dunlap C., Spiess J., Blanchard D. C., Blanchard R. J. (2010). Maternal separation modulates short-term behavioral and physiological indices of the stress response. *Horm Behav.* 58(2):241-9. doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.03.010

Liu D, Caldji C, Sharma S, Plotsky PM, Meaney MJ. 2000. Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Journal of Neuroendocrinology.* 12(1):5–12. doi: 10.1046 / j.1365-2826.2000.00422.x

Lundberg S., Martinsson M., Nylander I., Roman E. (2017). Altered corticosterone levels and social play behavior after prolonged maternal separation in adolescent male but not female Wistar rats. *Horm Behav.* 87:137-144. doi: 10.1016/j.yhbeh.2016.11.016

Lupien S. J., McEwan B. S., Gunnar M. R., Heim C. (2015). Effects of stress throughout the lifespan of the brain, behavior and cognition. *Nature Reviews.* 10:434-445. doi: 10.1038 / nrn2639

Marais L., van Rensburg S. J., van Zyl J. L., Stein D. J., Daniels W. M. U. (2008). Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. *Neuroscience Research.* 61:106-112. doi: 10.1016/j.neures.2008.01.011

Martel K. L., Baum M. J. (2007). Sexually dimorphic activation of the accessory, but not the main, olfactory bulb in mice by urinary volatiles. *Eur J Neurosci.* 26(2):463-75. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05651.x

- Martin L. M., Sayette M. A. (2018). A review of the effects of nicotine on social functioning. *Exp Clin Psychopharmacol.* 26(5):425-439. doi: 10.1037/pha0000208
- Martinez-Marcos A. (2009). On the organization of olfactory and vomeronasal cortices. *Prog Neurobiol.* 87(1):21-30. doi: 10.1016/j.pneurobio.2008.09.010
- McClernon F. J., Hiott F. B., Westman E. C., Rose J. E., Levin E. D. (2006). Transdermal nicotine attenuates depression symptoms in nonsmokers: a double-blind, placebo-controlled trial. *Psychopharmacology.*;189:125–133. doi: 10.1007/s00213-006-0516-y
- McIntosh J., Anisman H., Merali Z. (1999). Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Brain Res Dev Brain Res.* 113(1-2):97-106. doi: 10.1016/s0165-3806(99)00005-x
- Meaney M. J., Bhatnagar S., Larocque S., McCormick C., Shanks N., Sharma S., Smythe J., Viau V., Plotsky P. M. (1993). Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal stress response and the hypothalamic CRF system. *Ann N Y Acad Sci.* 697:70-85. doi: 10.1111/j.1749-6632.1993.tb49924.x
- Mejía-Chávez S., Venebra-Muñoz A., García-García F., Corona-Morales A. A., Orozco-Vargas A. E. (2021). Maternal Separation Modifies the Activity of Social Processing Brain Nuclei Upon Social Novelty Exposure. *Frontiers in Behavior Neuroscience.* 15:651-263. doi: 10.3389/fnbeh.2021.651263
- Meredith M., Marques D. M., O'Connell R. O., Stern F. L. 1980. Vomeronasal pump: significance for male hamster sexual behavior. *Science.* 207:1224–26. doi: 10.1126/science.7355286
- Micevych P. E., Meisel R.L. (2017). Integrating Neural Circuits Controlling Female Sexual Behavior. *Front Syst Neurosci.* 11:42. doi: 10.3389/fnsys.2017.00042
- Millar N.S., Gotti C., (2009). Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology.* 56(1):237–246. doi: 10.1016/j.neuropharm.2008.07.041

Modlinska K., Stryjek R., Chrzanowska A., Pisula W. (2018). Social environment as a factor affecting exploration and learning in pre-juvenile rats. *Behav Processes*. 153:77-83. doi: 10.1016/j.beproc.2018.05.010

Molero-Chamizo A., Muñoz-Negro J. E. (2005). Psicofarmacología de la nicotina y conducta adictiva. *Trastornos adictivos*. 7(3):137-152

Nestler E. J. (2005). Is there a common molecular pathway for addiction? *Nat Neurosci*. 8(11):1445-9. doi: 10.1038/nm1578

Newman S. W. (1999). The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Ann N Y Acad Sci*. 877: 242–257. doi: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb09271.x

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. doi: 10.1002/syn.890160105

Nishi M. (2020). Effects of Early-Life Stress on the Brain and Behaviors: Implications of Early Maternal Separation in Rodents. *Int J Mol Sci*. 21(19):7212. doi: 10.3390/ijms21197212

Novick A. M., Levandowski M. L., Laumann L. E., Philip N. S., Price L. H., Tyrka A. R. (2018). The effects of early life stress on reward processing. *J Psychiatr Res*. 101:80-103. doi: 10.1016/j.jpsychires.2018.02.002

Numan M. (2006). Hypothalamic neural circuits regulating maternal responsiveness toward infants. *Behav Cogn Neurosci Rev*. 5(4):163-90. doi: 10.1177/1534582306288790

O'Connell L. A., Hofmann H. A. (2011). The vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: a comparative synthesis. *J Comp Neurol*. 519(18):3599-639. doi: 10.1002/cne.22735

Ovtscharoff W. Jr., Braun K. (2001). Maternal separation and social isolation modulate the postnatal development of synaptic composition in the infralimbic cortex of *Octodon degus*. *Neuroscience*. 104(1):33–40. doi: 10.1016 / s0306-4522 (01) 00059-8

Pappano A. J. (2015). *Cholinoceptor-Activating & Cholinesterase-Inhibiting Drugs*. (13<sup>a</sup> ed). New York, NY: McGraw-Hill Medical.

Parsana A. J., Li N., Brown T. H. (2012). Positive and negative ultrasonic social signals elicit opposing firing patterns in rat amygdala. *Behav Brain Res*. 226(1):77-86. doi: 10.1016/j.bbr.2011.08.040

Peartree N. A., Hood L. E., Thiel K. J., Sanabria F., Pentkowski N. S., Chandler K. N., Neisewander J. L. (2011). Limited physical contact through a mesh barrier is sufficient for social reward-conditioned place preference in adolescent male rats. *Physiol Behav*. 105(3):749-56. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.10.001

Pentkowski N.S., Painter M. R., Thiel K. J., Peartree N. A., Cheung T. H., Deviche P., Adams M., Alba J., Neisewander J. L. (2011). Nicotine-induced plasma corticosterone is attenuated by social interactions in male and female adolescent rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 100(1):1-7. doi: 10.1016/j.pbb.2011.07.005

Phillips L. J., McGorry D.P., Garner B., Thompson K. N., Pantelis C., Wood S. J., Berger G. (2006). Stress, the hippocampus and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for the development of psychotic disorders. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*. 40:725-741. doi: 10.1080 / j.1440-1614.2006.01877.x

Picciotto M. R., Zoli M., Rimondini R., Léna C., Marubio L. M., Pich, E. M., Fuxe, K., Changeux, J. P. (1998). Acetylcholine receptors containing the beta2 subunit are involved in the reinforcing properties of nicotine. *Nature*. 391(6663):173-7. doi: 10.1038/34413.

Posadas I., Lopez-Hernandez B., Cena V., (2013). Nicotinic receptors in neurodegeneration. *Curr. Neuropharmacol*. 11 (3), 298–314. doi: 10.2174/1570159X11311030005

Pryce C.R., Rüedi-Bettschen D., Dettling A.C., Weston A., Russig H., Ferger B., Feldon J. (2005). Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: Potential animal models in depression research. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29:649–674. doi: 10.1016/j.neubiorev.2005.03.011

Quattrocki E., Baird A., Yurgelun-Todd D. (2000). Biological aspects of the link between smoking and depression. *Harv Rev Psychiatry.* 8:99–110

Quick M.W., Lester R.A.J. (2002). Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J Neurobiol.* 53 (4):457–478. doi: 10.1002/neu.10109.

Richard J. M., Ambroggi F., Janak P. H., Fields H. L. (2016). Ventral Pallidum Neurons Encode Incentive Value and Promote Cue-Elicited Instrumental Actions. *Neuron.* 90(6):1165-1173. doi: 10.1016/j.neuron.2016.04.037

Rombaut C., Roura-Martinez D., Lepolard C., Gascon E. (2021). Brief and long maternal separation in C57Bl6J mice: behavioral consequences for the dam and the offspring. *Front Behav Neurosci.* 17:1269866. doi: 10.3389/fnbeh.2023.1269866

Scribner J. L., Vance E. A., Protter D. S. W., Sheeran W. M., Saslow E., Cameron R. T., Klein E. M., Jimenez J. C., Kheirbek M. A., Donaldson Z. R. (2020). A neuronal signature for monogamous reunion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 117(20):11076-11084. doi: 10.1073/pnas.1917287117

Sadananda M., Wöhr M., Schwarting R. K. (2008). Playback of 22-kHz and 50-kHz ultrasonic vocalizations induces differential c-fos expression in rat brain. *Neurosci Lett.* 435(1):17-23. doi: 10.1016/j.neulet.2008.02.002

Schmidt M., Enthoven L., van der Mark M., Levine S., de Kloet E. R., Oitzl M. S. (2003). The postnatal development of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in the mouse. *Int. J. Dev. Neurosci.* 21:125–132. doi: 10.1016/S0736-5748(03)00030-3

Schmidt M., Enthoven L., Van Woezik J. H. G., Levine S., De Kloet E. R., Oitzl M. S. (2004). The dynamics of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during maternal deprivation. *J. Neuroendocrinol.* 16:52–57. doi: 10.1111/j.1365-2826.2004.01123.x

Scopano M. R., Jones H. E., Stea S. G., Freeman M. Z., Grisel J. E. (2023). Age,  $\beta$ -endorphin, and sex dependent effects of maternal separation on locomotor activity, anxiety-like behavior, and alcohol reward. *Front Behav Neurosci.* 17:1155647. doi: 10.3389/fnbeh.2023.1155647

Shram M. J., Funk D., Li Z., Lê A. D. (2006). Periadolescent and adult rats respond differently in tests measuring the rewarding and aversive effects of nicotine. *Psychopharmacology (Berl)*. 186(2):201-8. doi: 10.1007/s00213-006-0373-8

Semba J., Matakai C., Yamada S., Nankai M., Toru M. (1998). Antidepressantlike effects of chronic nicotine on learned helplessness paradigm in rats. *Biol Psychiatry*. 43(5):389-91. doi: 10.1016/s0006-3223(97)00477-0

Seth P., Cheeta S., Tucci S., File S. E. (2002). Nicotinic-serotonergic interactions in brain and behaviour. *Pharmacol Biochem Behav.* 71(4):795-805. doi: 10.1016/s0091-3057(01)00715-8

Shiota N., Narikiyo K., Masuda A., Aou S. (2016). Water spray-induced grooming is negatively correlated with depressive behavior in the forced swimming test in rats. *The Journal of Physiological Sciences* volume. 66:265–273. doi: <https://doi.org/10.1007/s12576-015-0424-1>

Silveira-Villarroel H., Bompolaki M., Mackay J. P., Miranda-Tapia A. P., Michaelson S. D., Leitermann R. J., Urban J.H., Colmers W. F. (2018). NPY induces stress resilience via Downregulation of Ih in principal neurons of rat basolateral amygdala. *Journal of Neuroscience*. 38(19):4505-4520. doi: 10.1523 / JNEUROSCI.3528-17.2018

Slotten H. A., Kalinichev M., Hagan J. J., Mardsen C. A., Fone K. C. F. (2006). Long-lasting changes in behavioral and neuroendocrine indices in the rat following neonatal maternal separation: gender dependent effects. *Brain Research*. 1097:123-132. doi: 10.1016/j.brainres.2006.04.066

Smith K. S., Tindell A. J., Aldridge J. W., Berridge K. C. (2009). Ventral pallidum roles in reward and motivation. *Behav Brain Res.* 196(2):155-67. doi: 10.1016/j.bbr.2008.09.038

Smith C. J., Wilkins K. B., Mogavero J. N., Veenema A. H. (2015). Social Novelty Investigation in the Juvenile Rat: Modulation by the  $\mu$ -Opioid System. *J Neuroendocrinol.* 27(10):752-64. doi: 10.1111/jne.12301

Smolka M. N., Budde H., Karow A. C., Schmidt L. G. (2004). Neuroendocrinological and neuropsychological correlates of dopaminergic function in nicotine dependence. *Psychopharmacology (Berl).* 175(3):374-81. doi: 10.1007/s00213-004-1824-8

Spehr M., Kelliher K. R., Li X. H., Boehm T., Leinders-Zufall T., Zufall F. (2006). Essential role of the main olfactory system in social recognition of major histocompatibility complex peptide ligands. *J. Neurosci.* 26:1961–70. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4939-05.2006

Sternson S. M. (2013). Hypothalamic survival circuits: blueprints for purposive behaviors. *Neuron.* 77(5):810-24. doi: 10.1016/j.neuron.2013.02.018

Suchecki D. (2018). Maternal regulation of the infant's hypothalamic-pituitary-adrenal axis stress response: Seymour 'Gig' Levine's legacy to neuroendocrinology. *J. Neuroendocrinol.* 30:e12610. doi: 10.1111/jne.12610

Tapper A. R., McKinney S. L., Nashmi R., Schwarz J., Deshpande P., Labarca C., Whiteaker P., Marks M. J., Collins A. C., Lester H. A. (2004). Nicotine activation of  $\alpha 4^*$  receptors: sufficient for reward, tolerance, and sensitization. *Science.* 306(5698):1029-32. doi: 10.1126/science.1099420

Thiel K. J., Sanabria F., Neisewander J. L. (2009). Synergistic interaction between nicotine and social rewards in adolescent male rats. *Psychopharmacology* 204:391–402. doi: 10.1007/s00213-009-1470-2

Tizabi Y., Hauser S. R., Tyler K. Y., Getachew B., Madani R., Sharma Y., Manaye K. F. (2010). Effects of nicotine on depressive-like behavior and hippocampal volume of female

WKY rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 34(1):62-9. doi: 10.1016/j.pnpbp.2009.09.024

Trezza V., Baarendse P. J., Vanderschuren L. J. (2010). The pleasures of play: pharmacological insights into social reward mechanisms. *Trends Pharmacol Sci*. 31(10):463-9. doi: 10.1016/j.tips

Trezza V., Campolongo P., Vanderschuren L. J. (2011). Evaluating the rewarding nature of social interactions in laboratory animals. *Dev Cogn Neurosci*. 1(4):444-58. doi: 10.1016/j.dcn.2011.05.007

Tritsch N. X., Sabatini B. L. (2012). Dopaminergic modulation of synaptic transmission in cortex and striatum. *Neuron*. 76(1):33-50. doi: 10.1016/j.neuron.2012.09.023

Vallée M., Mayo W., Maccari S., Le Moal M., Simon H. (1996). Long-term effects of prenatal stress and handling on metabolic parameters: relationship to corticosterone secretion response. *Brain Res*. 712(2):287-92. doi: 10.1016/0006-8993(95)01459-4

Valentine G., Sofuoglu M. (2018). Cognitive Effects of Nicotine: Recent Progress. *Curr Neuropharmacol*. 16(4):403-414. doi: 10.2174/1570159X15666171103152136.

Van Bodegom M., Homberg J. R., Henckens M. J. A. G. (2017). Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Early Life Stress Exposure. *Front. Cell. Neurosci*. 11:87. doi: 10.3389/fncel.2017.00087

van Kerkhof L. W., Damsteegt R., Trezza V., Voorn P., Vanderschuren L. J. (2013). Social play behavior in adolescent rats is mediated by functional activity in medial prefrontal cortex and striatum. *Neuropsychopharmacology*. 38(10):1899-909. doi: 10.1038/npp.2013.83

Veenema A.H., Blume A., Niederle D., Buwalda B., Neumann I.D. (2006). Effects of early life stress on adult male aggression and hypothalamic vasopressin and serotonin. *Eur. J. Neurosci*. 24:1711–1720. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05045.x

Veneema AH, Neumann DN. 2009. Maternal separation enhances offensive play-fighting, basal corticosterone and hypothalamic vasopressin mRNA expression in juvenile male rats. *Psychoneuroendocrinology*. 34:463-467. doi: 10.3389 / fnbeh.2019.00143

Vivinetto A. L., Suárez M. M., Rivarola M. A. (2013). Neurobiological effects of neonatal maternal separation and post-weaning environmental enrichment. *Behav Brain Res*. 240:110-8. doi: 10.1016/j.bbr.2012.11.014

Von Frijtag J. C., Schot M., van den Bos R., Spruijt B. M. (2002). Individual housing during the play period results in changed responses to and consequences of a psychosocial stress situation in rats. *Dev Psychobiol*. 41(1):58-69. doi: 10.1002/dev.10057

Wang Z., Balet Sindreu C., Li V., Nudelman A., Chan G. C., Storm D. R.(2006). Pheromone detection in male mice depends on signaling through the type 3 adenylyl cyclase in the main olfactory epithelium. *J Neurosci*. 26(28):7375-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1967-06.2006

Wang D., Levine J. L. S., Avila-Quintero V., Bloch M., Kaffman A. (2020). Systematic review and meta-analysis: effects of maternal separation on anxiety-like behavior in rodents. *Transl Psychiatry*. 10(1):174. doi: 10.1038/s41398-020-0856-0

Wang Q., Li M., Du W., Shao F., Wang W. (2015). The different effects of maternal separation on spatial learning and reversal learning in rats. *Behav Brain Res*. 280:16-23. doi: 10.1016/j.bbr.2014.11.040

Wang Q., Shao F., Wang W. (2015) Maternal separation produces alterations of forebrain brain-derived neurotrophic factor expression in differently aged rats. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 8:49. doi: 10.3389/fnmol.2015.00049

Wei D., Talwar V., Lin D. (2021). Neural circuits of social behaviors: Innate yet flexible. *Neuron*. 109(10):1600-1620. doi: 10.1016/j.neuron.2021.02.012.

Weinstock M. (2008). The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci. Biobehav. Rev*. 32: 1073–1086. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.03.002

Wesson D. W., Wilson D. A. (2011). Sniffing out the contributions of the olfactory tubercle to the sense of smell: hedonics, sensory integration, and more? *Neurosci Biobehav Rev.* 35(3):655-68. doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.08.004

Wickens J. R., Budd C. S., Hyland B. I., Arbuthnott G. W. (2007). Striatal contributions to reward and decision making: making sense of regional variations in a reiterated processing matrix. *Ann NY Acad Sci.* 1104: 192–212. doi: 10.1196/annals.1390.016

Willuhn I., Tose A., Wanat M. J., Hart A. S., Hollon N. G., Phillips P. E., Schwarting R. K., Wöhr M. (2014). Phasic dopamine release in the nucleus accumbens in response to pro-social 50 kHz ultrasonic vocalizations in rats. *J Neurosci.* 34(32):10616-23. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1060-14.2014

Yildiz D. (2004). Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol.* 43(6):619-32. doi: 10.1016/j.toxicol.2004.01.017

Zarrindast M. R., Sedaghati F., Borzouyeh F. (1998). Nicotine-induced grooming: a possible dopaminergic and/or cholinergic mechanism. *Journal of Psychopharmacology.* 12(4):375-379. doi:10.1177/026988119801200408

Zhang X., Ge T. T., Yin G., Cui R., Zhao G., Yang W. (2018). Stress-Induced Functional Alterations in Amygdala: Implications for Neuropsychiatric Diseases. *Front Neurosci.* 12:367. doi: 10.3389/fnins.2018.00367