

## **Participación de la Cotinina en la abstinencia nicotínica en ratas (Estudio preliminar)**

### ***Cotinine participation in chronic nicotinic withdrawal syndrome in rats (Preliminary study)***

Adriana H. Sassone, Luciano Merini, Patricia N. Quiroga, María I. Sarchi,  
Clara M. López, Otmario E. Roses y Juan C. Perazzo

Universidad de Buenos Aires, Argentina

Recibido: 30/07/2017 · Aceptado: 20/04/2018

#### ***Resumen***

Numerosos datos clínicos y experimentales han demostrado que la nicotina del tabaco (NI) es la razón de la adicción al tabaco en los seres humanos, a través de la inducción de la tolerancia y la dependencia física. El humo del tabaco contiene otros alcaloides que pueden contribuir a la adicción, como la cotinina (COT).

En este estudio se evaluaron los posibles efectos de la COT en ratas durante el síndrome de abstinencia nicotínica midiendo la actividad locomotora espontánea (ALE) utilizando el test del campo abierto.

El estudio se llevó a cabo con dos grupos de ratas que recibieron NI 10 mg / kg / día en agua potable durante 120 días (grupos A y B). Luego, en el grupo A, se sustituyó NI por agua potable y en el grupo B, sustituido por COT 12 mg / kg, durante 24 horas en ambos grupos. La actividad locomotora espontánea se registró al final del día 120 (nivel basal) y al final del día 121, al final del período de abstinencia.

Los resultados obtenidos se compararon con las mediciones basales. El grupo A mostró diferencias significativas en 3 de los 9 movimientos medidos y el grupo B mostró diferencias significativas en 7 de los 9 movimientos medidos. Cuando el grupo A se comparó con el grupo B sólo 1 movimiento mostró diferencia significativa.

Estos resultados sugieren que en la administración crónica de nicotina y en estas condiciones experimentales, la cotinina participa en el síndrome de abstinencia nicotínica.

#### ***Palabras Clave***

Cotina, nicotina, abstinencia nicotínica, actividad locomotriz espontánea, campo abierto.

— Correspondencia a: \_\_\_\_\_  
Adriana Haydée Sassone  
e-mail: [asassone@yahoo.com](mailto:asassone@yahoo.com)



## **Abstract**

A large amount of clinical and experimental data has shown that tobacco nicotine (NI) is the reason for tobacco addiction in humans, through the induction of tolerance and physical dependence. Tobacco smoke contains other alkaloids that may contribute to addiction, such as cotinine (COT). In this study we evaluated the possible effects of COT in rats during NI abstinence syndrome by measuring spontaneous locomotor activity (SLA) with an open field test.

The study was carried out with two groups of rats receiving NI 10 mg / kg / day in drinking water for 120 days (groups A and B). Then, in group A, NI was replaced by drinking water and in group B, substituted by COT, 12 mg / kg, for 24 hours in both groups. Spontaneous locomotor activity was recorded at the end of day 120 (baseline) and at the end of day 121, the end of the abstinence period.

The results obtained were compared against the baseline measurements and group A showed significant differences in 3 of the 9 movements measured and group B displayed significant differences in 7 of the 9 movements measured.

When group A was compared with Group B only 1 movement showed any significant differences.

These results suggest that cotinine participates in the nicotine withdrawal syndrome in chronic nicotine administration under these experimental conditions.

## **Key Words**

Cotinine, nicotine, nicotine withdrawal, spontaneous locomotor activity, open field.

## **I. INTRODUCCION**

El tabaquismo se clasifica como un trastorno relacionado con el consumo de una sustancia psicoactiva, la nicotina (NI) (Halladay, Schwartz, Wagner, Iba, Sekowski y Fischer, 1999). La nicotina, principal alcaloide del tabaco, es la razón por la que el tabaco es adictivo (Barrett, 2010; Clemens, Caillé, Stinus y Cadador, 2009; Kyerematen y Vesell, 1991; Wiley, Marusich, Thomas y Jackson, 2015).

Numerosos datos clínicos y experimentales muestran que NI produce tolerancia y dependencia física en humanos. La abstinencia de NI en fumadores crónicos produce un síndrome de abstinencia (Halladay et ál,

1999) que comprende componentes físicos y emocionales (O'Dell, Buijnzeel, Ghoszland, Markou y Koob, 2004).

En los animales de experimentación, el síndrome de abstinencia de NI consiste en signos físicos espontáneos (Epping-Jordan, Watkins, Koob y Markou, 1998; Mathieu-Kia, Kellogg, Butelman y Kreek, 2002), que incluyen castaño de dientes, masticación continua, bostezo, dolor abdominal, sibilancias, sacudidas, parpadeo de los ojos y caída del párpado (Mathieu-Kia et ál., 2002; O'Dell et ál., 2004; O'Dell et ál., 2006).

El humo del tabaco, además de NI, contiene otros alcaloides que pueden contribuir a las propiedades adictivas del tabaco



(Barrett, 2010; Clemens et ál., 2009; Wiley et ál., 2015) como, por ejemplo, la cotinina (COT), el principal producto del metabolismo de la NI en varias especies incluido el ser humano (Iarkov, Appunn y Echeverría, 2016; Wiley et ál., 2015).

Diversos autores han descrito que, en el fumador, los niveles de COT plasmáticos aumentan gradualmente a medida que transcurre el día (Miller, Rotenberg y Adir, 1997; Rama Sastry, Chance, Singh, Horn y Janson, 1995; Schroff, Lovich, Schmitz, Aschhoff, Richter y Remien, 2000; Shoaib y Stolerman, 1999; Slotkin, 2002; Sziráki et ál., 1999) hasta alcanzar un máximo al finalizar la jornada y persisten durante la noche. Esta permanencia en el plasma sería una consecuencia de su larga vida media (Riah, Courrière, Dousset, Todeschi y Labat, 1998; Schroff et ál., 2000) que, según distintos autores, se encuentra comprendida dentro de un rango entre 10 y 30 horas (Dwoskin, Teng y Crooks, 2001; Hansen, Garde, Christensen, Eller, Knudsen y Heinrich-Ramm, 2001; Kyerematen y Vesell, 1991; Lorenzo, Ladero, Leza y Lizasoain, 1998; Rama Sastry et ál., 1995; Riah, Dousset, Courrière, Stigliani, Baziard-Mouysset y Belahsen, 1999; Sam Niedbala, Haley, Kardos y Kardos, 2002; Sziráki et ál., 1999; Tricker, 2003;). En relación con lo anterior, en los fumadores los niveles plasmáticos de la COT son significativamente mayores que los de la NI (250 a 900 ng/ml vs 10 a 30 ng/ml) (Dwoskin, Teng, Buxton y Crooks, 1999; Rama Sastry et ál., 1995; Schroff et ál., 2000; Shoaib y Stolerman, 1999).

La COT, en roedores, puede afectar la función del sistema nervioso central ya que atraviesa la barrera hematoencefálica (Ghosheh, Dwoskin, Li y Crooks, 1999;

Ghosheh, Dwoskin, Miller y Crooks, 2001; Riah et ál., 1998; Schroff et ál., 2000; Sziráki et ál., 1999). En el cerebro de rata, el perfil de concentración de COT a lo largo del tiempo indica que se detecta a los 30 minutos de la administración, alcanza su pico máximo entre 60 y 240 minutos, permanece en circulación entre 8 y 16 horas después de la inyección y su T1/2 es de 5,5 horas, siendo aún detectable hasta 24 horas después de la inyección (Ghosheh et ál., 1999).

La COT es un neuroprotector, potenciador de la memoria y es un compuesto antiinflamatorio, preserva la densidad sináptica, disminuye la ansiedad y reduce el comportamiento depresivo en los ratones (Iarkov et ál., 2016)

Un criterio para evaluar la abstinencia inducida por fármacos adictivos en animales de experimentación, incluyendo NI, es la evaluación de la actividad locomotora espontánea (ALE). Esta es una técnica ampliamente utilizada para estudiar una variedad de sustancias químicas (Clemens et ál., 2009; Goutier, O'Connor, Lowry y McCreary, 2015; Halladay et ál., 1999; Wiley et ál., 2015).

En ratas, el aumento del peso corporal, la hiperfagia (Mathieu-Kia et ál., 2002; Stolerman, 1999), la disminución de la ALE y la polidipsia son parámetros utilizados para evaluar la intensidad de la abstinencia (Mathieu-Kia et ál., 2002).

Si bien la COT presenta una menor actividad farmacológica que la NI, podría estar involucrada en la dependencia a la NI o en el síndrome de abstinencia al tabaco (Dwoskin et ál., 1999). Esto se debería a que reduce el efecto beneficioso de los parches de NI en la disminución de los



síntomas en la abstinencia tabáquica (Hatsukami, Lexau, Nelson, Pentel, Sofuoglu y Goldman, 1998a; Hatsukami et ál., 1998b; Riah et ál., 1999; Schroff et ál. 2000; Vainio y Tuominen, 2001) y los empeora en los adictos indicando, al menos a nivel funcional, un antagonismo a los efectos de la NI (Hatsukami et ál., 1998b; Vainio, Viluksela y Tuominen, 1998).

En consecuencia, nuestra hipótesis de trabajo es considerar la posibilidad de que la COT pueda contribuir con la manifestación de los efectos adversos de la exposición a NI a largo plazo (Ghosheh et ál., 1999; Ghosheh et ál., 2001; Schroff et ál., 2000; Wiley et ál., 2015).

El objetivo de este estudio es poder evaluar algún posible efecto de la COT sobre la actividad locomotriz espontánea en ratas durante el síndrome de abstinencia nicotínica.

Para ello se utilizaron ratas a las que se les administró crónicamente NI en agua potable (Gaddnas, Pietila y Ahtee, 2000; Gaddnas, Pietila, Petteri Piepponen, Ahtee, 2001; Halladay et ál., 1999) durante 120 días y se midió la ALE (basal). En ese momento se reemplazó la NI por una solución de COT durante 24 hs y se midió la ALE en el período de abstinencia.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos

(-) -Nicotine, Fluka, Ref. N°. 72290, CAS 54-11-5, 98% pureza.

(-)-Cotinine, Sigma, Ref. N°. C5923, CAS 486-56-6, 98% de pureza.

### Animales

24 ratas Sprague Dawley machos adultas de  $210 \pm 10$  g de peso corporal inicial fueron sometidas a 5 días de aclimatación. Luego fueron asignadas al azar y divididas en 3 grupos de ocho animales cada uno ( $n = 8$ ). 2 de los 3 grupos recibieron NI a la dosis de 10 mg/kg/día y un grupo recibió agua potable (grupo control). Los grupos se denominaron como sigue: A, B y C (Figura 1).

### Mantenimiento de animales

El protocolo experimental se diseñó de acuerdo con la Guía N° 452 para ensayo de productos químicos en animales de experimentación de la Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD, 1993).

Se utilizaron ratas Sprague Dawley machos adultas, se aclimataron en el bioterio durante cinco días antes de iniciar el tratamiento. Las ratas se mantuvieron a una temperatura de  $22 \pm 3^\circ\text{C}$ , con humedad del 30 al 70% y un ciclo luz/oscuridad de 12 horas cada uno. Los animales fueron alimentados con una dieta comercial estándar para roedores y recibieron agua del red ad libitum (OECD, 1993).

Los animales fueron provistos por el bioterio central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

### Dosis

Las dosis de NI fue establecida teniendo en cuenta el contenido equivalente a fumar 30 cigarrillos/día ("fumadores fuertes" (Berlin et ál., 1995). Además, se consideró que la



NI se metabolizaba entre el 70% y el 80% a COT (Berlin et ál., 1995; Kyerematen y Vessel, 1991; Lea, Dickson y Benowitz, 2006; Nakajima, Kuroiwa y Yokoi, 2002; Nakajima, Yamagishi, Yamamoto, Yamamoto, Kuroiwa y Yokoi, 2000; Pelkonen, Rautio, Raunio y Pasanen, 2000; Sam Niedbala et ál., 2002). A las dosis calculadas se aplicó un factor de seguridad  $\times 10$ , que también incluyó la variación entre especies.

Ambos alcaloides fueron administrados oralmente y disueltos en agua potable (Gaddnas et ál., 2000; Gaddnas et ál., 2001; Halladay et ál., 1999). La cantidad del alcaloide en el agua potable se ajustó semanalmente considerando la variación del peso corporal promedio de las ratas/jaula. El peso corporal, la ingesta de alimentos y líquidos se registraron semanalmente a lo largo de la experiencia.

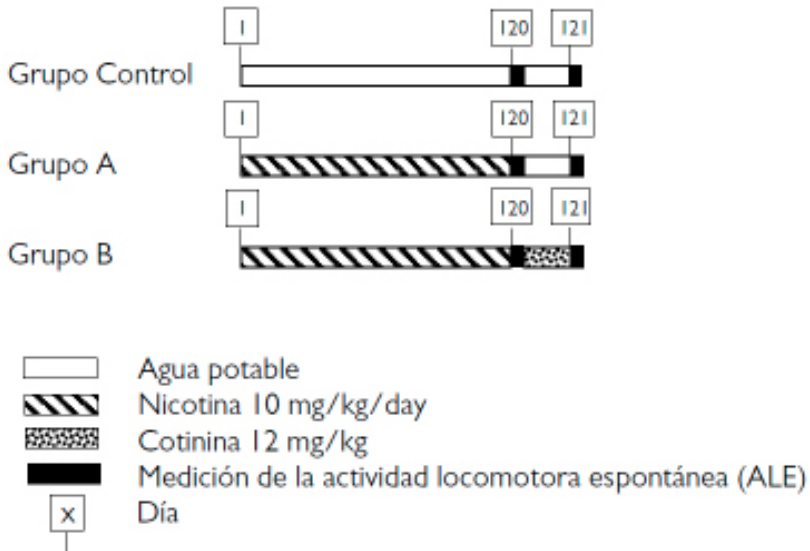
La ingesta aproximada de NI y COT se calculó en base a un experimento piloto previo, en el que se determinó la ingesta diaria de soluciones de los alcaloides por día/rata durante una semana.

## Experimento

Luego de 120 días de tratamiento con el alcaloide (NI= 10 mg/kg/día), las soluciones para beber de los grupos A y B se reemplazaron durante un período de 24 hs según: grupo A por agua potable y grupo B por una solución de COT de 12 mg/kg rata, ambas ingestas fueron ad libitum. El grupo C recibió agua potable durante la experiencia.

La ALE fue medida dos veces en todos los grupos: A los 120 días de tratamiento (ALE basal) y al día 121, al final del período de abstinencia (Figura 1).

**Figura 1.** Esquema experimental





En el experimento, la ALE fue medida por períodos de 10 minutos entre las 19:00 y las 21:00 horas usando una lámpara de luz roja no visible para los roedores debido a su adaptación a la oscuridad (Zúñiga, Tur Marú, Milocco y Piñeiro, 2001). Las ratas se colocaron individualmente dentro de la caja de medición

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

### Instrumental

La ALE de los animales se midió utilizando un equipo Opto-Minor Varimex (Auto-Track System, 1990) conectado a una computadora IBM compatible. Básicamente el equipo consta de una caja de plástico transparente de 45 x 45 x 19 cm (longitud, ancho y altura, respectivamente). La actividad motriz horizontal y vertical (X e

Y) se midió por sensores infrarrojos y los datos integrados se clasificaron por actividad (Auto-Track System, 1990; Nisell, Nomikos, Hertel, Panagis y Svensson, 1996). En la Tabla I se indican los movimientos a medir, sus unidades y abreviaciones por sus siglas en inglés.

### Análisis estadístico

Se utilizaron las pruebas de Shapiro Wilks y de Levene para la distribución de datos y para el análisis de homogeneidad de varianza (Dunn y Clark, 1987).

Para cada variable (9 movimientos), se utilizó la prueba "t" de Student para muestras apareadas y el análisis de varianza de 2 factores con medidas repetidas en un factor (Winer, Brown y Michels, 1991).

En el experimento, los valores con  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

**Tabla I.** Movimientos, unidades y abreviaciones (Auto-Track/Opto-Varimex)

Movimientos	Unidades	Abreviaciones
Distance travelled	Centímetros	DT
Resting time	Segundos	RT
Ambulatory time	Segundos	AT
Stereotypic time	Segundos	ST
Burst of stereotypic movement	Número of movimientos	BSM
Horizontal counts	Número de haces interrumpidos	HC
Total ambulatory counts	Número de haces interrumpidos	TAC
Vertical counts	Número de haces interrumpidos	VIC
Vertical beam interrupts	Múltiples haces interrumpidos	VIB



### 3. RESULTADOS

No se registró mortalidad o signos de enfermedad en ningún animal durante todo el experimento.

Los grupos que recibieron NI mostraron una disminución significativa en el peso corporal en relación al grupo control. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la ingesta de alimentos entre los grupos.

Durante los 120 días de tratamiento, la ingesta diaria promedio de solución para los grupos que recibieron NI fue de  $19 \pm 5$  ml/día/rata y el grupo C consumió  $45 \pm 6$  ml/día/rata de agua de red. Como resultado de la menor ingesta diaria de solución del alcaloide (debido al sabor amargo) la dosis final de nicotina administrada en los grupos A y B fue de 6,2 mg/kg/día.

En el experimento todas las variables cumplieron la homogeneidad de la varianza.

El grupo A mostró una disminución significativa en los siguientes movimientos: DT ( $p < 0,05$ ), AT ( $p < 0,01$ ) y TAC ( $p < 0,02$ ) al día 121 al compararlos con los resultados basales de ese grupo (día 120) (Figura 2). En los otros movimientos estudiados, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

El grupo B mostró una disminución significativa en los siguientes movimientos: DT, AT, HC y TAC ( $p < 0,05$ ); RT, ST y BSM ( $p < 0,01$ ) al día 121 en relación con los resultados basales de ese grupo (día 120) (Figura 2). No hubo diferencias significativas para los movimientos restantes medidos.

El grupo A mostró una diferencia significativa en el movimiento ST ( $p < 0,01$ ) al

compararlo con el grupo B (Figura 2]. No hubo diferencias significativas entre los grupos en los otros movimientos medidos.

Las unidades y abreviaturas de los movimientos vistos en la figura 2 se muestran en la tabla 1.

### 4. DISCUSIÓN

Varios datos clínicos y experimentales muestran que la NI produce tolerancia y dependencia física. La cesación del uso crónico de este alcaloide conduce al síndrome de abstinencia (Damaj, Kao y Martin, 2003).

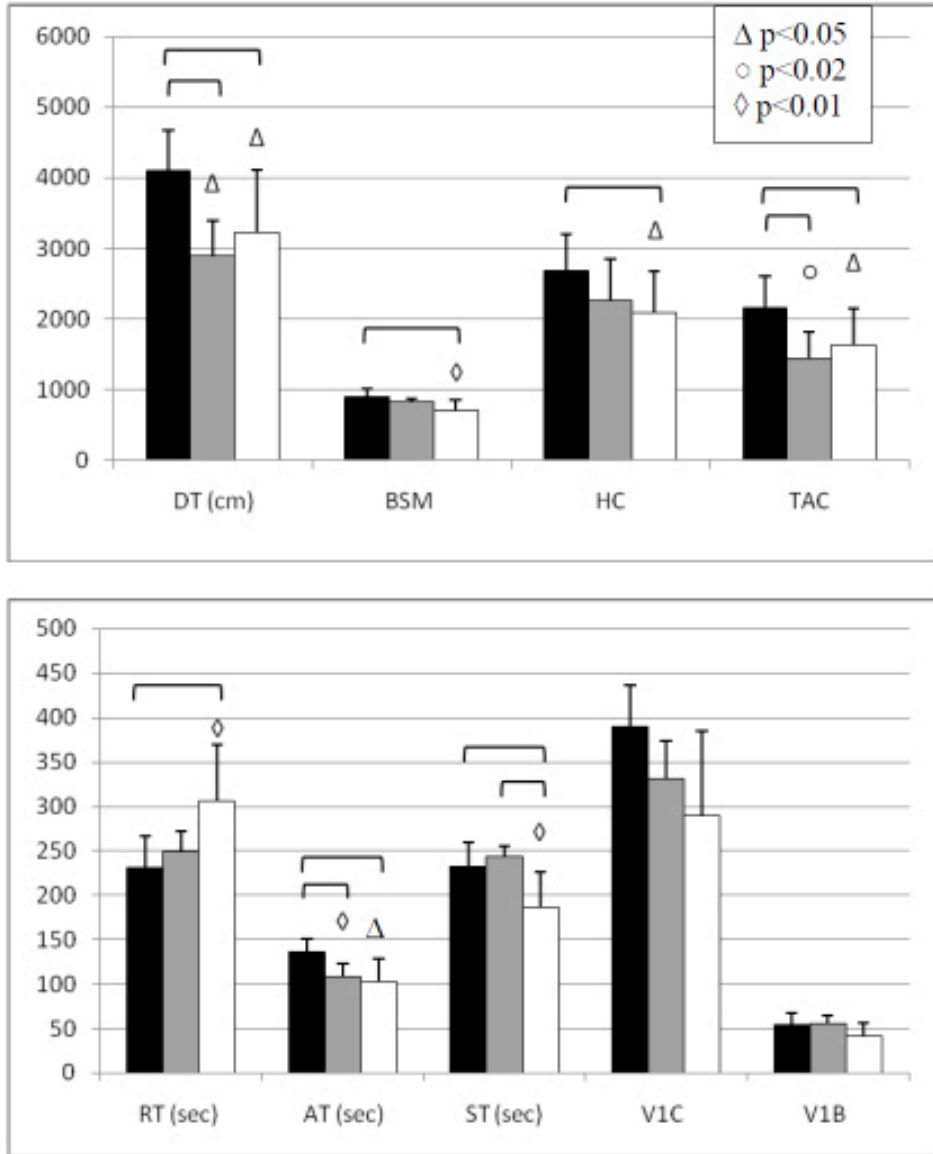
En ratas también se ha observado un fenómeno similar, desarrollando un síndrome de abstinencia caracterizado por diversos cambios en el comportamiento (Damaj et ál., 2003; Mathieu-Kia et ál., 2002; O'Dell et ál., 2004; O'Dell et ál., 2006).

El modelo de consumo oral voluntario en animales de experimentación proporciona información necesaria para investigar la adicción a la NI observada en fumadores fuertes. Además, el modelo de autoadministración oral puede ser un modelo útil para investigar los factores de riesgo psicobiológicos involucrados en el consumo y la dependencia de NI (Adriani, Macri, Pacifici y Laviola, 2002)

Estudios previos han demostrado que la administración intermitente de NI produce sensibilización locomotora en ratas dentro de los 5 días. Este efecto depende del tiempo de administración, de la droga y de la interacción entre los dos factores (Goutier et ál., 2015).



**Figura 2.** Valores medios de los movimientos medidos a 120 días de tratamiento con NI 10 mg/kg/día (■ Basal) y al día 121 al final del período de abstinencia. En ese período, las soluciones para beber se reemplazaron por agua potable (Grupo A (■)) o por una solución de COT 12 mg/kg rata (Grupo B (□)). Las unidades y las abreviaturas de los movimientos vistos en la Figura 2 se muestran en la Tabla 1.







Los efectos de la NI sobre la ALE en roedores son complejos. La NI puede deprimir o estimular la ALE mediante una acción central directa (Fung, Schmid, Anderson y Lau, 1996; Halladay et ál., 1999; Mathieu-Kia et ál., 2002). Los diferentes efectos inducidos por la NI sobre el comportamiento en ratas pueden estar mediados a través de mecanismos que probablemente implican diferentes subtipos de receptores nicotínicos. Diversos autores (Fung et ál., 1996; Hildebrand, Nomikos, Bondjers, Nisell y Svensson, 1997) informaron una reducción significativa de la ALE en el campo abierto después de la retirada de nicotina en ratas que recibieron NI por vía subcutánea en un período de hasta 20 días. Irvine y col. (Irvine, Bagualasta, Marcon y Motta, 2001) observaron en ratas, privadas de NI después de la autoadministración intravenosa del fármaco durante 4 semanas, una disminución de la ALE después de 24 y 72 horas de abstinencia.

En concordancia con estas observaciones, en este trabajo el síndrome de retirada a la NI fue observado (grupo A) después de 24 hs de privación de la droga y luego de 120 días de tratamiento a una dosis de 10 mg/kg/día del alcaloide. El mismo estuvo caracterizado por una disminución en la actividad locomotora espontánea en 3 de los 9 movimientos medidos (DT, AT y TAC) en el día 121 al compararlos con los resultados basales (día 120) (Figura 2).

Aunque la COT tiene una actividad farmacológica menor que la NI podría estar implicado en la dependencia a la NI o en el síndrome de retirada al tabaco (Dwoskin et ál., 1999).

Algunos autores concluyeron, que la COT en fumadores podría jugar un rol im-

portante en el complejo proceso de la dependencia tabáquica (Dwoskin et ál., 1999; Hatsukami et ál., 1998a; Hatsukami et ál., 1998b; Riah et ál., 1999), incluyendo el síndrome de abstinencia asociado con la cesación de fumar tabaco (Dwoskin et ál., 1999; Hatsukami et ál., 1998b; Riah et ál., 1999).

Hatsukami y col. (Hatsukami et ál., 1998b) sostuvieron que la COT, al ser administrada a fumadores en abstinencia a la dosis oral de 80 mg durante 21 días, no tuvo efecto sobre la atenuación de los síntomas. Por el contrario, encontraron que se produjo un aumento en la fatiga y una mayor dificultad de concentración.

Sin embargo, cuando la COT se combina con la NI, no sólo antagoniza los efectos benéficos de los parches de este alcaloide en la reducción de los síntomas de abstinencia (Hatsukami et ál., 1998a; Hatsukami et ál., 1998b; Riah et ál., 1999; Schroff et ál., 2000; Vainio y Tuominen, 2001) sino que hasta los puede empeorar ligeramente (Vainio et ál., 1998; Vainio y Tuominen, 2001).

Hatsukami y col. (Hatsukami et ál., 1998a) realizaron estudios en sujetos fumadores por un período de 10 días en el cual tomaron cápsulas de COT a las dosis de 40, 80 o 160 mg según el caso. Los resultados parecen indicar que, posiblemente, la COT tendría un efecto antagónico manifestado en un aumento del número de cigarrillos fumados y en la mayor absorción de NI.

Esos efectos antagónicos de la COT también fueron observados en los animales de experimentación (Hatsukami et ál., 1998a; Schroff et ál., 2000).



Estudios en ratas revelaron que la NI y la COT afectaron la actividad locomotora en dosis y períodos de tiempo específicos, con perfiles de comportamiento diferentes (Wiley et ál., 2015).

Riah y col. (Riah et ál., 1999) trataron a ratones con NI y COT durante 14 días y registraron la presencia de NI y COT en todos los tejidos incluyendo el cerebro y demostraron que ambos alcaloides actúan sobre diferentes tipos de receptores.

Schroff y col. (Schroff et ál., 2000), mostraron que la COT presentaba actividad antagonista a NI en receptores nicotínicos neuronales de ratones.

En este estudio, el grupo B (que recibió COT en el agua de bebida durante las 24 hs de privación de NI) presentó una disminución en 6 (DT, AT, HC, TAC, ST y BSM) y un aumento en 1 (RT) de los 9 movimientos medidos en el campo abierto con respecto a la medición basal (ALE sin privación de NI). En el síndrome de retirada nicotínica, cuando se reemplaza la NI por la COT, los movimientos medidos se ven afectados de diferentes maneras según se evidencia en la figura 2 con respecto al grupo A.

## 5. CONCLUSIONES

En este trabajo se utilizó el modelo de consumo oral voluntario de NI y COT, que se administraron disueltas en agua potable (Gaddnas et ál., 2000; Gaddnas et ál., 2001; Halladay et ál., 1999).

En concordancia con otros autores, en este estudio el síndrome de retirada a la NI fue observado (grupo A) después de 24 hs de privación de la droga y luego de 120 días

de tratamiento a una dosis de 10 mg/kg/día del alcaloide observándose una disminución en la actividad locomotora espontánea en 3 de los 9 movimientos medidos respecto a los resultados basales.

En cambio, el grupo B (que recibió COT en el agua de bebida durante las 24 hs de privación de NI) presentó una disminución en 6 y un aumento en 1 de los 9 movimientos medidos en el campo abierto con respecto al grupo basal.

Nuestros resultados sugieren que, bajo estas condiciones experimentales, los efectos de NI y COT son diferentes, especialmente a dosis altas después de la administración crónica de NI. En consecuencia, es probable sugerir que la COT participaría en el síndrome de retirada nicotínica de diferentes maneras.

Los resultados aquí presentados pueden aportar alguna comprensión para el papel de la cotinina, uno de los principales metabolitos de la nicotina.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por la subvención del Laboratorio de Toxicología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Los autores no declaran ningún conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

Adriani, W.; Macri, S.; Pacifici, R.; Laviola, G. (2002). Restricted daily access to water and voluntary nicotine consumption in mice: methodological issues and individual differences. *Behavioural Brain Research*, 134, 21-30.



- Auto-Track System For IBM-PC/XT/AT, Version 3.0 A (1990). Instruction Manual, Columbus Instruments, USA.
- Barrett, S.P. (2010). The effects of nicotine, denicotinized tobacco, and nicotine-containing tobacco on cigarette craving, withdrawal, and self-administration in male and female smokers. *Behavioural Pharmacology*, 21 (2), 144-152.
- Berlin, I.; Saïd, S.; Spreux-Varoquaux, O.; Launay, J.M.; Olivares, R.; Miller, V.; Lecrubier, Y.; Puech, A.J. (1995). A reversible monoamine oxidase A inhibitor (moclobemide) facilitates smoking cessation and abstinence in heavy, dependent smokers. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 58, (4), 444-452.
- Clemens, K.J.; Caillé, S.; Stinus, L.; Cador, M. (2009). The addition of five minor tobacco alkaloids increases nicotine-induced hyperactivity, sensitization and intravenous self-administration in rats. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 12, 1355-1366
- Damaj, M.I.; Kao, W.; Martin, B.R. (2003). Characterization of spontaneous and precipitated nicotine withdrawal in the mouse. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 307, (2), 526-534.
- Dunn, O.J. y Clark, V.A. (1987). *Applied Statistics*. New York: John Wiley & Sons.
- Dwoskin, L.P.; Teng, L.; Buxton, S.T.; Crooks, P.A. (1999). (S)-(-)-Cotinine, the major brain metabolite of nicotine, stimulates nicotinic receptors to evoke [3H]dopamine release from rat striatal slices in a calcium-dependent manner. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 288, (2), 905-911.
- Dwoskin, L.P.; Teng, L.H.; Crooks, P.A. (2001). Nicotine, a nicotine metabolite and tobacco alkaloid: desensitization of nicotine receptor-stimulates dopamine release from rat striatum. *European Journal of Pharmacology*, 428, 69-79.
- Epping-Jordan, M.P.; Watkins, S.S.; Koob, G.F.; Markou, A. (1998). Dramatic decreases in brain reward function during nicotine withdrawal. *Nature*, 393, (7), 76-78.
- Fung, Y.K.; Schmid, M.J.; Anderson, T.M.; Lau, Y.S. (1996). Effects of Nicotine Withdrawal on Central Dopaminergic Systems. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 53, (3), 635-640.
- Gaddnas, H.; Pietila, K.; Ahtee, L. (2000). Effects of chronic oral nicotine treatment and its withdrawal on locomotor activity and brain monoamines in mice. *Behavioural Brain Research*, 113, 65-72.
- Gaddnas, H.; Pietila, K.; Petteri Piepponen, T.; Ahtee, L. (2001). Enhanced motor activity and brain dopamine turnover in mice during long-term nicotine administration in the drinking water. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, 70, 497-503.
- Ghosheh, O.; Dwoskin, L.P.; Li, W.K.; Crooks, P.A. (1999). Residence times and half-lives of nicotine metabolites in rat brain after acute peripheral administration of [2<sup>1-14</sup>C]nicotine. *Drug Metabolism & Disposition*, 27, (12), 1448-1455.
- Ghosheh, O.; Dwoskin, L.P.; Miller, D.K.; Crooks, P.A. (2001). Accumulation of nicotine and its metabolites in rat brain after intermittent or continuous peri-



- pheral administration of [2'-14C]nicotine. *Drug Metabolism & Disposition*, 29, (5), 645-651.
- Goutier, W.; O'Connor, J.J.; Lowry, J.P.; McCreary, A.C. (2015). The effect of nicotine induced behavioral sensitization on dopamine D1 receptor pharmacology: An in vivo and ex vivo study in the rat. *European Neuropsychopharmacology*, 25, (6), 933-943
- Halladay, A.K.; Schwartz, M.; Wagner, G.C.; Iba, M.M.; Sekowski, A.; Fischer, H. (1999). Efficacy of Providing Nicotine in a Liquid Diet to Rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 221, (3), 215-223.
- Hansen, A.S.; Garde, A.H.; Christensen, J.M.; Eller, N.; Knudsen, L.E.; Heinrich-Ramm, R. (2001). Reference interval and subject variation in excretion of urinary metabolites of nicotine from non-smoking healthy subjects in Denmark. *Clinica Chimica Acta*, 304, 125-132.
- Hatsukami, D.K.; Lexau, B.; Nelson, D.; Pentel, P.R.; Sofuoglu, M.; Goldman, A. (1998a). Effects of cotinine on cigarette self-administration. *Psychopharmacology*, 138, 184-189.
- Hatsukami, D.K.; Pentel, P.T.; Jensen, J.; Nelson, D.; Allen, S.S.; Goldman, A.; Rafael, D. (1998b). Cotinine: Effects with and without nicotine. *Psychopharmacology*, 135, 141-150.
- Hildebrand, B.E.; Nomikos, G.G.; Bondjers, C.; Nisell, M.; Svensson, T.H. (1997). Behavioral manifestations of the nicotine abstinence syndrome in the rat: peripheral versus central mechanisms. *Psychopharmacology*, 129, 348-356.
- Iarkov, A.; Appunn, D.; Echeverria, V. (2016). Post-treatment with cotinine improved memory and decreased depressive-like behavior after chemotherapy in rats. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 78, (5), 1033-1039.
- Irvine, E.E.; Bagualasta, M.; Marcon, C.; Motta, C. (2001). Nicotine self-administration and withdrawal: modulation of anxiety in the social interaction test in rats. *Psychopharmacology*, 153, 315-320.
- Kyerematen, G.A.; Vesell, E.S. (1991). Metabolism of nicotine. *Drug Metabolism Reviews*, 23, (1&2), 3-41.
- Lea, R.A.; Dickson, S.; Benowitz, N.L. (2006). Within-subject variation of the salivary 3HC/COT ratio in regular smokers: Prospects for estimating CYP2A6 enzyme activity in large-scale surveys of nicotine metabolic rate. *Journal of Analytical Toxicology*, 30, 386-389.
- Lorenzo, P.; Ladero, J.M.; Leza, J.C. y Liza-soain, I. (1998). *Drogodependencias. Farmacología. Patología. Psicología. Legislación*. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Mathieu-Kia, A.M.; Kellogg, S.H.; Butelman, E.R.; Kreek, M.J. (2002). Nicotine addiction: Insight from recent animal studies. *Psychopharmacology*, 162, 102-118.
- Miller, R.P.; Rotenberg, K.S.; Adir, J. (1997). Effects of dose on the pharmacokinetics of intravenous nicotine in the rat. *Drug Metabolism & Disposition*, 5, (5), 436-443.
- Nakajima, M.; Yamagishi, S.I.; Yamamoto, H.; Yamamoto, T.; Kuroiwa, Y.; Yokoi, T. (2000). Deficient cotinine formation



- from nicotina is attributed to the whole deletion of the CYP2A6 gene in humans. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 67, (1), 57-69.
- Nakajima, M.; Kuroiwa, Y.; Yokoi, T. (2002). Interindividual differences in nicotine metabolism and genetic polymorphisms of human CYP2A6. *Drug Metabolism Reviews*, 34, (4), 865-877.
- Nisell, M.; Nomikos, G.G.; Hertel, P.; Panagis, G.; Svensson, T.H. (1996). Condition-independent sensitization of locomotor stimulation and mesocortical dopamine release following chronic nicotine treatment in the rat. *Synapse*, 22, 369-381.
- O'Dell, L.E.; Bruijnzeel, A.W.; Ghozland, S.; Markou, A.; Koob, G.F. (2004). Nicotine withdrawal in adolescent and adult rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1021, 167-174.
- O'Dell, L.E.; Bruijnzeel, A.W.; Smith, R.T.; Parsons, L.H.; Merves, M.L.; Goldberger, B.A.; Richardson, H.N.; Koob, G.F.; Markou, A. (2006). Diminish nicotine withdrawal in adolescent rats: Implication for vulnerability to addiction. *Psychopharmacology*, 186, 612-619.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). (1993). Guidelines for Testing of Chemicals 401.
- Pelkonen, O.; Rautio, A.; Raunio, H.; Pasanen, M. (2000). CYP2A6: a human coumarin 7-hydroxylase. *Toxicology*, 144, 139-147.
- Rama Sastry, B.V.; Chance, M.B.; Singh, G.; Horn, J.L.; Janson, V.E. (1995). Distribution and retention of nicotine and its metabolite, cotinine, in the rat as a function of time. *Pharmacology*, 50, 128-136.
- Riah, O.; Courrière, P.; Dousset, J.C.; Todeschi, N.; Labat, C. (1998). Nicotine is more efficient than cotinine at passing the blood-brain barrier in rats. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 78, (3), 311-318.
- Riah, O.; Dousset, J.C.; Courrière, P.; Stigliani, J.L.; Baziard-Mouysset, G.; Belahsen, Y. (1999). Evidence that nicotine acetylcholine receptors are not the main target of cotinine toxicity. *Toxicology Letters*, 109, 21-29.
- Sam Niedbala, R.; Haley, N.; Kardos, S.; Kardos, K. (2002). Automated homogeneous immunoassay analysis of cotinine in urine. *Journal of Analytical Toxicology*, 26, 166-170.
- Schroff, K.C.; Lovich, P.; Schmitz, O.; Aschhoff, S.; Richter, E.; Remien, J. (2000). Effects of cotinine at cholinergic nicotinic receptors of the sympathetic superior cervical ganglion of the mouse. *Toxicology*, 144, 99-105.
- Slotkin, T.A. (2002). Nicotine and the adolescent brain: Insights from an animal model. *Neurotoxicology and Teratology*, 24, (3), 369-384.
- Shoib, M.; Stolerman, I.P. (1999). Plasma nicotine and cotinine levels following intravenous nicotine self-administration in rats. *Psychopharmacology*, 143, 318-312.
- Stolerman, I.P. (1999). Inter-species consistency in the behavioural pharmacology of nicotine dependence. *Behavioural Pharmacology*, 10, 559-580.



- Sziráki, I.; Sershen, H.; Benuck, M.; Lipovac, M.; Hashim, A.; Cooper, T.B.; Allen, D.; Lajtha, A. (1999). The effect of cotinine on nicotine- and cocaine-induced dopamine release in the nucleus accumbens. *Neurochemistry*, 24, (11), 1471-1478.
- Tricker, A.R. (2003). Nicotine metabolism, human drug metabolism polymorphisms and smoking behaviour. *Toxicology*, 183, 151-173.
- Vainio, P.J.; Tuominen, R.K. (2001). Cotinine binding to nicotine acetylcholine receptors in bovine chromaffin cell and rat brain membranes. *Nicotine & Tobacco Research*, 3, 177-182.
- Vainio, P.J.; Viluksela, M.; Tuominen, R.K. (1998). Nicotine-like effects of cotinine on protein kinase C activity and noradrenalina release in bovine adrenal chromaffin cells. *Journal of Autonomic Pharmacology*, 18, 245-250.
- Winer, B.J.; Brown, D.R. y Michels, K.M. (1991). *Statistical principles in experimental design*. New York: McGraw-Hill Book Company.
- Wiley, J.L.; Marusich, J.A.; Thomas, B.F.; Jackson, K.J. (2015). Determination of Behaviorally Effective Tobacco Constituent Doses in Rats. *Nicotine & Tobacco Research*, 17, (3), 368-71.
- Zúñiga, J.M., Tur Marú, J.A., Milocco, S. y Piñeiro, R. (2001). *Ciencia y Tecnología en protección y experimentación animal*. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana.