



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA UNAM

**EFFECTO DE NICOTINA SOBRE EL DESARROLLO PERINATAL DE LOS SISTEMAS COLINÉRGICOS
Y CIRCADIANOS EN EL RATÓN.**

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA
MARTÍN ALEJANDRO FUENTES CANO

DIRECTOR DE TESIS
DRA. PILAR DURÁN HERNÁNDEZ
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ TUTOR

DRA. MARÍA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO
FACULTAD DE MEDICINA

DR. MANUEL MIRANDA ANAYA
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD DE MEXICO, CIUDAD UNIVERSITARIA, NOVIEMBRE, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biología Animal Experimental (LBAE) de la Facultad de Ciencias en Ciudad Universitaria, UNAM, bajo la tutela de la Dra. Pilar Durán Hernández. El proyecto fue financiado por los recursos otorgados al LBAE-FC 2015-2020, por el programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas y el apoyo PAPIIT-IA207419 y IA207521, Así mismo, al CONACYT por el apoyo con la beca con número de registro 364988.

AGRADECIMIENTOS

I. Institucionales y académicos

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biomédicas de la UNAM por todos los desafíos y gratificaciones que obtuve en mi formación. Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México UNAM por la formación y oportunidades obtenidas.

A CONACYT (becario posgrado 364988 y beca mixta 557842) por el apoyo para dedicarme a mi formación y los recursos para mi proyecto doctoral.

A la Dra. Pilar Durán Hernández por la tutoría, guía académica, apoyo incondicional y el ejemplo de investigador que inspira, apoyando a todos sus alumnos y nunca rendirse superar todos los obstáculos que se presentan en la vida académica y personal

A mis sinodales Dr. Manuel Miranda Anaya y la Dra. María de la Luz Navarro Angulo por la formación y observaciones a lo largo de todo el proyecto.

A los miembros del jurado por las observaciones y aportaciones a tesis.

A la Facultad de Ciencias y el Laboratorio de Biología Animal Experimental (LBAE) por darme un espacio para desarrollarme académicamente.

A los miembros de LBAE que me dieron apoyo para realizar el doctorado:

- Al Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez por la guía y apoyo en el laboratorio.
- Al Dr. Alonso Martínez Canabal por su apoyo en el proyecto y consejos.
- A la M. en C. María Nayeli Ortega Villegas por el apoyo en procesamiento de muestras y críticas constructivas al proyecto.
- A la Bióloga Dulce Jocelyn Bustamante Valdez por su apoyo en la parte experimental, supervisión de animales y críticas constructivas al proyecto.

A los miembros Laboratorio de Biología de la Reproducción en el Instituto Nacional de Pediatría.

- A la Dra. Rosa María Viguera Villaseñor y al Dr. Julio César Rojas Castañeda por permitirme aprender técnicas fundamentales en su laboratorio.
- Al Técnico Pedro Medina por su apoyo y experiencia en las técnicas de Inmunohistoquímica.

II. Personales

- A mi familia y amigos que siempre estuvieron para apoyarme.
- A mis compañeros del LBAE que siempre estuvieron dispuestos a apoyarme en las largas jornadas.

ÍNDICE

1. Resumen	5
2. Antecedentes	7
a. Desarrollo del Sistema Nervioso Central en mamíferos altriciales	
i. <i>Periodos críticos en el desarrollo del cerebro en mamíferos</i>	
ii. <i>Alteraciones durante el desarrollo</i>	
b. Sistema colinérgico	
c. Ontogenia de los elementos y las subunidades como respuestas cronotróficas	
d. Sistema Circadiano y ritmos circadianos	
i. <i>Reloj molecular circadiano</i>	
ii. <i>Reloj Circadiano en Mamíferos</i>	
e. Nicotina y su interacción en el desarrollo del SNC	
i. <i>Nicotina y el desarrollo del sistema nervioso central</i>	
ii. <i>Nicotina y el desarrollo del sistema circadiano</i>	
iii. <i>Nicotina y el Núcleo Supraquiásmático</i>	
3. Justificación	28
4. Hipótesis	28
5. Objetivo General	29
6. Objetivos Particulares	29
7. Material y Método	29
a) <i>Animales y obtención de grupos</i>	
b) <i>Metodología y protocolos</i>	
8. Resultados y Análisis de datos	34
9. Discusión	41
10. Conclusión	44
11. Referencias	46
12. Anexo 1 Cuantificación de nicotina y cotinina en sangre	51
13. Anexo 2 Protocolo para Inmunohistoquímica	52
14. Artículo	53

1. Resumen

La nicotina es un alcaloide psicoactivo cuya exposición prolongada se ha convertido en un problema de salud pública debido a su capacidad adictiva sobre el sistema nervioso central y sus efectos en la salud en general. Las mujeres gestantes y sus productos en desarrollo, son uno de los grupos más vulnerables, dado que esta sustancia tiene la capacidad de atravesar la barrera placentaria y repercutir en el desarrollo del embrión y el feto, alterando el curso de los periodos críticos del desarrollo del sistema colinérgico en particular pero del sistema nervioso central en general, lo que puede producir alteraciones en la integración de respuestas conductuales y fisiológicas en el mediano y largo plazo de la vida postnatal. El objetivo de este proyecto es evaluar el impacto de la exposición de nicotina durante el periodo perinatal sobre la respuesta conductual de la actividad locomotriz y su regulación molecular en el Núcleo Supraquiasmático en la etapa adulta. Los resultados demuestran que la exposición a la nicotina perinatal modifica la expresión circadiana de la actividad locomotriz, disminuyendo la capacidad de mantenimiento del ritmo endógeno (disminución o arritmicidad) y de sincronización a fotoperiodos luz-oscuridad (deficiencias en la resincronización). Por otro lado, al analizar las proteínas de genes reloj, BMAL (asa positiva) y PER1 (asa negativa) en el núcleo supraquiasmático, se observó que la oscilación circadiana en sujetos expuestos a nicotina durante la gestación, se observaron dos cambios importantes en las características del ritmo, BMAL presentó un adelanto de fase de 8 h, en tanto PER1 un atraso de 4 h así como de ritmicidad, lo que podría significar que el gen *per1* aumentó su expresión fuera de su temporalidad endógena circadiana. Estos resultados sugieren que la exposición a la nicotina durante el desarrollo perinatal, provoca una cascada de efectos sobre el sistema colinérgico, sus periodos críticos y su maduración promoviendo una sobreestimulación de los receptores nicotínicos y alterando permanentemente el control circadiano molecular en el núcleo supraquiasmático afectando de manera directa la ritmicidad de respuestas conductuales y fisiológicas.

PALABRAS CLAVE: nicotina, periodos críticos, núcleo supraquiasmático, BMAL, PER, exposición perinatal

Abstract

Exposure to alkaloid substances as nicotine has become a public health problem due to its addictive nature, the central nervous system, and general health. One of the most vulnerable groups are pregnant women and their developing children. Nicotine can cross the placental barrier and potentially disrupt embryonic and fetal development, particularly during critical periods of central cholinergic system development, which may result in disturbances in the integration of behavioral and physiological responses throughout life postnatal in the medium and long term. The objective of this project was to evaluate the impact of perinatal nicotine exposure on the behavioral response of locomotor activity rhythm and its molecular regulation in the suprachiasmatic nucleus during adulthood. The results show that exposure to perinatal nicotine modifies the circadian response in locomotor activity, reducing its ability to maintain the endogenous rhythm and synchronization to light-dark photoperiods, which manifests as arrhythmias and resynchronization failures. On the other hand, the behavioral results correlate with what was reported for clock proteins, where the circadian oscillatory expression of the suprachiasmatic nucleus proteins BMAL (positive loop) and PER1 (negative loop) was evaluated. The nicotine-exposed group exhibited two important changes in rhythm characteristics, an 8-hour advance in BMAL and a 4-hour delay in PER1 expression with arrhythmia. These results suggest an overstimulation in the expression of the clock genes that affects the control of endogenous temporality. Therefore, we conclude that exposure to nicotine during perinatal development produces cholinergic system overstimulation through nicotinic receptors, permanently affecting the molecular control of the suprachiasmatic nucleus circadian system, and directly affecting the rhythmicity of behavioral, and physiological responses.

KEYWORDS nicotine, critical periods, suprachiasmatic nucleus, BMAL, PER1, perinatal exposure

2. Antecedentes

Desarrollo del sistema nervioso central en mamíferos altriciales

Los mamíferos altriciales son aquellos que nacen con el sistema nervioso aún en desarrollo y requieren de cuidados maternos durante el periodo postnatal temprano, ejemplos son, el humano y roedores como la rata y el ratón. En estos animales el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) involucra una serie de procesos secuenciados y altamente regulados como la neurogénesis, la migración y diferenciación neuronal, la gliogénesis, la mielinización, la formación de redes sinápticas, la síntesis y la liberación coordinada de neurotransmisores, así como la apoptosis selectiva (Morgane et al., 1993; Rodier, 1994; Finlay y Darlington, 1995).

Durante el desarrollo temprano podemos ubicar tres eventos de histogénesis general del SNC de los mamíferos en tres estados:

- Organogénesis.
- Producción de neuronas y de glía.
- Diferenciación de neuronas y glía inmadura.

El desarrollo del cerebro está determinado por series de eventos sucesivos que se presentan en las etapas prenatal y postnatal temprana., Cada uno de los eventos permite, induce o precede el desarrollo del siguiente; por lo que, si alguno no se lleva a cabo o es alterado provoca una cascada de efectos o cadena de reacciones que pueden amplificar errores funcionales, que dan como resultado afectando el desarrollo y maduración del cerebro, así como la expresión de funciones cognitivas complejas (inteligencia, atención, aprendizaje) y el desempeño correcto del organismo en general.

Existe una gran cantidad de factores, tanto endógenos como exógenos que pueden influir en el correcto desarrollo del SNC y sus periodos críticos; de manera que la naturaleza y severidad de la perturbación depende de la sincronización del factor con el estado de desarrollo (Dobbing, 1990; Rodier, 1994).

El desarrollo del SNC se puede clasificar en tres fases de solapamiento (Morgane et al., 1993):

- 1) Desarrollo genético del sistema nervioso, en donde se presenta el desarrollo de los tejidos y número de neuronas destinadas a producirse, así como los factores de sobrevivencia y muerte celular.
- 2) Interacción de la instrucción genética embrionaria con el medio celular, definiendo tamaño y talla del sistema nervioso, ya que en esta etapa se ajusta la interacción en el potencial y grado de proliferación de la muerte celular programada.
- 3) Transformación en el cerebro del arreglo funcional en relación con el ambiente que lo rodea, mejorando la organización neuronal en forma, número y distribución, crecimiento de dendritas, conexiones sinápticas y sistema de neurotransmisión.

Periodos críticos en el desarrollo del cerebro en mamíferos

En el desarrollo se presentan una serie de etapas en donde los eventos previos afectan a los procesos presentes y a los subsecuentes. En las etapas de desarrollo temprano se encuentran periodos donde hay mayor susceptibilidad a daños irreversibles llamados periodos críticos, mientras que en las etapas finales y en la madurez hay menor susceptibilidad. Un ejemplo claro de estos procesos de desarrollo lo demostró Morgane y colaboradores (2002) al describir los momentos de desarrollo en la rata (Fig 1.)

En los mamíferos, en el cerebro se presenta la construcción de redes neuronales antes y después del nacimiento. Esto se debe a que un organismo que está interactuando con su ambiente presenta una afinación y un ajuste dichas redes neuronales antes y después del nacimiento. Los momentos en donde se presentan estos períodos críticos, es decir, un momento donde los procesos de desarrollo del SNC son vulnerables a ser modificados con gran facilidad por factores exógenos (malnutrición y consumo de sustancias ajenas al organismo entre otros) o endógenos (hormonas) (Dobbing, 1968), después de cada periodo crítico la actividad de conexiones disminuye en número y son menos susceptibles a cambios.

Alteraciones durante el desarrollo

En los estudios que se involucran una línea de tiempo del desarrollo del SNC de los mamíferos altriciales, se ha demostrado que cuando un insulto o daño se presenta en las etapas críticas puede provocar secuelas permanentes o producir una cascada de efectos en la estructura y función del SNC, un ejemplo claro de estos efectos ha sido documentado por Morgane y colaboradores, quienes, a partir de un modelo de malnutrición, determinaron los posibles efectos en estos periodos críticos del desarrollo (Morgane et al., 1993; Fig 1). Estos autores, además, correlacionan los eventos principales del desarrollo cerebral entre dos especies altriciales, la rata y el humano, evidenciando que una maduración y formación de estructuras temporalmente equivalentes, lo que permite usar estos roedores como sujetos en estudio de estos periodos de desarrollo. El ratón tiene un desarrollo del SNC similar al de la rata y al del humano (Rodier 1980, Morgane et al., 2002). En las últimas décadas, Darlington y colaboradores se han dado a la tarea de modelar y correlacionar eventos en diferentes especies de mamíferos para el estudio del desarrollo neuronal más similar al del humano. Dentro de los diferentes modelos que se han propuesto, el ratón se encuentra como uno de los más completos empíricamente y por lo tanto uno de los mejor simulados y correlacionado con el desarrollo humano (Clancy et al., 2007; Darlington et al., 2007; Finley, 1995).

Sistema Colinérgico

El sistema colinérgico está integrado por un conjunto de elementos y procesos en los cuales está involucrada la acetilcolina (ACh), este neurotransmisor está ampliamente distribuido en el SNC, así como en el sistema nervioso periférico autónomo y el somático. La ACh se sintetiza a partir de la colina y la acetil-CoA por medio de la enzima acetiltransferasa (ChAT) en el citoplasma, es almacenada en vesículas; que son mediadas por el transportador vesicular de acetilcolina (TVACH) dentro de las células para su posterior liberación al medio extracelular. La ACh es capaz de interactuar con dos tipos de receptores, los nicotínicos (rAChn), los cuales son ionotrópicos que permiten la entrada de cationes

sodio (Na^+), potasio (K^+) y calcio (Ca^{2+}) a la célula de forma directa, y los muscarínicos (mAChR) que son metabotrópicos y están ligados a proteínas G, las cuales le confieren la capacidad de activar cascadas de señalización dentro de la célula, así como de la regulación (activación – inhibición) de canales catiónicos y aniónicos. La interacción de la ACh con los receptores de membrana celular está limitada por la acetilcolinesterasa (AChE), la cual hidroliza a la ACh en colina y acetato, desactivando los diversos receptores colinérgicos. La colina que queda como residuo después de la hidrólisis es recuperada por un transportador con alta afinidad a la colina (TCh) y transportada dentro de la célula, donde empieza otro ciclo de síntesis y degradación del neurotransmisor. Los elementos mencionados antes son componentes del sistema colinérgico, y se ha demostrado que cada uno de estos tiene un papel importante en el desarrollo del SNC, siendo crítico en la mayor parte de los procesos de señalización y maduración de los sistemas. Algunos ejemplos son: proliferación y diferenciación, neurogénesis, gliogénesis, maduración neuronal y plasticidad, señalización axonal, regulación de la expresión de genes y supervivencia celular, modulación y arborización dendrítica, establecimiento de conexiones y desarrollo de la sinaptogénesis (Abreu-Villaça, Y. 2011; Wickstrom, 2007) (Fig 2).

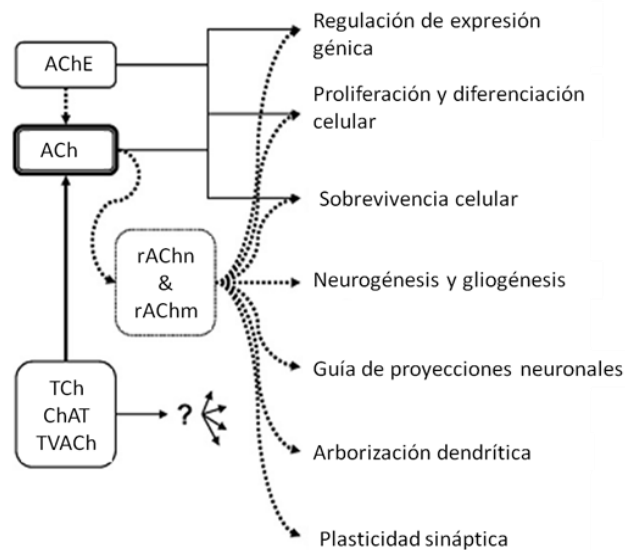


Figura 2. Procesos del desarrollo del SNC donde se ha determinado la participación cronotrófica de los elementos del sistema colinérgico (modificado de Abreu-Villaça *et al*, 2011)

Los receptores nicotínicos neuronales son de las primeras proteínas de membrana que aparecen durante el desarrollo del SNC, en ratones aparecen desde el día embrionario 10 (E10) y se presentan durante prácticamente todo el desarrollo. Esta familia de receptores presenta dos tipos de subunidades, las α ($\alpha 2-10$) y las β ($\beta 2-4$), que constituyen los canales ionotrópicos, los cuales pueden estar conformados por combinaciones de cinco subunidades diferentes o por solo un tipo de subunidad, clasificándolos respectivamente como heteropentaméricos ($\alpha 4\beta 2$ es el más abundante en el cerebro adulto) o por homopentaméricos ($\alpha 7$ el más abundante en el cerebro adulto). Estas subunidades tienen una expresión diferencial a lo largo del desarrollo, por ejemplo, los $\alpha 4$ homopentaméricos son más comunes en etapas tempranas, mientras que los $\alpha 7$ homopentaméricos lo son en etapas maduras, regulando la señalización crítica en diferentes momentos del desarrollo (Taly et al, 2009; O'Hara et al, 1998; Abreu-Villaça, Y. 2011) (Fig 3).

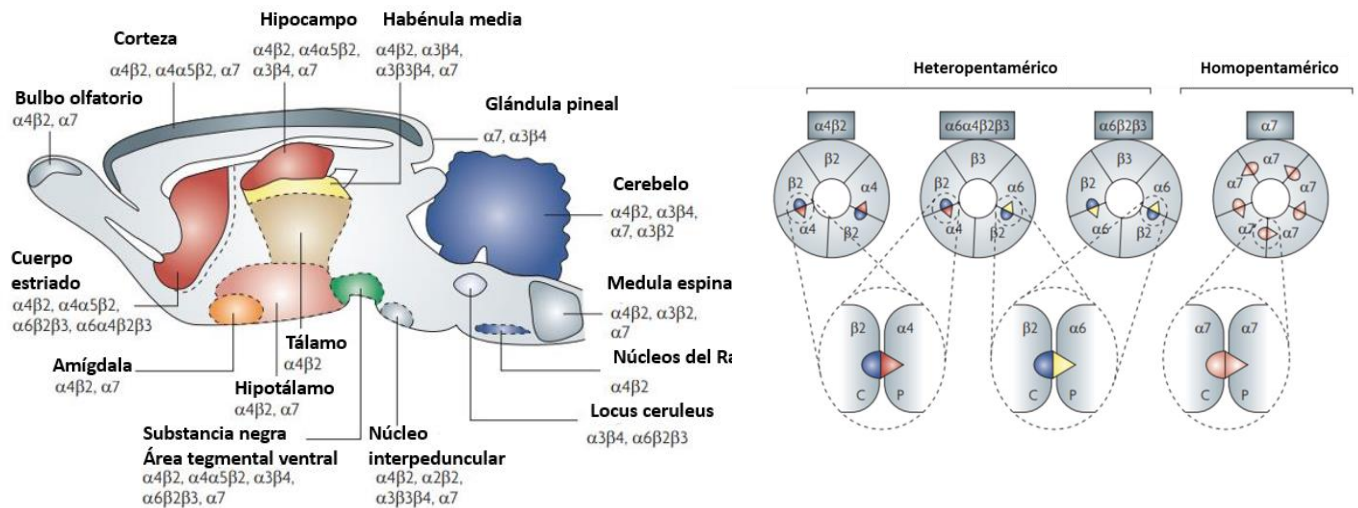


Figura 3. Distribución de los receptores nicotínicos en el cerebro de ratón adulto. Izquierda, los receptores más abundantes por estructura del sistema nervioso central. Derecha, la estructura de los receptores a partir de las subunidades que los conforman (Tomado de Taly, A. et al 2009)

Los rAChn permiten la entrada de iones como Ca^{2+} a las neuronas permitiendo una señalización entre ellas; sin embargo la sensibilidad de entrada de Ca^{2+} no es igual en todos los receptores, esto permite una modulación en los eventos sensibles que requieren el Ca^{2+} , por ejemplo los homopentaméricos $\alpha 7$

permiten una mayor entrada de Ca^{2+} que todos los demás tipos de receptores nicotínicos, haciéndolo uno de los más importantes en la maduración, ya que permite la activación metabólica a través de la entrada de Ca^{2+} (Wickstrom, 2007; Abreu-Villaça et al., 2011).

La acetilcolina mediante los rAChn, posee funciones vitales virtualmente en todas las fases de maduración del cerebro, modulando desde etapas tan tempranas como la gastrulación y las formaciones tempranas del tubo neural. Los rAChn participan regulando en los periodos críticos de la maduración del cerebro durante los periodos prenatales, postnatales tempranos y juveniles. Durante estas ventanas de desarrollo regulan o permiten el cambio de subunidades en las estructuras neuronales, especialmente en la diferenciación y sinaptogénesis, que son las sensibles a estímulos ambientales (Dwyer et al., 2009).

Todos los eventos antes mencionados de la respuesta a través de los rAChn están inmersos en el concepto de “programación del desarrollo” o “programación perinatal”, en donde los efectos a largo plazo en la vida de los individuos están determinados por la expresión génica y funciones celulares en respuesta a los eventos durante los periodos en la vida perinatal y la respuesta de los rAChn (Wickstrom, 2007).

Ontogenia de los elementos y las subunidades como respuestas cronotróficas.

La concentración de la mayoría de los neurotransmisores se va incrementando en el desarrollo temprano conforme se van estableciendo las sinapsis, induciendo una regulación de los diferentes procesos críticos de la maduración de los organismos, incluso los diferentes sistemas de neurotransmisores están involucrados en la maduración de sí mismos y de los demás sistemas (Herlenius & Lagercrantz, 2004), un ejemplo de esto es la alta tasa de actividad que tienen los elementos del sistema colinérgico en la maduración de los demás sistemas de neurotransmisores mientras regulan su misma maduración, además este sistema es de los primeros en establecerse en el desarrollo, la expresión de algunos de sus elementos se presentan desde el día E2, participando en el establecimiento

del polo animal, y es de los últimos en terminar de madurar (8 semanas postnatal en roedores) (Abreu-Villaça *et al*, 2011).

Los componentes del sistema colinérgico se han estudiado en las diferentes etapas del desarrollo, utilizando marcadores, agonistas y antagonistas farmacológicos para observar los cambios en cada proceso involucrado. A continuación, se explica el papel de cada componente en la etapa perinatal del desarrollo.

La ChAT es el marcador de las células colinérgicas por excelencia y se ha observado que juega un papel importante en la síntesis y regulación de la ACh en las diferentes etapas del desarrollo. Durante la etapa prenatal la expresión de la proteína ChAT es relativamente baja y se ha observado que cambios en su actividad desencadenan efectos negativos en el desarrollo de patrones locomotores y movimientos musculares después del nacimiento, así como del mantenimiento del estado de sueño (Ninomiya *et al*, 2001; Ninomiya *et al*, 2005). Los estudios utilizando a ChAT como marcador han permitido seguir la ruta dentro del prosencéfalo de las neuronas colinérgicas, desde el origen, las rutas de migración y los destinos finales, presentándose las primeras neuronas colinérgicas en la eminencia gangliónica medial con un gradiente caudal- rostral entre los días E12 y E18 en ratas y entre los días E14 y E17 en ratones (Semba & Fibiger, 1988; Schambra *et al*, 1989). En la etapa prenatal se han reportado efectos negativos en la actividad de ChAT producidas por estimuladores del sistema colinérgico como la nicotina. En particular en el tronco encefálico y en la corteza cerebral se observa una reducción de su actividad; sin embargo, no manifestaron alteraciones en el desarrollo de las proyecciones periféricas, en particular a la glándula adrenal (Navarro *et al*, 1989). Se ha determinado la expresión de genes que son morfógenos para la diferenciación y establecimiento del sistema colinérgico, algunos de los más relevantes son de *Lhx7*, *Lhx8*, *Gbx1* y *Olig2*, los cuales están ligados con la expresión de ChAT y AChE en las etapas tempranas del desarrollo (Zhao *et al*, 2003; Mori *et al*, 2004; Fragkouli *et al*, 2006; Furusho *et al*, 2006). Otro gen estrechamente ligado con la actividad de ChAT es el factor del crecimiento nervioso (NFG por sus siglas en inglés). La relación de la actividad del sistema colinérgico con el NFG es fundamental para

el desarrollo de las neuronas colinérgicas y el establecimiento del sistema colinérgico (Cuello *et al*, 1993; Madziar *et al*, 2008).

Se ha reportado la coexpresión de varios elementos del sistema colinérgico en las primeras etapas del desarrollo, dos de los elementos fuertemente ligados son la ChAT y TVACh. Estos elementos están ligados al mismo locus de expresión, por lo que los dos se transcriben consecutivamente, dichos elementos son fundamentales para la síntesis de ACh y la recuperación de la colina en todas las etapas de desarrollo (Eiden 1998; Weihe *et al* 1998). Varios estudios han demostrado que las neuronas colinérgicas mientras migran sintetizan y secretan ACh promoviendo el establecimiento de las sinapsis colinérgicas y el crecimiento de los conos (Allen & Brown, 1996; Antonov *et al*, 1999; Hume *et al*, 1983; Tatsumi *et al*, 1995; Young, 1983; Zakharenko *et al*, 1999).

Para el estudio de los procesos en los cuales los receptores colinérgicos están involucrados se han empleado una gran variedad de agonistas y antagonistas. Durante el desarrollo perinatal, ambas familias de receptores, nicotínicos y muscarínicos, presentan una expresión diferenciada en la conformación de sus subunidades, confiriendo cualidades particulares en momentos específicos sobre la fisiología y respuesta metabólica de las neuronas en proceso de maduración y consolidación (O'hara *et al*, 1999). Estos estudios se han realizado en diferentes momentos del desarrollo, evaluando efectos a corto, mediano y largo plazo. Una de las sustancias que más se ha utilizado es la nicotina, un agonista de la ACh que interactúa con los rAChn; esta molécula es capaz de pasar la barrera placentaria y además puede estar presente en la leche materna (Ajarem & Ahmad, 1998; Slotkin *et al* 1995; Slotkin 2004), para los rAChm se utiliza la muscarina, que es capaz de activarlos de forma similar a la ACh (Mao *et al*, 2007).

En el desarrollo del SNC los rAChn son la primera proteína de membrana en aparecer; esto en el día E10 y conforme madura el SNC se va modificando teniendo una expresión regional y temporal determinada. Ejemplos de esto se pueden observar en la corteza cerebral de la rata, en la cual entre los días E12-E13 se observa una mayor expresión de receptores con subunidades $\beta 2$ mientras que en E17-

19 se expresan subunidades $\alpha 4$, simultáneamente en el hipocampo, durante el E12 el receptor contiene subunidades $\alpha 7$ (Atluri *et al*, 2001; Tribollet *et al*, 2004; Zoli *et al*, 1995). Una característica importante de los diferentes rAChn es su permeabilidad selectiva a los iones, los receptores homopentaméricos presentan mayor permeabilidad al Ca^{2+} mientras que los heteropentaméricos permiten el paso de Na^+ y K^+ . Esta entrada de Ca^{2+} está asociada con varios procesos de señalización y eventos sensibles a este ion. El Ca^{2+} intracelular se ha vinculado a varios procesos en las células como es: la proliferación, la supervivencia celular y el crecimiento neurítico (Resender *et al*, 2008; Dajas-Bailador & Wonnacott, 2004; Abreu-Villaça *et al*, 2011; Kater & Mills, 1991). Otro proceso en el que se han involucrado los rAChn es la regulación conformacional de las diferentes estructuras del cerebro, afectando la morfología, la ruta de migración y el comportamiento de los conos de crecimiento de las neuronas (Rüdiger & Bolz, 2008; Slotkin, 2004). Los rAChn funcionales en la membrana durante el desarrollo postnatal presentan, al igual que en la etapa prenatal, diferenciación de expresión de las subunidades, ejemplo de esto es la baja expresión de subunidades $\beta 2$ en el día posnatal (P) 7 y su pico de expresión en el P14, mientras que las subunidades $\alpha 7$ presentan su pico en el P7 en la corteza y el hipocampo, de la misma forma la expresión cortical de la subunidad $\alpha 4$ se mantiene alta del día P14 al P28 mientras que en el hipocampo su mayor expresión es del día P7 al P14 (Shacka & Robison, 1998).

Dentro de los mecanismos involucrados en la regulación de los distintos procesos del desarrollo del SNC está la regulación génica, la cual a su vez está mediada por un control fisiológico intracelular. Varios genes involucrados en los procesos críticos de maduración en el desarrollo están vinculados a las proteínas de unión a elementos de respuesta a cAMP (CREB por sus siglas en inglés). CREB tiene la función de la regulación de la transcripción de varios genes al acoplarse con CREs (en inglés *calcium/cAMP regulatory elements*) en el DNA y así promover la transcripción de los genes, este factor de transcripción está ligado a la fosforilación promovida por el cAMP y la presencia de Ca^{2+} intracelular. Como ya se mencionó los rAChn juegan un papel primordial en el flujo de Ca^{2+} intracelular de forma directa o indirecta (Huang *et al*, 2000).

Por otro lado, existen 5 subtipos de rAChm, los M1, M3 y M5 son activadores de la fosfolipasa C, el inositol trifosfato y el diacilglicerol que activan el metabolismo de la célula y la liberación de Ca^{2+} intracelular, lo que favorece la transcripción y regulación génica con los mecanismos CREB-CREs, mientras que los M2 y M4 son inhibidores de la actividad de la adenil ciclasa y la reducen la concentración del cAMP. Los rAChm se presentan desde el E13 en la espina dorsal de la rata, en E15 en el mesencéfalo y el romboencéfalo, así como en el E16 en el prosencéfalo. Estos receptores se han vinculado a procesos de desarrollo como proliferación, diferenciación, supervivencia celular y crecimiento de neuritas (Resende *et al*, 2008). También se ha determinado que estos receptores son fundamentales para procesos como el aprendizaje y la memoria, así como la plasticidad neuronal. En las estructuras involucradas en estos procesos se presenta una alta expresión de receptores M1 y M4, en particular en el hipocampo, sugiriendo que su expresión es crucial para un correcto desarrollo en las etapas tempranas (Berkeley *et al*, 2001). En el desarrollo posnatal se ha observado que el papel de los rAChm en la maduración de la corteza visual en ratas es fundamental para la regulación y consolidación de este circuito, los subtipos M1, M3 y M4 aumentan su expresión en esta corteza ante la oclusión de los ojos en ratas, lo cual demuestra su papel fundamental en la maduración de la vía visual (Rossner *et al* 1993).

Estos cambios de expresión de los diferentes componentes del sistema colinérgico están estrechamente ligados con períodos críticos del desarrollo perinatal, involucrándose en los procesos de desarrollo neuronal como son la neurogénesis, la migración celular, la diferenciación, la sinaptogénesis, la proliferación, la supervivencia celular, etc. Este cambio de expresión resulta fundamental para una alta regulación y señalización de cada proceso antes mencionado (Bruehl-Jungerman *et al*, 2011 Ajarem & Ahmad, 1998), ya que alteraciones en estos mecanismos de regulación se han asociado con severos daños en el desarrollo de los fetos a corto, a mediano y a largo plazo, desde retraso en el desarrollo posnatal hasta modificaciones neuronales y conductuales en etapas maduras, ocasionado por alteraciones en la intensidad de la señalización y en el tiempo que se da la programación del neurodesarrollo (Blood-Siegfried & Rende, 2010; Dwyer *et al*, 2009; Huang *et al*, 2007),

Durante el desarrollo tardío, la acetilcolina promueve el cambio de la replicación a la diferenciación y modula la sinaptogénesis, esto se ha observado que con agonistas de ACh como la nicotina, que inducen en el cerebro fetal anomalías de la proliferación celular y diferenciación (Wickstrom, 2007).

Sistema Circadiano y ritmos circadianos

Los organismos vivos presentan oscilaciones diarias que permiten una respuesta temporal adecuada a su entorno y a los estímulos generados por los eventos geofísicos de rotación de la Tierra, estas se denominan ritmos circadianos y son sincronizados por señales ambientales diarias, siendo la luz la señal predominante de sincronización en los ciclos de Luz/Oscuridad (L:O) (Morin L, 1994). En el sistema circadiano (SC) de los mamíferos, el núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo (Fig. 4) es considerado el marcapasos circadiano maestro, controlando ritmos fisiológicos y conductuales por medio de vías de señalización de neurotransmisores y difusión de moléculas (ejem. PK2, JL) de forma directa e indirecta hacia otros núcleos hipotalámicos, regulando además los procesos de atención y de memoria (Morin L, 1994; Morin L, y Allen C, 2006; Welsh DK, et al 2010). El NSQ recibe los cambios ambientales de la luz por medio de la retina y el tracto retinohipotalámico sincronizando los osciladores periféricos circadianos que se encuentran en los órganos y células del cuerpo, por medio de señales neurales y humorales. El NSQ está formado por un sistema de neuronas empaquetadas con comunicaciones intrínsecas de sinapsis químicas y eléctricas, así como paracrinas que permiten una sincronización predictiva para diversas funciones biológicas a lo largo del ciclo natural de día/noche. Las complejas interacciones neurales y humorales del NSQ con otros núcleos del cerebro, del sistema nervioso autónomo y de efectores periféricos, forman un ritmo temporal interno de funciones en segmentos de aproximadamente 24 horas.

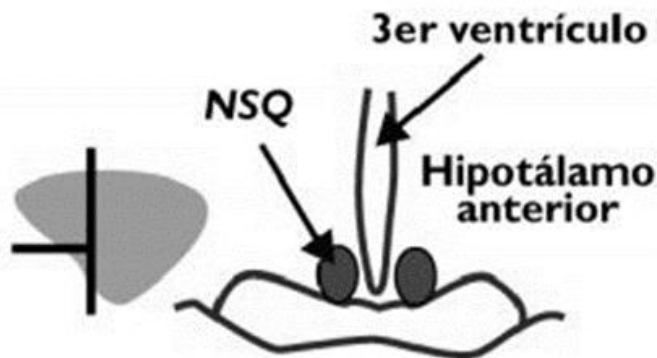


Figura 4. Esquema de la localización y caracterización del NSQ. Derecha: corte coronal del Hipotálamo donde se observa la relación anatómica de las estructuras en roedores. Izquierda: indicación corte en vista lateral del cerebro (Modificado de Aguilar-Roblero R. *et al.* 2004).

Durante el desarrollo prenatal del sistema circadiano no se presentan oscilaciones autosostenidas de expresión como en la vida adulta o postnatales, sin embargo, es capaz de responder a las señales del ambiente donde se desarrolla, siendo las señales maternas las principales, por ejemplo, durante su desarrollo el feto es responsivo a las señales externas que provienen de la madre siendo principalmente ritmos de actividad sueño-vigilia, temperatura, frecuencia cardíaca, ciclos de melatonina, dopamina, cortisol, estradiol y progesterona, que después tienen efecto directo sobre su fisiología y en etapas posteriores de su desarrollo (Serón-Ferré *et al.*, 2001).

La exposición a un insulto en el desarrollo temprano del NSQ resulta en alteraciones circadianas que pueden ser cognitivas y de comportamiento en la descendencia, modificando su desempeño circadiano en la etapa adulta (Herzog, 2007; Mendoza, 2009; Klein y cols, 1991; Moore, 1983; Waterhouse y cols, 2000; Durán y cols, 2011; Hut, 2011).

Reloj molecular circadiano

En mamíferos adultos se ha descrito la presencia de un reloj molecular circadiano en prácticamente todos los tejidos, sin embargo, la mayoría de los tejidos pierden las oscilaciones del reloj molecular circadiano conforme pasan los ciclos se atenúan y desaparecen eventualmente, solo en el NSQ se ha

observado que las oscilaciones son autosostenidas y pueden mantenerse por un número indefinido de ciclos, como habíamos dicho, algo que no pasa en otros tejidos, es así que, en el NSQ en adultos, este reloj es regulado molecularmente mediante una doble asa de retroalimentación de expresión de genes reloj, siendo los principales en las asas de retroalimentación *Clock*, *Per*, *Bmal1* y *Cry*, las proteínas CLOCK-BMAL son elementos activadores de *Per* y *Cry* y las proteínas PER-CRY son elementos represores de su propia transcripción (Fig 5), sumado a esto tenemos elementos que interactúan con el gen *Bmal1* en el asa positiva, los cuales son de forma activadora de transcripción ROR y de forma inhibitoria REV-ERB. La expresión de *Bmal1* y *Per* están en antifase a lo largo del día, de tal forma que *Per* presenta su máxima expresión al final de la fase oscura y *Bmal1* al principio de la fase oscura, esta relación tiene una duración aproximada de 24 hrs lo que confiere un ritmo endógeno circadiano. El dímero CLOCK-BMAL es un factor activador de otros genes denominados “genes controlados por reloj” (CCGs en inglés), esta relación en antifase permite una expresión autosostenida en el reloj molecular circadiano y al mismo tiempo proporciona una propagación temporal para la funciones fisiológicas y conductuales a través de la señalización (Ohdo S., 2010; Lefta M., 2011).

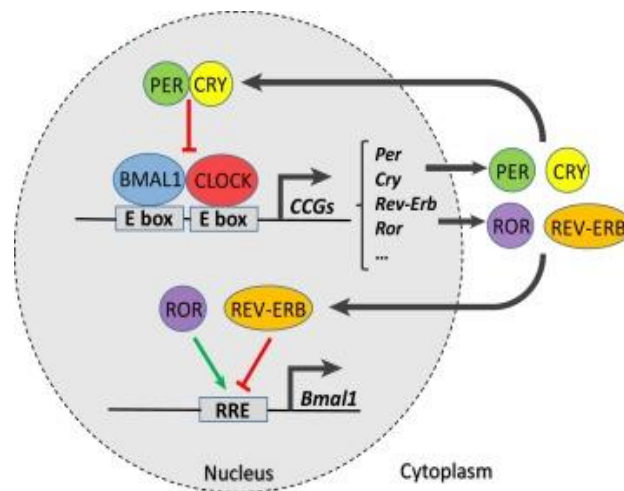


Figura 5. modelo de retroalimentación negativa del reloj molecular circadiano. Donde se muestra la arquitectura molecular del reloj circadiano molecular de mamíferos, donde el asa positiva está dada por CLOCK y BMAL, mientras que la negativa por CRY y PER. CLOCK-BMAL son factores de transcripción que regulan la expresión de genes regulados por reloj (CCGs) incluyendo PER, CRY, ROR y REV-Erb. PER y CRY se dimerizan y reprimen su propia expresión al traslocarse con el dímero BMAL1-CLOCK. Así mismo la expresión de BMAL1 está regulada de forma positiva por ROR e inhibitoria por REV-ERB Tomado de Yi-Ying Chiou 2016.

Reloj Circadiano en Mamíferos

El reloj circadiano genera una oscilación cercana a 24 horas en un sistema biológico y es capaz de presentarla en ausencia de entradas cíclicas ambientales, esto es importante para la medición del tiempo, ya que el organismo puede llevar a cabo funciones cíclicas en ausencia del estímulo externo. Se ha visto que la presencia de oscilaciones es inherente a la función celular individual, y que en organismos complejos existe un sistema cronométrico especializado en generar y regular las funciones implícitas en el concepto de reloj biológico.

El sistema circadiano en mamíferos está constituido por una vía de entrada visual (fotorreceptores que median la sincronización); una estructura de marcapasos (generadora de la señal circadiana); vías de salida que comuniquen al marcapasos con los sistemas efectores. En mamíferos esto está formado por células de la retina (entrada fótica), células ganglionares tipo W, que están conectadas por el tracto retino-hipotalámico al NSQ (oscilador maestro o marcapasos); el cual modula la respuesta de múltiples vías de salida constituidas por nervios eferentes y por señales humorales y hormonales de glándulas anexas (ej. Pineal e hipófisis) (Yamazaki y Straume. 2002). El NSQ secreta varios neurotransmisores para comunicación celular endógena y exógena, como arginina vasopresina, el neuropéptido Y, el péptido vasoactivo intestinal (VIP) y el ácido γ -amino butírico (GABA) (Biello et al, 1997).

El NSQ está compuesto por una corteza y un núcleo diferenciadas por su composición citoquímica y quimioarquitectura, dando una mejor respuesta cuando estas dos partes se asocian y trabajan en conjunto (Dunlap, Loros y DeCoursey, 2004). Existen ritmos secretores, como son, el de melatonina, del neuropéptido-Y y de serotonina, los cuales tienen la función modular las funciones del reloj maestro, manteniéndolo ajustado a un ritmo constante. El NSQ está conectado a diversos núcleos del hipotálamo, del tálamo y de la región preóptica por axones, estas salidas llevan las señales de control de los ritmos circadianos endocrinos, neuroendocrinos y autonómicos. Otros ritmos que puede controlar son los de vigilia y de integración sensoriomotora, ya que tiene conexiones en el área retroquiasmática hacia el

tallo cerebral y la médula espinal. La mayoría de las estructuras a las que el NSQ está conectado tienen vías de regreso formando asas de retroalimentación (Dunlap, Loros y DeCoursey, 2004).

Estas señales presentan comunicación con osciladores periféricos, que son células, tejidos u órganos que presentan oscilaciones del reloj molecular circadianos, como son el hígado, riñones, corazón, etc., y aunque pueden ser autónomos y autosostenidos, pueden no presentar de manera sincrónica dentro de la estructura las oscilaciones como ocurre en el NSQ, además en cultivo ex vivo pierden la sincronización entre las células después de pocos ciclos, a comparación del NSQ que los puede mantener indefinidamente (Kramer, 2009).

Nicotina y su interacción en el desarrollo del SNC

Como ya fue mencionado, durante el desarrollo del SNC, se lleva a cabo una cascada de señalizaciones a partir de neurotransmisores, que actúan a nivel celular y sobre su propia arquitectura. Es por esto que el consumo de sustancias que tienen efecto en estos eventos críticos, puede tener repercusiones a largo plazo. La nicotina es un compuesto alcaloide que se encuentra en el tabaco y es el responsable de generar adicción en los consumidores; ésta es la razón por la que a nivel mundial los niveles de consumo de tabaco y nicotina se han incrementado en las últimas décadas, permeando en todos los niveles de la sociedad. Esto representa un problema de salud pública ya que el consumo de tabaco y derivados no sólo afecta al que lo consume directamente (activo), sino que también a los que están cerca (pasivo); esta característica representa un gran daño para los productos de las mujeres que se encuentran en gestación, debido a que la nicotina es capaz de atravesar la barrera placentaria y tener efectos directos sobre el desarrollo del feto. La nicotina es un agonista de la acetilcolina y es capaz de interactuar sobre rAChn, los cuales como ya fue mencionado, son fundamentales en los procesos de señalización y maduración del SNC, teniendo mayor repercusión en los periodos prenatal, postnatal y en la pubertad (Dwyer et al., 2009; Slotkin, 2004).

La administración de nicotina en adultos ha demostrado tener efecto directo sobre parámetros

fisiológicos como la frecuencia cardiaca, la temperatura corporal, la actividad locomotriz, y más aún, se ha observado que, en dosis repetidas diarias, los parámetros mencionados se ven alterados de diferente manera dependiendo del tiempo de administración (Pelissier et al., 1998). En roedores también existe evidencia de que la administración de estimulantes colinérgicos en el NSQ, como la nicotina, inducen grandes cambios de fase en actividades rítmicas conductuales, como el ritmo circadiano sueño-vigilia, y también afecta la comunicación en conexiones sinápticas de cuerpos de células colinérgicas, presentando en quienes la consumen problemas en el estado de alerta, disminución del sueño y su eficiencia, somnolencia diurna y nocturna, sugiriendo una importante influencia en el sistema circadiano y otros sistemas como el endócrino y el inmune (O'Hara et al., 1998).

Nicotina y el desarrollo del sistema nervioso central

El desarrollo del sistema nervioso central, como ya había sido mencionado, en los mamíferos involucra una serie de cambios secuenciales y altamente regulados, integrando división celular, migración celular, diferenciación celular, mielinización, formación de redes sinápticas, síntesis y liberación de neurotransmisores y muerte celular.

La exposición prenatal de nicotina en el desarrollo, produce cambios a largo plazo en el desarrollo del cerebro y comportamiento de los individuos (Slotkin, 2004). Las alteraciones se observan desde la señalización colinérgica que está regulada por otros neurotransmisores incluyendo la dopamina, y otros neurotransmisores que regulan la neurogénesis, migración neuronal y diferenciación, así como la inducción (o prevención) de apoptosis. La exposición a la nicotina provoca consecuencias que van más allá de la disfunción colinérgica. Existen estudios que han demostrado que la exposición a la nicotina altera la señalización dopaminérgica en el cerebro fetal, y está desempeña un papel clave en la regulación del desarrollo del cerebro fetal (Bhide, 2009).

En particular los receptores rAChn y la señalización nicotínica en el desarrollo neural presentan variaciones en la distribución en el cerebro, sugiriendo un importante rol de estos receptores en la

modulación y crecimiento de las dendritas, establecimiento conexiones y desarrollo de sinaptogénesis, lo que ya ha sido observado en ratones en etapas muy tempranas del desarrollo (Wickstrom, 2007).

Mediante rAChn la acetilcolina posee funciones vitales virtualmente en todas las fases de maduración del cerebro, influenciando desde etapas tan tempranas como la gastrulación y las formaciones tempranas del tubo neural. De esta forma, la ACh y los rAChn participan en los aspectos críticos de la maduración del cerebro durante los periodos prenatales, postnatales tempranos y adolescencia, durante estas ventanas de desarrollo, el cambio en la composición de las subunidades de los rAChn en las estructuras neuronales, modulan especialmente la diferenciación y sinaptogénesis, las cuales son etapas sensibles a estímulos ambientales (Dwyer et al., 2009). Durante el desarrollo tardío, la acetilcolina promueve el cambio de la replicación a la diferenciación y modula la sinaptogénesis, se ha observado que la nicotina tiene un efecto en el cerebro fetal, específicamente induce de anomalías en la proliferación celular y diferenciación (Wickstrom, 2007).

Otro efecto de la nicotina que se ha observado es el daño de células del cerebro, ya que puede aumentar los niveles de biomarcadores de daño celular (ej. actividad de ornitina descarboxilasa) y una disminución en los niveles de DNA.

Nicotina y el desarrollo del sistema circadiano

En el adulto, las interacciones del NSQ con otros núcleos del cerebro, el sistema nervioso autónomo y efectores periféricos son fundamentales para el ritmo cíclico circadiano endógeno, estos ciclos se pueden ver afectados por la exposición a factores externos como drogas o estimulantes. La administración de nicotina en adultos, ha demostrado tener efecto directo sobre parámetros fisiológicos como frecuencia cardíaca, temperatura corporal, la actividad locomotriz, y más aún, en dosis repetidas diarias, los parámetros de estos ritmos se ven alterados por periodos que dependen del tiempo de administración (Pelissier et al., 1998). También existe evidencia en roedores de que la administración

de estimuladores colinérgicos en el NSQ, como la nicotina, inducen grandes cambios de fase en el comportamiento en el ritmo circadiano de sueño-vigilia, y afecta la comunicación en conexiones sinápticas de cuerpos de células colinérgicas, presentando en quienes la consumen problemas en el estado de alerta, sugiriendo una importante influencia en el sistema circadiano (O'Hara et al., 1998).

Así mismo, está bien establecido que, durante el desarrollo del feto, las señales externas provienen de la madre, y van al NSQ en desarrollo del feto, siendo principalmente ritmos de actividad sueño-vigilia, temperatura, frecuencia cardíaca, y ciclos de melatonina, dopamina, cortisol, estradiol y progesterona, los que tienen efecto directo (Serón-Ferré et al., 2001).

Alteraciones en el desarrollo temprano del NSQ pueden resultar en perturbaciones cognitivas, conductuales, fisiológicas y metabólicas, al alterar el sistema de control circadiano de manera permanente, tal es el caso de las disrupciones circadianas, mismas que se han asociado con trastornos de hiperactividad y déficit de atención o en el trastorno del espectro autista (Logan, RW y McClung; 2019) así como en la depresión en el adulto (David JK, 2002). Es por esto que el desarrollo temprano del NSQ es una etapa crucial para su correcto funcionamiento en la vida adulta, ya que la evidencia sugiere que durante el desarrollo fetal el sistema circadiano es inmaduro, no presenta oscilaciones autosostenidas de expresión como en la vida adulta o en etapas postnatales, y por lo tanto puede ser la etapa más vulnerable a cambios permanentes por perturbaciones exógenas (Dolatshad, H., et al 2010).

Nicotina y el núcleo supraquiasmático

Durante el desarrollo del NSQ la señalización intercelular es de suma importancia, como son los segundos mensajeros y los cambios en la fisiología celular, así como el establecimiento de las variaciones cíclicas de la expresión génica. De los mRNA más importantes para la generación y mantenimiento de los ritmos está c-fos, que es un gen de respuesta rápida a varios estímulos en las neuronas, su labor fundamental es coadyuvar en la comunicación entre neuronas. Se ha demostrado

que la administración de nicotina durante el desarrollo perinatal tiene una fuerte respuesta en estructuras del cerebro como el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), la habénula medial y el NSQ, particularmente con la inducción de la síntesis del mRNA de c-fos, resultando en un desacoplamiento de la inducción de c-fos entre el NSQ materno y el fetal. Las inducciones de otros genes que están estrechamente asociados al cambio de fase del reloj circadiano, en acoplamiento directo o indirecto de las asas de transcripción, pueden activarse por la presencia de un estímulo, como son señales lumínicas o por señalizadores colinérgicos como la nicotina, en estos procesos c-fos al activarse de forma rápida promueve la comunicación neuronal además que se ha reportado una basal circadiana de este gen (Rebecca A. et al, 1994). Otra consecuencia del efecto de la nicotina sobre el desarrollo del NSQ es producida por la señalización mediante los receptores rAChn, ya que son marcadores de maduración de los sistemas colinérgicos en el cerebro y del sistema circadiano, al permitir los cambios fisiológicos en las células, teniendo efecto en la migración de neuronas, provocando la nicotina cambios ontogénicos en el sistema colinérgico, posiblemente provocando cambios a largo plazo en el NSQ fetal (O'Hara et al., 1999; Abreu-Villaça et al, 2011).

La inducción de expresión de *Per1* se puede generar a través de estimulación fótica o con estimulantes colinérgicos como la nicotina (Ferguson et al, 1999). La estimulación fótica corresponde a una secuencia de eventos sucesivos producidos por la estimulación de la retina, donde esta información se transduce a una señal mediada por glutamato que viaja por el tracto retinohipotalámico, al llegar a las neuronas del NSQ se activan receptores AMPA y NMDA que permiten la entrada de Ca^{2+} (Welsh et al, 2010), mientras que con la presencia de receptores rAChn se obtiene otra vía de entrada de Ca^{2+} a las neuronas del NSQ. La expresión de *Per1* depende del calcio intracelular para activar CREB en el DNA, y así promover la transcripción del gen que es necesario para el control en el asa negativa del reloj molecular (Welsh et al, 2010; Travnickova-Bendova et al, 2002; Ikeda et al, 2003).

Por otro lado, como ya se mencionó, los rAChn son importantes en el desarrollo temprano del sistema nervioso y probablemente del circadiano, específicamente al NSQ. O'Hara y colaboradores han

reportado una aproximación a lo que ocurre en el NSQ desde la etapa embrionaria (embrionario 20 = E20) en ratones, sus estudios previos han dado indicios que durante el desarrollo temprano se presenta una expresión diferencial de los receptores nicotínicos en su maduración, siendo los rAChn $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$, más abundantes en la etapa prenatal disminuyendo su presencia conforme avanza el desarrollo y simultáneamente se observa un aumento en los rAChn $\alpha 7$ en la etapa postnatal, manteniéndose en la etapa madura, sugiriendo que estas subunidades vas cambiando en cantidades durante el desarrollo y se ha reportado que los rAChn $\alpha 7$ son marcadores de desarrollo (O'Hara et al., 1998; O'Hara et al., 1999; Broide et al., 2019) (Fig 6).

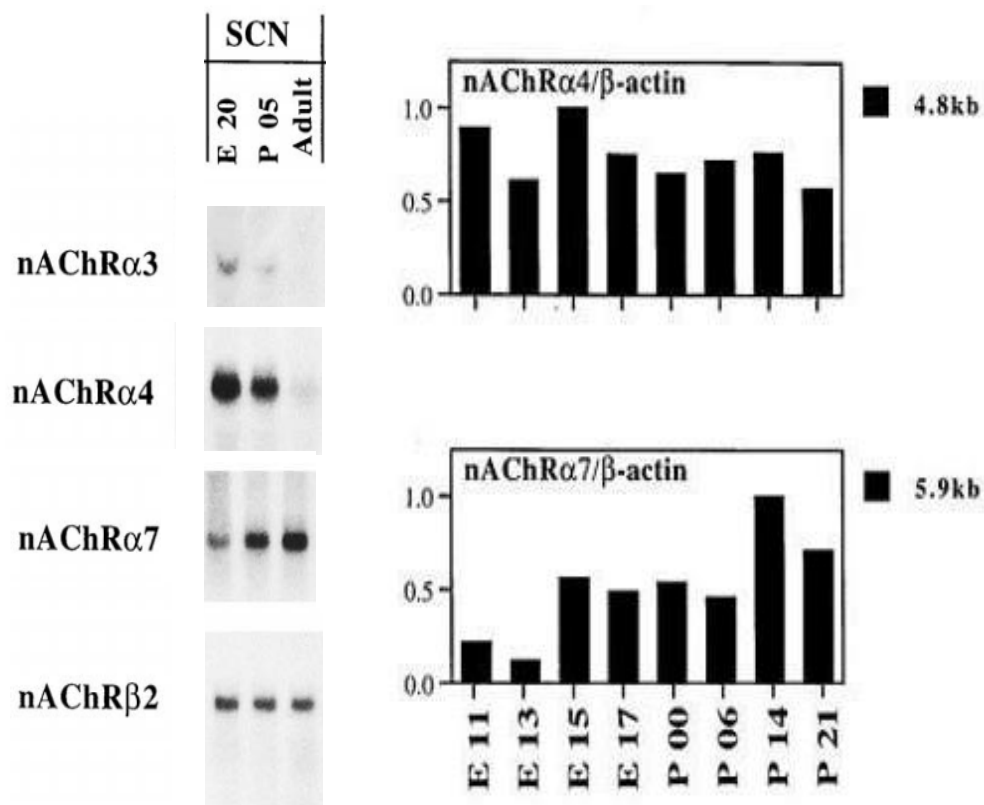


Figura 6. Cambio en la expresión de RNA mensajero de subunidades en receptores nicotínicos el NSQ (SCN en inglés) en diferentes etapas del desarrollo del ratón. Izquierda: bandas obtenidas por Northern blot con 5 μ g de muestra de RNA mensajero Derecha: representación de las mediciones por densitometría dividida entre la carga de RNA E=Embrionario; P= Postnatal, (Tomado de O'Hara *et al*, 1999)

3. Justificación

El desarrollo y arquitectura del SNC durante la gestación requiere de cascadas de señalización de neurotransmisores que actúan a nivel celular. El desarrollo representa una etapa en la que la presencia de sustancias con actividad semejante a los neurotransmisores tiene repercusiones a largo plazo y probablemente definitivas. La nicotina al interactuar con los rAChn del feto en desarrollo, puede sobre estimular estos receptores colinérgicos importantes para la señalización y maduración del NSQ. Diversos estudios evidencian la relación del sistema colinérgico con la señalización, regulación y mantenimiento de los ritmos circadianos mediante los receptores de acetilcolina nicotínicos (Earnest, 1991; Keefe., 1987; Murakami, 1986; Wee, 1992; Zhang, 1993; Hut, 2011).

Anteriormente exploramos los efectos de este modelo de administración perinatal de nicotina sobre el ritmo diario de memoria y aprendizaje, observamos que se altera el perfil diario de memoria reciente con un retraso de fase con respecto al control, así como una atenuación del mismo perfil en la evocación y ejecución de la memoria remota en el ratón (Fuentes-Cano, 2013). Lo anterior sugiere un impacto sobre el reloj maestro circadiano, por lo que nos propusimos evaluar ¿Qué efectos tendrá la exposición a la nicotina durante el desarrollo perinatal sobre el control molecular circadiano del NSQ y la actividad locomotriz circadiana?

4. Hipótesis

Dado que la señalización colinérgica nicotínica influye en el desarrollo del NSQ, entonces la exposición perinatal a la nicotina afectará negativamente los procesos de control circadiano desde el control del reloj molecular en el NSQ hasta la respuesta conductual circadianas de actividad locomotriz.

5. Objetivo general.

- Determinar las alteraciones en el control circadiano, debidas a la exposición a la nicotina durante el desarrollo perinatal en crías de ratón de 30 días, específicamente sobre la expresión del ritmo circadiano de actividad locomotriz y la expresión de proteínas de reloj en el NSQ

6. Objetivos particulares.

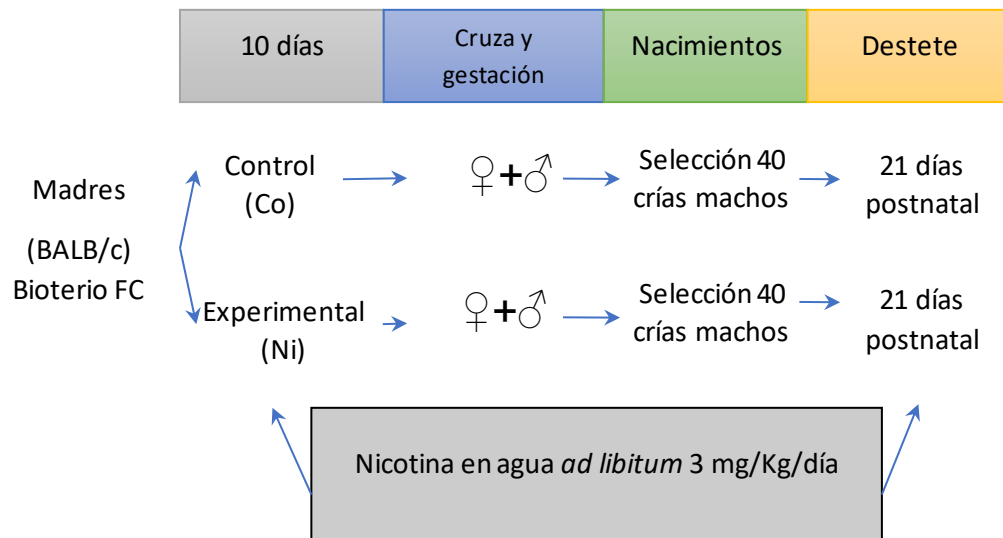
- Establecer en ratones juveniles BALB/c provenientes de madres con exposición perinatal de nicotina:
 1. Las posibles alteraciones en la expresión circadiana endógena y de sincronización de la actividad locomotriz circadiana.
 2. Las posibles modificaciones expresión de proteínas en las asas de retroalimentación positiva (BMAL1) y negativa (PRE1) de los genes reloj en el NSQ.

7. Material y Método

a) Animales y obtención de grupos

Se formaron dos grupos de 5 ratones hembra adultas (BALB/c), uno control y otro al cual se le administró nicotina disuelta en agua suministrada *ad libitum* con una concentración de 3mg/kg/día (Slotkin et al., 1995; Pietilä y Ahtee, 2000). Todos los días se monitoreó el volumen de agua y el peso de las ratonas. La solución de nicotina se suministró siete días previos a la cruce, durante la gestación y hasta el destete de las crías, a fin de lograr una exposición perinatal. Se mantuvieron con dieta Purina Chow, en un fotoperiodo 12:12 h de luz- oscuridad (6:00 h encendido y 18:00 h apagado) y temperatura de 22°C. Una vez destetada la progenie se separó por género y grupo experimental. Se utilizaron machos juveniles de

30 días de nacidos, formando los siguientes grupos: Control (Co) y Nicotina perinatal (Ni) considerando en total n=40 ratones macho juveniles en cada grupo (Esquema 1). Se determino la nicotina y la cotinina (metabolito de la nicotina) en sangre por medio de HPLC en muestra de gota de sangre en varios puntos del desarrollo postnatal para corroborar la exposición en las crías (Anexo 1).



Esquema 1. Resumen del tratamiento de las madres para la obtención de neonatos para la formación de los grupos Co y Ni.

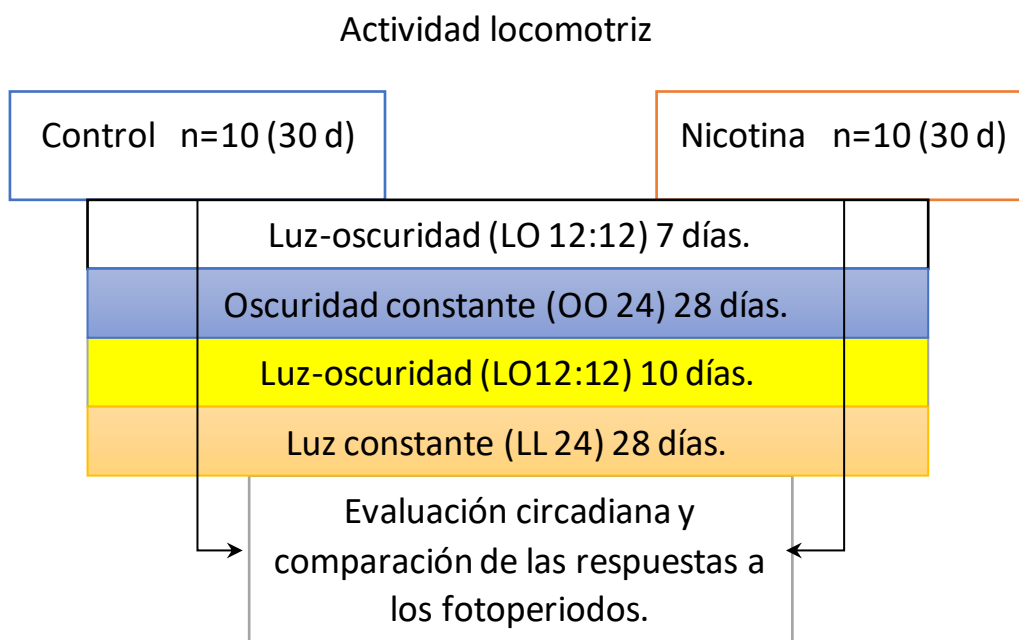
b) Metodología y protocolos

Una vez formados los grupos y cuando los animales cumplieron los 30 días de edad se realizaron los siguientes protocolos:

1.- *Ritmo circadiano de actividad locomotriz en oscuridad constante (O;O), luz-oscuridad (L;O) y luz constante (L;L) , analizando los principales componentes y características en el grupo control y el experimental.*

Se formaron dos grupos, Co y Ni con n=10 c/u de 30 días de edad, los cuales se colocaron en cámaras individuales de acrílico (30x20x15 cm) para registro crónico de actividad locomotriz se utilizó el sistema DACIR (Data Acquisition Circadian Rhythms system) sistema desarrollado por IIMAS (Instituto

de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y en Sistemas) y el Laboratorio de Biología Animal Experimental-FC-UNAM, basado en un sistema de detección de movimiento por sensores infrarrojos ubicados en las paredes laterales, usando un haz de luz infrarroja de 760 nm a la mitad de la caja y la iluminación fue LED luz blanca fría (100 luxes) que carece de generación de luz infrarroja para evitar contaminación en el registro. La actividad locomotora se midió individualmente como el número de interrupciones de cruces de rayos infrarrojos, los eventos se resumieron y almacenaron cada 10 minutos utilizando el sistema de almacenamiento del DACIR con el protocolo de evaluación circadiana con iluminación 7 días L:O 12:12, 28 días en O:O, 10 días en L:O 12:12 y 28 días en L:L (Esquema 2). Para la visualización de los actogramas se utilizó ActiView (ActiView™; Minimitter Co., Sunriver, Oregon, USA) y para los análisis de periodograma y de ritmo se utilizó Chronos-fit (Zuther P. y Lemmer B, 2005)

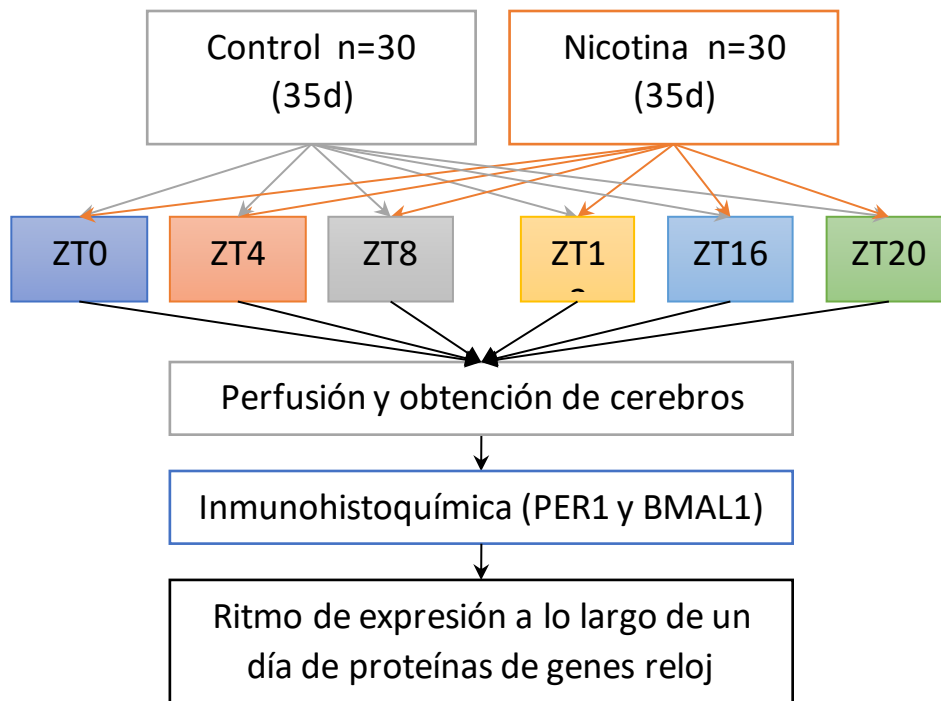


Esquema 2. Protocolo utilizado para la evaluación de ritmicidad endógena y de sincronización.

Para el análisis estadístico del ritmo circadiano, se utilizó el método de COSINOR con el programa de análisis de potencia en el software Chronos-Fit (Zuther et al, 2005) así como su herramienta de periodograma por espectro de potencias.

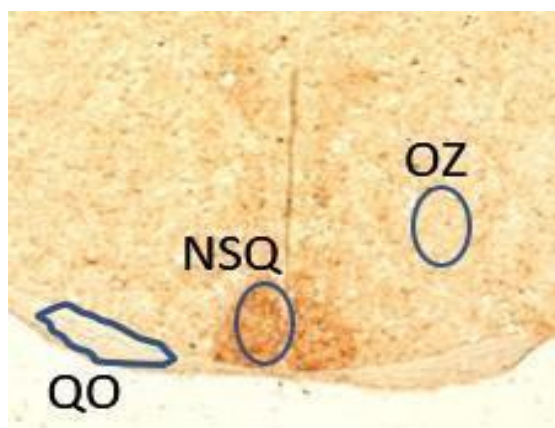
2.- Expresión de proteínas de genes reloj (PER1, BMAL) en el NSQ:

Se formaron 6 grupos de Co y de Ni, con una n=5 c/u, los cuales estuvieron en un ciclo 12:12 h luz - oscuridad con encendido a las 6:00 h a los cuales se sincronizaron, posteriormente fueron asignados a un punto temporal determinado a partir del Zeitgeber (ZT) o sincronizador (encendido de la luz) cubriendo seis puntos temporales (ZT0, ZT4, ZT8, ZT12, ZT16 y ZT20); se sacrificaron a los 35 días de edad y en el ZT correspondiente mediante una sobredosis de pentobarbital sódico y se perfundieron por vía intracardiaca con una solución de paraformaldehído al 4 % amortiguado con fosfatos (PB 0.1 M pH 7.4), se obtuvieron los cerebros y se cortaron en criostato (CM 1520; Leica) a -20°C con grosor de 40µm, se realizaron inmunohistoquímicas (Anexo 2 procedimiento) para las proteínas PER1 (Novus biologicals NB300-564, 1:500) y BMAL1 (Santa Cruz Biotechnology H-170- sc-48790, 1:500) para determinar el ritmo de expresión a lo largo de un día. Las muestras fueron procesadas como en el esquema 3.



Esquema 3. Protocolo para la obtención y procesamiento de muestras por inmunohistoquímica.

La densidad óptica (DO) es una técnica donde se analiza la absorbancia lumínica de las muestras teniendo en cuenta el área a analizar y eliminando el ruido, para este estudio se utilizó la siguiente metodología (Rojas-Castañeda JC et al 2016; Mufson, EJ et al 1997). Se tomaron microfotografías con microscopio ZEISS PrimoStar 3 y cámara ZEISS Axiocam 208 color y software Zen 3 de ZEISS de cada sección de NSQ de las inmunos, posterior a eso se analizaron las zonas por medio de comparación de oscuros en áreas de mil píxeles, una herramienta de análisis del paquete imagej (National Institutes of Health-NIH), para determinar la intensidad de la marca del revelado y restar el ruido de fondo de cada imagen. Para la estadística se utilizó el programa estadístico de GraphPad Prism 6 y su paquete estadístico de ANOVA de dos vías para la comparación de ZT dentro de los grupos (Esquema 3). De la misma manera se realizó un análisis de ritmo con Chronos-fit (Zuther et al, 2005) para determinar la ritmicidad y parámetros del ritmo.



Esquema 4. Ejemplo de determinación de áreas para el análisis semicuantitativo por densidad óptica de microfotografías donde se determina la cantidad de marca a partir de la relación de la zona de interés y se resta el ruido de fondo con áreas donde no presentan reacción por la marcación de la inmuno, adicionalmente se compara en otra zona del cerebro para ver un marcaje mínimo en tejido base. NSQ: Núcleo supraquiasmático; QO: Quiasma óptico; OZ; otra zona

Todos los procedimientos se condujeron con las guías de Ética de la declaración de Helsinki y las guías del Instituto Nacional de Salud, cuidado y uso de animales de laboratorio (NIH no. 8023). Además de los lineamientos requeridos por la SEMARNAT (NOM-062-ZOO), así mismo, el proyecto fue sometido y aprobado por el Comité de Bioética del Instituto Nacional de Pediatría (INV/B/RGC/107/18).

8. Resultados y análisis de datos

El procedimiento de cuantificación de nicotina y cotinina nos permite asegurarnos que la nicotina llegó a las crías, los resultados obtenidos de la cuantificación fueron en nanogramos/mL en los días postnatales 3 (P3), 7(P7), 10(P10), 16(P16) y 35(P35) demostrando la exposición.

Nicotina (P3=0.599±0.2, P7=0.515±0.2, P10=0.428±0.2, P16=0.517±0.1, P35=0.003±0.1)

Cotinina (P3=0.737±0.1, P7=3.973±0.9, P10=1.665±0.7, P16=1.766±0.6, P35=0.001±0.2).

Los actogramas nos permiten observar de forma indirecta el mecanismo endógeno de regulación circadiana en los organismos, en el caso de los ratones Co la actividad principal se presenta en la noche (animales nocturnos) y sus ritmos circadianos en condiciones de O:O y L:L son muy estables según lo esperado. Se muestran los resultados generales de los actogramas del grupo Co y del grupo Ni durante el desarrollo perinatal (Figura 7).

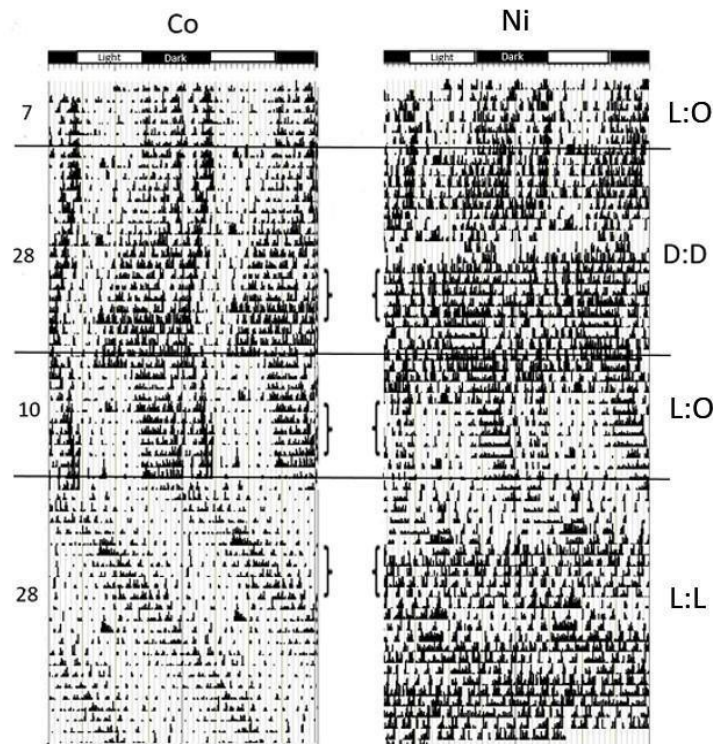


Figura 7. Actograma representativo de una n=10 en diferentes condiciones de iluminación. Izq. Actograma general de grupo control (Co). Der. Actograma general de grupo experimental (Ni) y sus respectivas respuestas locomotoras en las distintas condiciones. corchetes negros indican el momento del análisis por periodograma en *Chronos-fit*. Se usó ActiView (ActiView™; Minimitter Co., Sunriver, Oregon, USA) para visualizar el actograma.

Mientras que en el grupo experimental se manifestaron ritmos de baja amplitud y pérdida de ritmicidad después de varios ciclos de actividad, según los análisis de periodo (Tau) como muestra en la Tabla 1, además de un mayor tiempo para la sincronización a los ciclos LO.

	D:D (tau)	L:L (tau)	Días para arritmia	Días para sincronización
Co n=10	23.50 ± 0.23hrs	25.68±0.21h	----NA	3±1
Ni n=10	Arritmia	Arritmia	23±3 OO/7±2 LL	7±1

Tabla 1. Respuesta general del grupo control y experimental a lo largo de las diferentes condiciones de iluminación.

De manera más específica se analizaron las potencias de los ritmos en cada serie de datos para determinar los ritmos que más se presentan y que tan fuertes son (potencia) en el software *Chronos-Fit* y su herramienta de periodograma (espectro de potencias) teniendo como referencia el ciclo donde el grupo control presenta un ritmo con periodo de actividad locomotriz estable.

Análisis estadístico de los periodogramas por grupo

Para la siguiente sección se utilizaron las potencias que corresponden al componente circadiano (periodos de 20 h a 28 h) con el fin de determinar el impacto de la exposición a la nicotina durante el desarrollo sobre la expresión circadiana de la actividad locomotriz como vía indirecta del control endógeno (Figura 8). En este tipo de análisis utiliza el espectro de potencias (Lomp-Scargle), las cuales nos indican dentro de nuestro grupo el comportamiento y estabilidad de los espectros analizados, en este caso los componentes circadianos. De tal manera que a mayor potencia mayor será la estabilidad y mantenimiento del ritmo de actividad, por lo tanto, una disminución de la potencia indica una falla en el control circadiano.

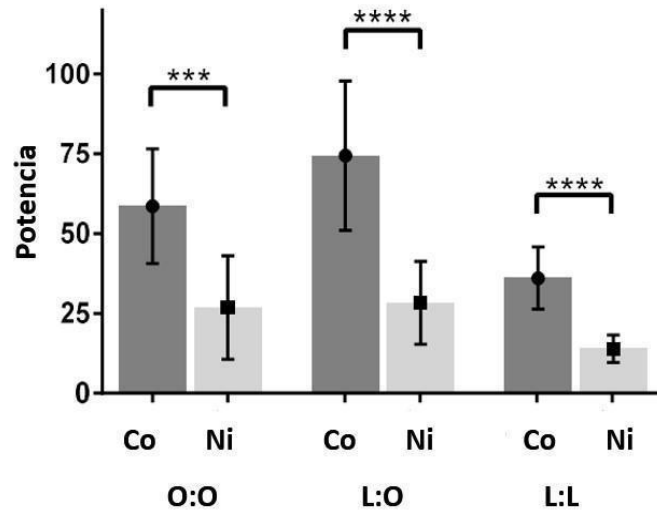


Figura 8. Comparación estadística entre las potencias del componente circadiano obtenidos por periodograma mediante una prueba-t en O:O (Izq), L:O (cen) y L:L (der). Donde asterisco indica diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los grupos (control (Co) vs expuesto (Ni); bigotes son Desviación Estándar; $n = 10$).

Análisis en condición de oscuridad constante (OO).

El análisis estadístico realizado en el componente circadiano de ambos grupos nos indica una diferencia significativa entre ellos, y esto debido a que la potencia del grupo Co es significativamente mayor que la del grupo Ni. Este resultado nos indica que el componente circadiano de la actividad locomotriz del grupo que fue expuesto a la nicotina de forma perinatal redujo la amplitud del ritmo circadiano a comparación del grupo control (Figura 7 izq).

Análisis en condición LO

En la condición LO se presenta una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y el experimental (Figura 7 cen), indicando que el componente circadiano de actividad locomotriz está disminuido en comparación con el grupo control. En el grupo control se presenta la mayor amplitud del componente circadiano, sugiriendo que el ciclo de luz-oscuridad está potenciando este componente reflejando una sincronización al fotoperiodo, mientras que en el grupo experimental se presenta una disminución del componente circadiano, sugiriendo una falla en la capacidad de sincronización.

Análisis en condición de luz constante (LL)

En la condición de LL se presenta una diferencia significativa en el componente circadiano entre el grupo Co y el grupo Ni, presentando el grupo Co una mayor potencia en este componente. A comparación de las demás condiciones la luz constante produce una atenuación en las amplitudes de los ritmos de actividad locomotriz. Sin embargo, se sigue presentando esta diferencia de amplitud entre grupos en el componente circadiano (Figura. 7 der). Con esto, el grupo Co sigue presentando una ritmicidad estable mientras que el Ni se observa una arritmia de actividad en los actogramas, que puede relacionarse con la potencia presentada en esta condición al ser un estrés ambiental la luz constante.

Expresión de Genes reloj en el núcleo supraquiasmático.

Los resultados obtenidos por la inmunohistoquímica a los genes reloj BMAL1 y PER1, fueron analizados a partir de densidad óptica (DO), utilizando microfotografías de las muestras; este análisis se escogió ya que es semicuantitativo y ha sido validado en una gran variedad de protocolos histológicos (Rojas-Castañeda, 2016; Lahm 2010; Varghese 2014; Lerh 1997), incluyendo la estructura de nuestro interés el NSQ. (Figura 9).

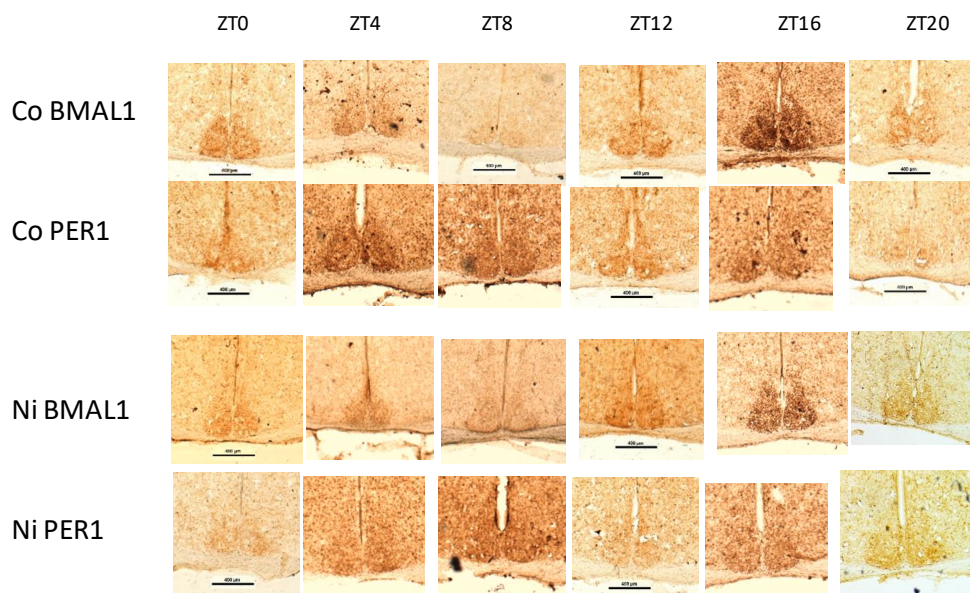


Figura 9. Imágenes representativas obtenidas de la inmunohistoquímica de los anticuerpos teniendo como objetivo el NSQ necesarias para el análisis por densidad óptica. donde en cada fila se presenta la expresión de un gen reloj y que grupo corresponde, cada columna indica la hora en la que se hizo la inmunohistoquímica con su referencia temporal ZT.

Expresión de las proteínas genes reloj en grupo control.

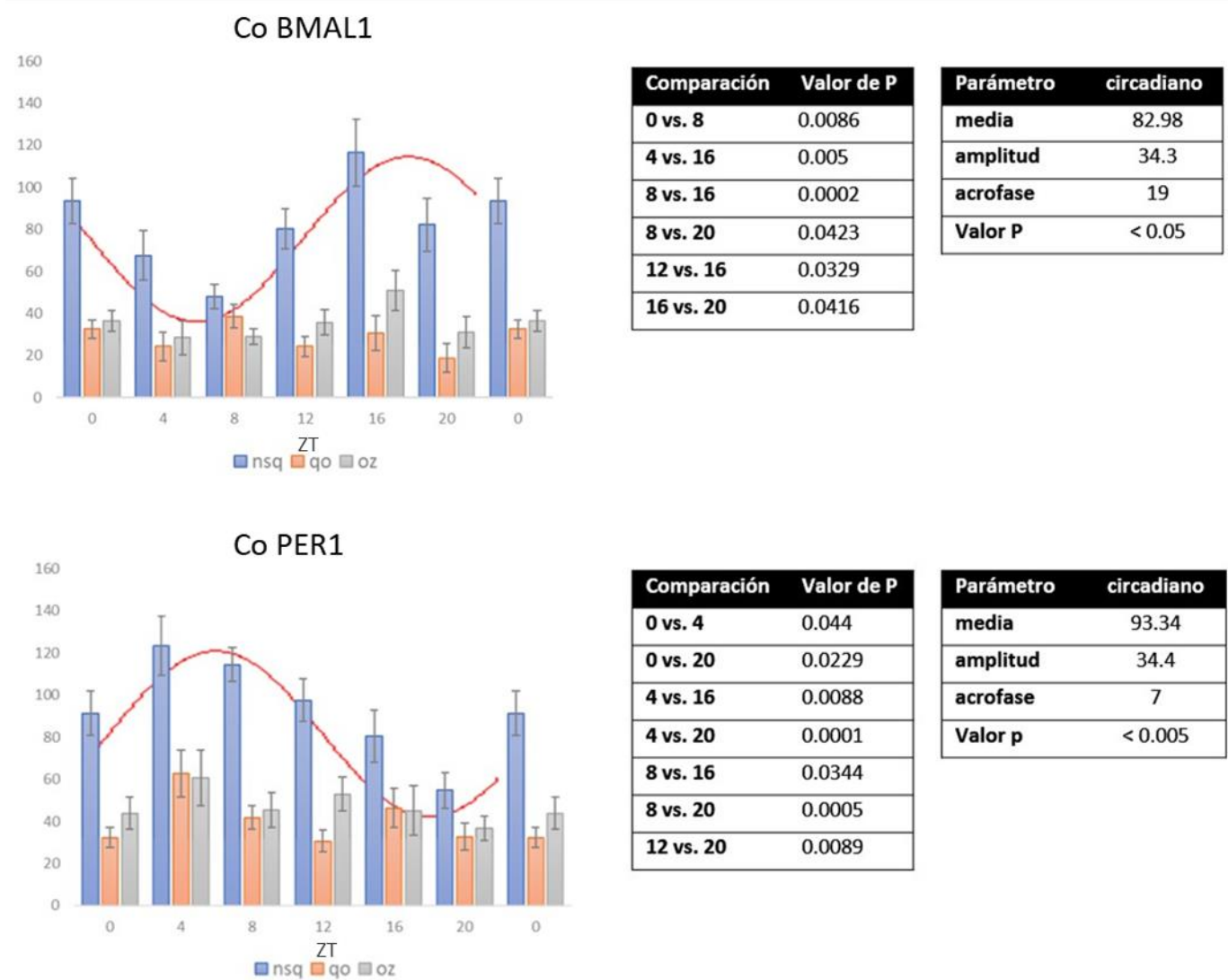


Figura 10. Izquierda. Oscilación de proteínas de genes reloj en grupo Control, en unidades relativas de densidad óptica en diferentes ZT. Nsq =núcleo supraquiasmático; qo= quiasma óptico; oz= otra zona. Derecha. Análisis de ANOVA correspondiente a cada gráfica mostrando la diferencia significativa, así como los datos obtenidos de COSINOR en lo que respecta al análisis de parámetros circadianos indicados a su vez en línea roja de la oscilación ajustada en cada gráfica. Eje X: horas a partir del sincronizador (Zeitgeber); Eje Y: Unidades relativas del análisis por DO.

En el grupo control (Fig 10) la oscilación de la ritmicidad que obtuvimos se asemeja mucho a los reportado por Sládek et al (2012), así como, Girotti et al (2009) en el NSQ, observándose una ritmicidad circadiana para ambas proteínas de genes reloj, siendo consistente con su ritmicidad en antifase, así como la literatura describe en el modelo de retroalimentación negativa en el marcaje de estas dos proteínas reloj.

Expresión de las proteínas genes reloj en grupo nicotina perinatal.

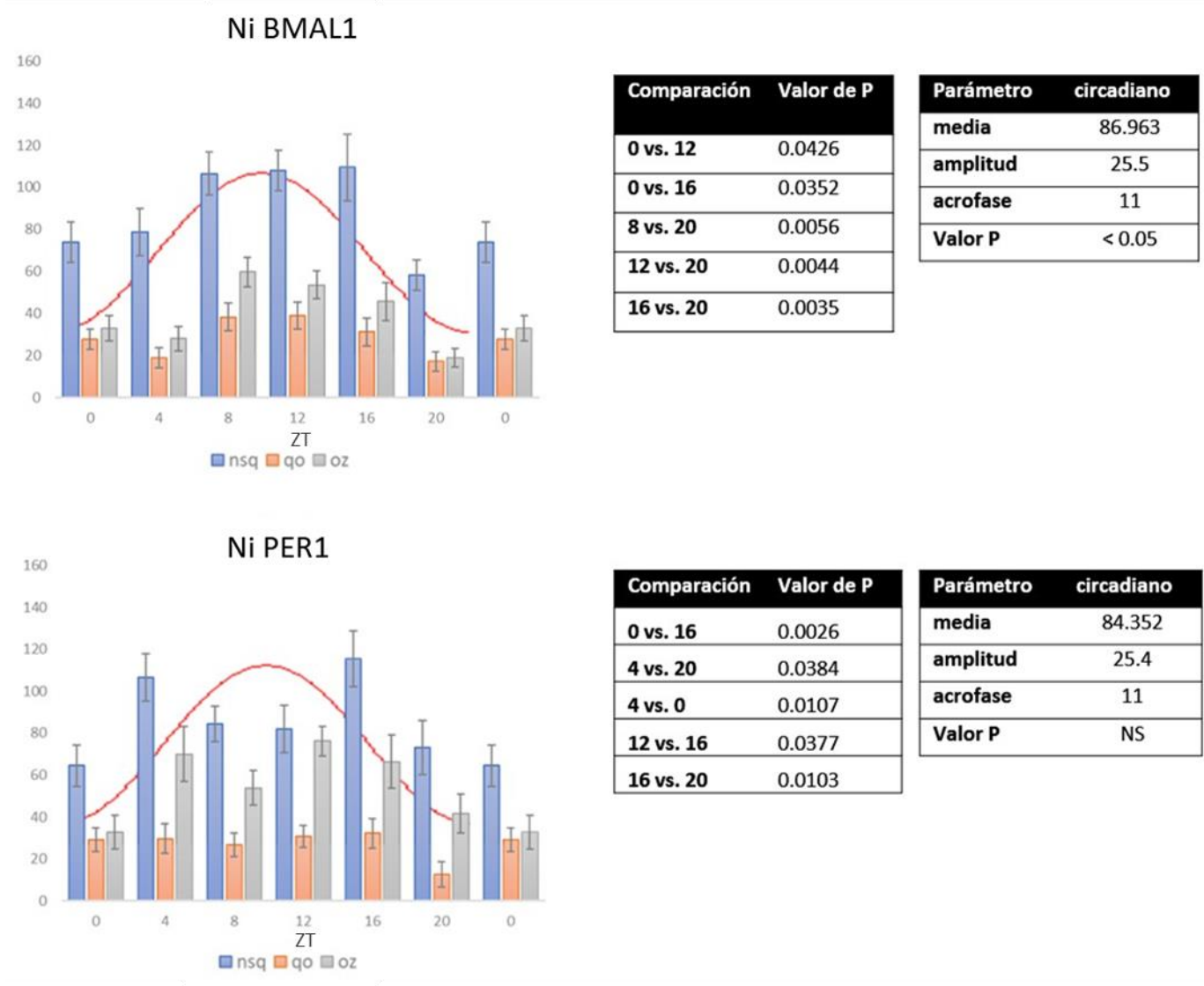


Figura 11 Izquierda. Oscilación de proteínas de genes reloj en grupo nicotina perinatal, en unidades relativas de densidad óptica en diferentes ZT. Nsq =núcleo supraquiasmático; qo= quiasma óptico; oz= otra zona. Derecha. Análisis de ANOVA correspondiente a cada gráfica mostrando la diferencia significativa, así como los datos obtenidos de COSINOR en lo que respecta al análisis de parámetros circadianos indicados a su vez en línea roja de la oscilación ajustada en cada gráfica. E je X: horas a partir del sincronizador (Zeitgeber); Eje Y: Unidades relativas del análisis por DO.

En cambio, el grupo Ni (Figura 11) presentó anomalías en su expresión rítmica circadiana, aunque se presentaron diferencias en la densidad óptica en las dos proteínas, siendo notable que hay un cambio de fase en la oscilación de BMAL1 con un adelanto de 8 horas a comparación con el control, manteniendo una ritmicidad estadísticamente significativa. Por otro lado, PER1 perdió la ritmicidad

circadiana estadística tendiendo a un ritmo desfasado y un cambio en la acrofase (atraso de 4 horas). Estos cambios de en la acrofase de ambos ritmos nos indica un cambio significativo en la función de sincronización y mantenimiento del ritmo endógeno circadiano en el NSQ, repercutiendo en otras respuestas conductuales y fisiológicas.

9. Discusión

Los resultados obtenidos en la actividad locomotriz nos sugiere que la administración de nicotina durante el desarrollo perinatal impactó la maduración del sistema circadiano, afectando de forma negativa la respuesta en diferentes condiciones de iluminación, tanto en las condiciones constantes de luz (L:L) y de oscuridad (O:O), así como para la resincronización (L:O), se observó una disminución en las potencias de los periodos importantes para las respuestas circadianas, lo que nos indica una menor eficiencia en las respuestas circadianas ante las distintas condiciones de iluminación. Esta anomalía en la respuesta nos señala que la capacidad de respuesta circadiana ha perdido consolidación a comparación al control, disminuyendo la capacidad de responder en condiciones constantes de iluminación (O:O y L:L), mientras que en el periodo de luz-oscuridad (L:O) se manifiesta una de las mayores diferencias entre potencias, requiriendo un mayor tiempo para la resincronización en este cambio de condición en el grupo experimental. Este resultado nos apunta a que el grupo experimental puede presentar una respuesta inadecuada ante las condiciones cíclicas del ambiente, sugiriendo que estos individuos requieren un mayor número de ciclos o días para poder sincronizar su ritmo endógeno a los fotoperiodos, indicando una disminución en la eficiencia del sistema circadiano.

Otra diferencia observada en el grupo expuesto a nicotina es la pérdida de ritmicidad circadiana en la actividad locomotriz, esta pérdida de ritmicidad se puede observar en las condiciones constantes, oscuridad constante (O:O con 23 ± 3 días) o luz constante (L:L de 7 ± 2 días) respectivamente, mientras que el grupo control presenta ritmos claros y robustos en ambas condiciones; por otro lado, en la resincronización, el grupo experimental presenta dificultad para sincronizarse en los 10 días de L:O en comparación al grupo control.

Con respecto a la regulación de la maquinaria de los genes reloj, la cual es fundamental para la correcta ejecución de procesos fisiológicos, metabólicos y conductuales, los datos encontrados en la ritmicidad de PER1 y BMAL1 a través de la IHQ sugieren una desregulación de ambas asas de retroalimentación, evidenciado por una expresión prácticamente constante de PER1 en el grupo Ni en comparación con el

grupo Co; mientras que BMAL1 presenta un desfase de 8 h. Estos resultados sugieren una alteración en el desarrollo de la maquinaria circadiana, provocada por la nicotina al interactuar con los rAChn en la señalización colinérgica durante el desarrollo perinatal, teniendo efectos negativos en el control circadiano a largo plazo. El actograma nos proporciona una respuesta indirecta de la integridad funcional del NSQ, estas respuestas del grupo experimental nos indican que el impacto pudo darse en los mecanismos de control neuronal del NSQ que interfieren en la expresión de un ritmo consolidado en las vías de salida, manifestándose en anomalías en esta respuesta de actividad locomotriz de los individuos expuestos.

A partir de estos resultados podemos indagar en varios factores o mecanismos que puedan dilucidar lo que ocurre por la exposición a la nicotina durante el desarrollo, la más plausible es que estas anomalías pueden ser provocadas por la falta de control en el flujo iónico, está ampliamente reportado el papel del sistema colinérgico en la regulación y sincronización intrínseca del NSQ para la generación de disparos neuronales permitiendo la sincronización (Yang JJ, et al 2010), en particular por la interacción de diferentes iones que permiten la despolarización y el incremento de Ca^{2+} intracelular para la expresión de genes (Harvey JRM, et al 2020). Siendo el Ca^{2+} fundamental para el control de comunicación celular y por segundos mensajeros, pudiera ser atribuido la desregulación a este ion en parte a los rAChn. Como se mencionó en los antecedentes, se ha demostrado que el Ca^{2+} intracelular es indispensable para la expresión de proteínas, en especial para proteínas del gen reloj *Per1*, que dependen del calcio intracelular para activar CREB y su acoplamiento a CREs en el DNA, y así promover la transcripción del gen que es necesario para el control en el asa negativa del reloj molecular (Welsh *et al*, 2010; Travnickova-Bendova *et al*, 2002; Ikeda *et al*, 2003). La expresión de PER1 es fundamental para una respuesta rápida ya que es la proteína dentro de la familia PER que incrementa su concentración más rápido después de un estímulo luminoso, es por esta característica que se apuntan a que esta proteína es responsable de la sincronización entre células del núcleo supraquiasmático y de resetear el reloj molecular (Yan I, et al, 1999; Shigeyoshi Y, et al 1997). Los receptores nicotínicos por excelencia que

regulan la entrada de Ca^{2+} son los homopentaméricos $\alpha 7$, los cuales tienen un papel importante en diversas funciones en el adulto como memoria, aprendizaje, atención y evocación de memoria a largo plazo (Thomsen MS, et al 2010), pueden estar siendo modificados por la sobre estimulación de receptores nicotínicos en el desarrollo de forma indirecta, al ser los últimos en expresarse en el sistema nervioso y siendo regulado por periodos críticos de los demás receptores nicotínicos que los precedieron, es posible que la desregulación circadiana que encontramos en este modelo se deba a los receptores $\alpha 7$.

Una posibilidad es que en el juvenil se encuentre una sobreexpresión de rAChn $\alpha 7$, lo cual provocaría que la respuesta del NSQ se dé con un menor estímulo a comparación del control ante la gran variedad de estímulos que provocan respuesta del sistema colinérgico. También se sabe que rAChn $\alpha 7$ estimulan el acoplamiento entre las células del NSQ, siendo así que la alta sensibilidad a los estímulos colinérgicos puede evitar que sincronicen las neuronas apropiadamente y dar la expresión del ritmo circadiano apropiadamente, provocando que, ante la exposición a un ambiente constante, los núcleos no puedan acoplarse y esto provocaría las arritmias encontradas en este trabajo (Fuchs J, y Hoppens K; 1987).

Por otro lado, hay reportes que se han realizado con roedores expuestos a la nicotina durante el desarrollo, que encuentran que estructuras del SNC presentan modificaciones en su morfología, provocando a largo plazo una incorrecta respuesta de los sustratos neuronales ante los estímulos, por lo que la exposición a la nicotina perinatal también podría estar afectando la organización morfológica del NSQ y su respuesta a los cambios de condiciones lumínicas (Slotkin; 2004).

Estos resultados nos indican que la estimulación colinérgica nicotínica exógena producida por la nicotina durante el desarrollo perinatal tiene efectos a largo plazo en las respuestas circadianas de los individuos, afectando su respuesta a los cambios en las condiciones de luz-oscuridad, lo cual en la actualidad es un reto constante para las poblaciones que están expuestas a los cambios inherentes de una vida en

sociedad, estos individuos pueden presentar un deterioro más acelerado que los que no fueron expuestos, que pueden abarcar una gran cantidad de aspectos, desde sus respuestas fisiológicas y metabólicas circadianas hasta enfermedades crónicas a largo plazo que merman el desempeño y calidad de vida.

En este trabajo, encontramos que la exposición a la nicotina durante el desarrollo perinatal tiene efectos en la conducta rítmica circadiana endógena, así como en la expresión de los ritmos circadianos a lo largo de la vida postnatal. Esto sugiere, en particular en el rol que juega el sistema colinérgico y la importancia de su participación en los mecanismos de respuesta para el desarrollo y maduración temprana del SNC, incluyendo la respuesta del NSQ, repercutiendo a corto y largo plazo. Afectando de forma significativa la estabilidad del ritmo endógeno y por consecuencia todos los procesos que tienen una ritmicidad circadiana, ya sean fisiológicos, metabólicos o conductuales. También es importante destacar que, aunque la exposición a la nicotina de 3 mg/kg/día se considera baja, fue suficiente para provocar alteraciones en la respuesta de control circadiana tanto celular como conductual, lo cual es una afectación que se puede llevar el resto de la vida de los animales expuestos, con esta base será fundamental estudiar la función de los receptores nicotínicos en NSQ de adultos expuestos, así como su papel en la regulación del calcio intracelular y su comunicación intrínseca celular.

10. Conclusión

La exposición de nicotina durante los períodos críticos del desarrollo del sistema colinérgico en el ratón provoca alteraciones en la expresión de proteínas de genes reloj, alterando su ritmicidad circadiana y por consecuencia la respuesta conductual del ritmo de actividad locomotora. Finalmente, con este estudio se demuestra que una exposición perinatal considerada baja de nicotina puede repercutir en la regulación endógena del NSQ a corto y largo plazo. Con este precedente se abren nuevas preguntas para explicar que ocurre con la regulación molecular del NSQ, como está conformada la comunicación

neuronal y entre subdivisiones del NSQ, así como las alteraciones neurodegenerativas que se pueden desarrollar a lo largo de la vida de estos individuos.

11. Referencias

1. Abreu-Villaça Y, Figueiras CC, Manhães AC (2011) Developmental aspects of the cholinergic system. *Behav Brain Res* 221(2):367-378
2. Aguilar-Roblero R, Guadarrama P, Mercado C, Chávez JL. (2004) El núcleo supraquiasmático y la glándula pineal en la regulación de los ritmos circadianos en roedores. TEMAS SELECTOS DE NEUROCIENCIAS III ED. JAVIER VELÁZQUEZ MOCTEZUMA UAM, 2004
3. Ajarem JS, Ahmad M. (1998) Prenatal nicotine exposure modifies behavior of mice through early development *Pharmacol Biochem Behav.* 59(2):313-8.
4. Allen TG, Brown DA. (1996) Detection and modulation of acetylcholine release from neurites of rat basal forebrain cells in culture. *The Journal of Physiology* 492 (2): 453–466.
5. Antonov I, Chang S, Zakharenko S. (1999) Distribution of neurotransmitter secretion in growing axons. *Neuroscience* 90:975–84.
6. Atluri P, Fleck MW, Shen Q, Mah SJ, Stadfeldt D, Barnes W, Goderie SK, Temple S, Schneider AS. (2001). Functional nicotinic acetylcholine receptor expression in stem and progenitor cells of the early embryonic mouse cerebral cortex. *Dev Biol* 240:143–56
7. Benowitz N.L., Hukkanen J., and Jacob P., (2009) "Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers," *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 192, pp. 29–60.
8. Berkeley JL, Gomeza J, Wess J, Hamilton SE, Nathanson NM, Levey AI. (2001) M1 muscarinic acetylcholine receptors activate extracellular signal-regulated kinase in CA1 pyramidal neurons in mouse hippocampal slices. *Mol Cell Neurosci* 18:512–24.
9. Bhide PG (2009) Dopamine, cocaine and the development of cerebral cortical cytoarchitecture: a review of current concepts. *Semin Cell Dev Biol* 20(4):395–402
10. Biello SM, Golombek DA, Harrington ME (1997) Neuropeptide Y and glutamate block each other's phase shifts in the suprachiasmatic nucleus in vitro *Neuroscience* 77 (4), 1049-1057
11. Blood-Siegfried J., Rende E. (2010) The Long-Term Effects of Perinatal Nicotine Exposure on Neurologic Development *J Midwifery Womens Health.* 55(2): 143–152.
12. Broide RS, Leslie FM. (1999) The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in neuronal plasticity. *Mol Neurobiol* 20:1–16.
13. Broide RS, Winzer-Serhan UH, Chen Y and Leslie FM (2019) Distribution of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit mRNA in the Developing Mouse. *Front. Neuroanat.* 13:76. doi: 10.3389/fnana.2019.00076
14. Bruel-Jungerman E, Lucassen P, Francis F. (2011) Cholinergic influences on cortical development and adult neurogenesis. *Behavioural Brain Research* 221 379–388
15. Clancy, B., Kersh, B., Hyde, J., Darlington R.B., Anand, K.J. y Finlay, B.L. (2007) Web-Based method for translating neurodevelopment from laboratory species to human. *Neuroinformatics* Vol. 5(1): 79-94
16. Cuello AC, Maysinger D, Garofalo L. (1993) Trophic factor effects on cholinergic innervation in the cerebral cortex of the adult rat brain. *Molecular Neurobiology* 92-6(4): 451-461.
17. Dajas-Bailador F, Wonnacott S. (2004) Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci* 25:317–24
18. Darlington R.B., Clancy B., Finlay B.L. y Anand K.J. (2007) Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology* Vol. 28(5). 931-937.
19. Dobbing J (1990) Early nutrition and later achievement. *Proceedings of the Nutrition Society* 49(2):103-118
20. Dobbing, J. (1968) Effects of experimental undernutrition on development of the nervous system. *Malnutrition, Learning and Behavior-* Boston: M.I.T. Press: 181-202
21. Dolatshad, H., Cary, A. J., & Davis, F. C. (2010). Differential expression of the circadian clock in maternal and embryonic tissues of mice. *PLoS one*, 5(3), e9855.

22. Dunlap J.C., Loros, J.J. y DeCoursey P.J. (2004) *Chronobiology, Biological Timekeeping*. Sinauer Associates: pp 382.
23. Durán P, Miranda–Anaya M, Romero M, Mondragon-Soto K, Cintra L (2011) Time-place learning is altered by perinatal low-protein malnutrition in adult rat. *Nutritional Neuroscience* 14(4):145-150
24. Dwyer JB, McQuown SC, Leslie FM (2009) The Dynamic Effects of Nicotine on the Developing Brain. *Pharmacol Ther* 122(2):125-139
25. Earnest DJ, Digiorgio SM, Sladek CD (1991) Effects of tetrodotoxin on the circadian pacemaker mechanism in suprachiasmatic explants in vitro. *Brain Res Bull* 26(5):677–82
26. Eiden LE. (1998) The cholinergic gene locus. *J Neurochem* 70:2227–40.
27. Ferguson SA, Kennaway DJ, Moyer RW (1999) Nicotine phase shifts the 6-sulphatoxymelatonin rhythm and induces c-Fos in the SCN of rats. *Brain Res Bull* 48(5):527-38.
28. Finlay BL and Darlington RB (1995) Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science* 268 (5217):1578-1584
29. Fragkouli A, Stamatakis A, Zographos E, Pachnis V, Stylianopoulou F. (2006) Sexually dimorphic effects of the Lhx7 null mutation on forebrain cholinergic function. *Neuroscience* 137(4):1153-64
30. Fuchs JL., Hoppens KS., (1987) α -Bungarotoxin binding in relation to functional organization of the rat suprachiasmatic nucleus, *Brain Research*, Volume 407, Issue 1, Pages 9-16, ISSN 0006-8993,
31. Fuentes-Cano M. (2013) Alteraciones producidas por la administración perinatal de nicotina sobre los procesos de memoria y aprendizaje espacial. Tesis Facultad de Ciencias- UNAM
32. Girotti M, Weinberg MS, Spencer RL. (2009) Diurnal expression of functional and clock-related genes throughout the rat HPA axis: system-wide shifts in response to a restricted feeding schedule. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Apr;296(4): E888-97.
33. Harvey JRM, Plante AE, Meredith AL. (2020) Ion Channels Controlling Circadian Rhythms in Suprachiasmatic Nucleus Excitability. *Physiol Rev.* Oct 1;100(4):1415-1454
34. Herlenius E, Lagercrantz H. (2004) Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Exp Neurol.* Nov;190 Suppl 1:S8-21.
35. Herzog ED (2007) Neurons and networks in daily rhythms. *Nat Rev Neurosci* 10: 790–802
36. Huang A, Noga BR, Carr PA, Fedirchuk B, Jordan LM. (2000) Spinal cholinergic neurons activated during locomotion: localization and electrophysiological characterization. *J Neurophysiol* ;83:3537–47
37. Huang LZ, Abbott LC, Winzer-Serhan UH. (2007) Effects of chronic neonatal nicotine exposure on nicotinic acetylcholine receptor binding, cell death and morphology in hippocampus and cerebellum. *Neuroscience* Vol. 146(4); 1854-1868.
38. Hume RI, Role LW, Fischbach GD. (1983) Acetylcholine release from growth cones detected with pages of acetylcholine receptor-rich membranes. *Nature* 305:632–4
39. Hut RA (2011) The cholinergic system, circadian rhythmicity and time memory. *Behav Brain Res* 221(2): 466-480
40. Ikeda M, Sugiyama T, Wallace CS, Gompf HS, Yoshioka T, Miyawaki A, Allen CN (2003) Circadian Dynamics of Cytosolic and Nuclear Ca²⁺ in Single suprachiasmatic nucleus neurons. *Neuron* 38(2):253-263
41. Kater SB, Mills LR. (1991) Regulation of growth cone behavior by calcium. *J Neurosci.* 11: 891-899
42. Keefe DL, Earnest DJ, Nelson D, Takahashi JS, Turek FW (1987) A cholinergic antagonist, mecamylamine, blocks the phase-shifting effects of light on the circadian rhythm of locomotor activity in the golden hamster. *Brain Res* 403(2):308–12
43. Kennaway DJ, (2002) Programming of the fetal suprachiasmatic nucleus and subsequent adult rhythmicity, *Trends in Endocrinology & Metabolism*, Volume 13, Issue 9, , Pages 398-402, ISSN 1043-2760.
44. Klein DC, Moore RY, Reppert SM (1991) *Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock*. Oxford: Oxford university press 1–467
45. Kramer, A. (2009). *Peripheral Oscillator*. In: Binder, M.D., Hirokawa, N., Windhorst, U. (eds) *Encyclopedia of Neuroscience*. Springer, Berlin, Heidelberg.

46. Lefta M (2011) Circadian Rhythms, the Molecular Clock, and Skeletal Muscle. *Curr Top Dev Biol* 96:231 - 271
47. Logan, R.W., McClung, C.A. (2019) Rhythms of life: circadian disruption and brain disorders across the lifespan. *Nat Rev Neurosci* 20, 49–65.
48. Madziar B, Shah S, Brock M, Burke R, Lopez-Coviella I, Nickel AC, Cakal EB, Blusztajn JK, Berse B. (2008) Nerve growth factor regulates the expression of the cholinergic locus and the high affinity choline transporter via the Akt/PKB signaling pathway. *J Neurochem*;107:1284–93
49. Mao C, Lv J, Li H, Chen Y, Wu J, Xu Z. (2007) Development of fetal nicotine and muscarinic receptors in utero *Braz J Med Biol Res.* 40(5):735-41
50. Mendoza J, Challet E (2009) Brain clocks: from the suprachiasmatic nuclei to a cerebral network. *Neuroscientist* 15: 477–88
51. Moore RY (1983) Organization and function of a central nervous system circadian oscillator: the suprachiasmatic hypothalamic nucleus. *Fed Proc.* Aug;42(11):2783-9.
52. Morgane P.J., Mokier D.J. y Galler J.R. (2002) Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. *Neuroscience and Biobehavioral Vol.* 26(4): 471-483.
53. Morgane PJ, Austin-LaFrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Díaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Galler JR (1993) Prenatal Malnutrition and Development of the Brain. *Neurosci biobe Rev* 17(1): 91-128
54. Mori T, Yuxing Z, Takaki H, Takeuchi M, Iseki K, Hagino S, Kitanaka J, Takemura M, Misawa H, Ikawa M, Okabe M, Wanaka A. (2004) The LIM homeobox gene, L3/Lhx8, is necessary for proper development of basal forebrain cholinergic neurons. *Eur. J. Neurosci.* 19(12):3129-41
55. Morin L.P., Allen C.N. (2005), The circadian visual system, *Brain Research Reviews*, Volume 51, Issue 1, Pages 1-60, ISSN 0165-0173.
56. Mufson EJ., Lavine N, Jaffar S. Kordower JH, Quirion R, Saragovi HU, (1997) Reduction in p140-TrkA Receptor Protein within the Nucleus Basalis and Cortex in Alzheimer's Disease, *Experimental Neurology*, Volume 146, Issue 1, Pages 91-103, ISSN 0014-4886,
57. Murakami N, Furukawa T, Yokawa T, Etoh T. Takahashi K (1986) Effects of continuous supply of light or carbachol to the SCN on the rat free-running rhythm. *Jpn J Physiol* 36(2): 411–6
58. Navarro HA, Mills E, Seidler FJ, Baker FE, Lappi SE, Tayyeb MI, Spencer JR, Slotkin TA (1990) Prenatal nicotine exposure impairs beta-adrenergic function: persistent chronotropic subsensitivity despite recovery from deficits in receptor binding. *Brain Res Bull* 25:233-237
59. Ninomiya, Y., Kayama, Y., Koyama, Y. (2005) Postnatal development of cholinergic neurons in the mesopontine tegmentum revealed by histochemistry *International Journal of Developmental Neuroscience*, Volume 23, Issue 8, December
60. Ninomiya, Y., Koyama, Y., Kayama, Y. (2001) Postnatal development of choline acetyltransferase activity in the rat laterodorsal tegmental nucleus *Neuroscience Letters*, Volume 308, Issue 2, 3 August
61. O'Hara BF, Edgar DM, Cao VH, Wiler SW, Heller HC, Kilduff TS. and Miller J.D (1998) Nicotine and Nicotinic Receptor in the Circadian System. *Psychoneuroendocrinology* 23(2):161-173
62. O'Hara BF, Macdonald E, Clegg D, Wiler SW, Andretic R, Cao VH, Miller JD, Heller HC, Kilduff TS. (1999) Developmental changes in nicotinic receptor mRNAs and responses to nicotine in the suprachiasmatic nucleus and other brain regions. *Brain Res Mol Brain Res.* 20;66(1-2):71-82.
63. Ohdo S (2010) Chronopharmacological strategies: Intra- and inter- individual variability of molecular clock. *Adv Drug Deliv Rev* 62 (9-10):885-897
64. Pelissier A.L, Gantenbein M. and Bruguerolle B. (1998), Nicotine-induced Perturbations on Heart Rate, Body Temperature and Locomotor Activity Daily Rhythms in Rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50: 929-934
65. Pietilä K, Ahtee L (2000) Chronic nicotine administration in the drinking water affects the striatal dopamine in mice. *Pharmacol Biochem Beha* 66(1):95-103
66. Prosser RA., Macdonald ES., Heller HC, (1994) c-fos mRNA in the suprachiasmatic nuclei in vitro shows a circadian rhythm and responds to a serotonergic agonist, *Molecular Brain Research*, Volume 25, Issues 1–

- 2, Pages 151-156, ISSN 0169-328X, [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(94\)90292-5](https://doi.org/10.1016/0169-328X(94)90292-5).
67. Resende RR, Alves AS, Britto LR, Ulrich H. (2008) Role of acetylcholine receptors in proliferation and differentiation of P19 embryonal carcinoma cells. *Exp Cell Res* 314:1429–43
 68. Rodier PM (1980) Chronology of Neuron Development: Animal Studies and their Clinical Implications
 69. Rodier PM (1994) Vulnerable periods and processes during central nervous system development. *Environ Health Perspect* 102(2): 121-124
 70. Rojas-Castañeda J.C., Viguera-Villaseñor R.M., Chávez-Saldaña (2016) “Neonatal exposure to monosodium glutamate induces morphological alterations in suprachiasmatic nucleus of adult rat,” *International Journal of Experimental Pathology*, vol. 97, no. 1, pp. 18–26, 2016.
 71. Rossner S, Kues W, Witzemann V, Schliebs R. (1993) Lamina expression of m1-, m3- and m4-muscarinic cholinergic receptor genes in the developing rat visual cortex using in situ hybridization histochemistry. Effect of monocular visual deprivation. *Int J Dev Neurosci* 11:369–78.
 72. Rüdiger T, Bolz J. (2008) Acetylcholine influences growth cone motility and morphology of developing thalamic axons. *Cell Adhes Migr* 2(1):30–7.
 73. Schambra, U.B., Sulik, K.K., Petrusz, P. and Lauder, J.M. (1989), Ontogeny of cholinergic neurons in the mouse forebrain. *J. Comp. Neurol.*, 288: 101-122.
 74. Semba, K. and Fibiger, H.C. (1988), Time of origin of cholinergic neurons in the rat basal forebrain. *J. Comp. Neurol.*, 269: 87-95.
 75. Serón-Ferré M., Torres-Farfán C., Forcelledo M.L y Valenzuela G.J. (2001) The development of Circadian Rhythms in the Fetus and Neonate. *Seminars in Perinatology* Vol. 25 (6): pp 363-370.
 76. Shacka JJ, Robinson SE. (1998) Postnatal developmental regulation of neuronal nicotinic receptor subunit alpha 7 and multiple alpha 4 and beta 2 mRNA species in the rat. *Brain Res Dev Brain Res.* 109(1):67-75.
 77. Shigeyoshi Y, Taguchi K, Yamamoto S, et al. (1997) Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell.*;91(7):1043-1053. doi:10.1016/s0092-8674(00)80494-8
 78. Sládek M, Polidarová L, Nováková M, Parkanová D, Sumová A. (2012) Early chronotype and tissue-specific alterations of circadian clock function in spontaneously hypertensive rats. *PLoS One.*;7(10): e46951.
 79. Slotkin T. (2004) Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004 198(2):132-51.
 80. Slotkin TA, Lappi SE, McCook EC, Lorber BA y Seidler FJ. (1995) Loss of neonatal hypoxia tolerance after prenatal nicotine exposure: implications for sudden infant death syndrome. *Brain Research Bulletin* 38(I): 69-75.
 81. Taly, A., Corringer, P.J., Guedin, D. et al. (2009). Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 8, 733–750
 82. Tatsumi H, Tsuji S, Anglade P, Motelica-Heino I, Soeda H, Katayama Y. (1995) Synthesis, storage and release of acetylcholine at and from growth cones of rat central cholinergic neurons in culture. *Neurosci Lett.* 1995 202(1-2):25-8.
 83. Thomsen MS, Hansen HH, Timmerman DB, Mikkelsen JD. (2010) Cognitive improvement by activation of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors: from animal models to human pathophysiology. *Curr Pharm Des.*;16(3):323-343. doi:10.2174/138161210790170094
 84. Travnickova-Bendova Z, Cermakian N, Reppert SM, Sassone-Corsi P (2002) Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(11):7728-7733
 85. Tribollet E, Bertrand D, Marguerat A, Raggenbass M. (2004) Comparative distribution of nicotinic receptor subtypes during development, adulthood and aging: an autoradiographic study in the rat brain. *Neuroscience* 124:405–20.
 86. Waterhouse JM, Minors DS, Akerstedt T, Reilly T, Atkinson G. (2000) Rhythms of human performance. In: Takahashi JS, Turek FW, Moore RY. (eds.) *Handbook of behavioral neurobiology. Circadian clocks* 12:571– 94

87. Wee BE, Anderson KD, Kouchis NS, Turek FW (1992) Administration of carbachol into the lateral ventricle and suprachiasmatic nucleus (SCN) produces dose-dependent phase shifts in the circadian rhythm of locomotor activity. *Neurosci Lett.* 137(2):211–5
88. Weihe E, Schäfer MK, Schütz B, Anlauf M, Depboylu C, Brett C, Chen L, Eiden LE. (1998) From the cholinergic gene locus to the cholinergic neuron. *J Physiol Paris.* 92(5-6):385-8.
89. Welsh DK, Takahashi JS, Kay SA (2010) Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu Rev Physiol* 72:551-577
90. Wickstrom R (2007) Effects of Nicotine during pregnancy: Human and experimental Evidence. *Curr Neuropharmacol* 5(3):213-222
91. Yamazaki Shin, Straume Marty, Hajime Tei, Yoshiyuki Sakaki, Menaker Michael, Gene D. (2002) Effects of aging on central and peripheral mammalian clocks Block Proceedings of the National Academy of Sciences Aug 2002, 99 (16)
92. Yan L., Takekida S., Shigeyoshi Y., Okamura H., (1999) Per1 and Per2 gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus: circadian profile and the compartment-specific response to light, *Neuroscience*, Volume 94, Issue 1, Pages 141-150, ISSN 0306-4522.
93. Yang JJ, Wang YT, Cheng PC, Kuo YJ, Huang RC. (2010) Cholinergic modulation of neuronal excitability in the rat suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol.* 2010 Mar;103(3):1397-409. doi: 10.1152/jn.00877.2009. Epub Jan 13. PMID: 20071625.
94. Zakharenko S, Chang S, O'Donoghue M, Popov SV. (1999) Neurotransmitter secretion along growing nerve processes: comparison with synaptic vesicle exocytosis. *J Cell Biol.* 144(3): 507–518.
95. Zhang Y, Zee PC, Kirby JD., Takahashi JS. and Turek FW (1993) A cholinergic antagonist, mecamylamine, blocks light-induced fos immunoreactivity in specific regions of the hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 615 (1):107–12
96. Zhao Y, Marín O, Hermes E, Powell A, Flames N, Palkovits M, Rubenstein JL, Westphal H. (2003) The LIM-homeobox gene *Lhx8* is required for the development of many cholinergic neurons in the mouse forebrain *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(15):9005-10.
97. Zoli M, Le Novère N, Hill JA Jr, Changeux JP. (1995) Developmental regulation of nicotinic ACh receptor subunit mRNAs in the rat central and peripheral nervous systems. *J Neurosci.* 15 (3 Pt 1):1912-39.
98. Zuther P, Lemmer B (2005) Chronos-Fit 1.05 <http://www.ma.uni-heidelberg.de/inst/phar/lehre/chrono.html>

Anexo 1

Cuantificación de nicotina y cotinina en sangre.

La se realizó la detección de nicotina y de cotinina, que es el principal metabolito de la nicotina con una vida media más larga aproximadamente 20 h) que la nicotina (20-60 min) (Benowitz LD, et al 2009). Se recolectó una gota de sangre periférica de cada animal en tarjetas de papel de filtro Whatman 903® (GE Healthcare Bio-Sciences Corp; Piscataway, NJ, USA). Cada tarjeta se secó horizontalmente durante 6 h a temperatura ambiente ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$). Una vez secas, las tarjetas fueron debidamente etiquetadas y almacenadas en un material secante empacado en bolsas plásticas de baja permeabilidad a los gases (-80°C) hasta su análisis. Todo el círculo se utilizó para la cuantificación de nicotina y cotinina. Para la extracción se utilizaron acetato de etilo (Merck, Darmstadt, Alemania) (1 mL), 10 μL de ácido ascórbico (Merck) (1%) y 10 μL de hidróxido de amonio al 1% (Merck). La separación cromatográfica se realizó con un equipo Acquity UPLC con un XSelect HSS Cyano, 2.1 x150 mm, 5 μm (Waters®) ajustado a 40°C . La fase móvil consistió en ácido fórmico al 0.1% (Merck) en formato de amonio 5 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA): acetonitrilo (EMD Millipore Co®, México) (50: 50 v/v) a 0,3 mL/min. Para el análisis se utilizó LC-MS/MS (Quattro Micro®; Waters Co.®, Milford MA, EE. UU.). La detección se realizó mediante ESI+. La cotinina se midió en modo SRM y la transición iónica fue 177.26 > 80.14. Los datos se procesaron con el software MassLynx® 4.1. Con las condiciones descritas, la prueba fue lineal en el rango de concentración de cotinina de 0,5 a 10 ng/mL y de nicotina de 0.2 a 10 ng/mL.

Anexo 2

Protocolo para Inmunohistoquímica.

Para determinar la concentración de PER1 y BMAL1 se cortaron secciones de 40 μm en criostato las secciones y se pusieron en PBS por 2 horas a temperatura ambiente. Después de seleccionar los cortes con ayuda de un microscopio estereoscópico (sz60 OLYMPUS) se procedió a hacer el procedimiento en agitación en la siguiente secuencia:

Día 1: Lavado PBS (x3 de 10 minutos); lavado BSA-Tween 5% (x1 de 2 horas); incubación BSA-Tween 5% con anticuerpo primario (x1 de 24 horas)

Anticuerpos: se separaron en pozos individuales los tejidos a procesar solo para un anticuerpo, los cuales fueron PER1 (Novus biologicals NB300-564, 1:500) y BMAL1 (Santa Cruz Biotechnology H-170-sc-48790, 1:500)

Día 2: Lavado PBS-Tween (x5 de 5 min); incubación PBS-Tween anticuerpo secundario biotilado (x1 de 2 horas); lavado PBS-Tween-peróxido 3% (x3 de 5 minutos); Lavado PBS-Tween (x3 de 5 min); incubación conjugada de estreptavidina-peroxidasa (x1 de 30 minutos).

Anticuerpos: se utilizó el anticuerpo anticonejo biotilado (BA-1100 Vector)

Sistema de marcaje: Sistema de tinción Rabbit ImmunoCruz, (sc-2018 Santa Cruz Biotechnology)

Revelado: Las secciones de tejido se incubaron en una solución de sustrato de peroxidasa que contenía 1,6 mL de H₂O destilada, 20 μL de tampón de sustrato 10x y 40 μL de cromógeno de diaminobencidina 50x (kit de Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) y H₂O₂ al 1 % (Merck) en metanol durante 10 minutos.

12. Artículo

Brain Structure and Function
https://doi.org/10.1007/s00429-020-02126-2

ORIGINAL ARTICLE



Perinatal exposure to nicotine disrupts circadian locomotor and learning efficiency rhythms in juvenile mice

Martin A. Fuentes-Cano¹ · Dulce J. Bustamante-Valdez¹ · Pilar Durán¹

Received: 21 August 2019 / Accepted: 31 July 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

The increased rates of nicotine exposure by electronic nicotine delivery systems (vaping), ingestion, or patches during pregnancy as an alternative to the smoking of tobacco arise concerns about the neurodevelopmental, cognitive, and behavioral long-term consequences in the juvenile offspring. Nowadays, the use of electronic cigarettes as supposed a safer smoking alternative has been increased mainly in young females at reproductive age, due to the “safety” misconception. However, previous studies suggest that exposure to nicotine during pregnancy and prenatal development may lead to detrimental effects in the postnatal lifespan. Nicotine, as an alkaloid, alters the reward system acting as acetylcholine (ACh) agonist on nicotinic cholinergic receptors (nAChRs). In early brain development, the cholinergic system is also involved in neurite outgrowth, cell survival, proliferation, differentiation, neurogenesis, and many other critical processes being considered as a developmental signal marker. The nicotine noxious effect at those early stages may impact the system programming and plasticity in the long-term postnatal life. In this study, we analyze the circadian locomotor activity and learning efficiency rhythms in the juvenile male offspring of mice exposed to nicotine through pregnancy and lactation. Attenuated rhythm amplitude and relative power of the circadian component were found in the nicotine exposed offspring (pN). The acrophase (the best performance during a 24-h cycle) of learning efficiency was delayed and the long-term memory consolidation task failed after 8 days of learning experience. The aforementioned results suggest nicotine exposure *in utero* modifies the circadian modulation related to the memory consolidation and locomotor systems as well as its environmental temporal synchronization.

Keywords Prenatal nicotine · Cholinergic system · Circadian rhythms · Brain development · Mice

Introduction

Nicotine perinatal exposure, whether from smoking, vaping, ingesting, or in the form of patches, has been considered a public health problem associated with several adverse neurobehavioral effects. Either as an active or passive consumer, nicotine plasma concentrations can reach high levels (up to 3 mg/kg/day or 25 ng/ml plasma nicotine levels) in humans (Trauth et al. 2000; Slotkin 2004). During pregnancy, this conveys a risk factor for fetal and neonatal development of

the offspring. As an agonist for the nicotinic cholinergic system, nicotine can modify the early developmental signaling during maturation processes of the central nervous system (CNS).

Being altricial species, humans and rodents stage a pre and postnatal series of highly regulated, sequential changes to cell specialization, known as critical periods during the CNS development (Morgane et al. 1993). Type, severity, and timing of noxious endogenous or exogenous stimuli could modify such events like regulation of cell proliferation, neural differentiation, migration, synaptic network formation, synthesis of neurotransmitters, myelination, apoptosis, regionalization, cortical differentiation and synaptic and physiological plasticity regulation (McDonald and Johnstone 1990; Lauder and Schambra 1999; Hohmann et al. 1988; Hohmann 2003; Byers et al. 2005; Abreu-Villaça et al. 2011; Wickstrom 2007; Rüdiger and Bolz 2008; Rodier 1994; Dobbing 1990).

✉ Pilar Durán
pilis@unam.mx

¹ Laboratorio de Biología Animal Experimental, Depto. Biología Celular, Facultad de Ciencias, Neurofisiología del Desarrollo y Ritmos Biológicos, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Copilco-Universidad, Coyoacán, México City 04510, México

All in all, there is substantial evidence that early cholinergic signaling and its timing are decisive for normal development of the cholinergic system and physiological and behavioral processes during critical periods of postnatal life (Berger-Sweeney et al. 2000; Berger-Sweeney 2003; Holgate and Bartlett 2015; Navarro et al. 1990, 1989; Schneider et al. 2002).

Functional nicotine acetylcholine receptors (nAChRs) are present very early in the developing nervous system (Wickstrom 2007; Torrão and Britto 2002; Slotkin 2004). Nicotine, as a mainly cholinergic agonist for nAChRs, could interfere with the aforementioned signaling. Therefore, prenatal and postnatal nicotine exposure through maternal or second-hand cigarette smoke sensitizes the cholinergic system and those postnatal processes it controls (Slotkin et al. 2015; O'Hara et al. 1998).

It is known that nAChRs are involved in the central nervous system developmental programming (Wickstrom 2007), and early activation of these receptors leads to apoptosis and cell replication abnormalities (Berger et al. 1998). In particular, nAChRs show differential expression of subunits throughout development, for example into the suprachiasmatic nucleus (SCN), the circadian master clock in mammals, mostly during the critical period of neuronal migration (Herzog 2007; Mendoza and Challet 2009; Klein et al. 1991).

The circadian clock system synchronizes to daily environmental oscillations, displaying behavioral and physiological rhythms such as locomotor activity, food and water intake, attention, and cognitive processes (Moore-Ede 1986; Mendoza and Challet 2009). This system consists of an input pathway (retinal photoreceptors), the SCN, and an output pathway (behavioral or physiological rhythms) (Franken and Dijk 2009; Waterhouse et al. 2000). The SCN receives external signals from the environment (mainly photic) which integrates and resolves as circadian physiological and behavioral responses, this allows predictive adaptation around the Earth's 24-h day/night cycle. It is well documented that early insults on this system produce long-term disturbances (Klein et al. 1991; Waterhouse et al. 2000; Duran et al. 2011; Hut 2011).

In mature mammals, stimulation of the SCN by nicotine induces disturbances in the circadian system, such as phase delays in melatonin production in rats (Hut 2011). Nicotine administration has been shown to cause phase shifts and disrupted architecture in sleep rhythms, etc. When administered prenatally in rodents, nicotine has shown to alter vigilance states, increasing time awake and reducing time asleep in 30 days old offspring (Ferguson et al. 1999; Earnest et al. 1991; Keefe et al. 1987; Murakami et al. 1986; Wee et al. 1992; Zhang et al. 1993).

Taken together those data suggest that nicotine administration during the early brain developing system could alter

the neuroanatomical substrate, the input and output pathways resulting in disturbed behavioral and circadian rhythmic responses after birth on a medium to long-term basis.

This study aimed to explore the long-term effects of perinatal nicotine administration on the circadian system, by monitoring locomotor activity across different photoperiods as well as the daily rhythm of spatial memory in mice.

Experimental procedures

Animals and experimental groups

Albino mice BALB/c, born and raised at the Vivarium of Facultad de Ciencias, UNAM were maintained under standard colony conditions with food (Rodent Lab Chow 5001, Purina Inc.) and water ad libitum in a temperature and light-controlled room (12:12 light–dark cycle, temperature between 22 and 24 °C and humidity 40–50%). We obtained experimental offspring from 14 adult females (dams) separated into two groups ($n=7$): controls (Co) and nicotine-exposed (N) all mated with males in two females: one male proportion. The litters were standardized to eight pups each (six males and two females). At weaning, we derived five subgroups for each condition (Co and pN); as follows: one male from each litter was assigned to a subgroup to avoid homogeneity in the data due to inbreeding. The chronic recording was performed using 6 Co and 6 pN mice; meanwhile, for each of the four times (or ZT subgroups) in the spatial navigation and memory test, an $n=8$ was assigned. Each animal only was tested in the allocated subgroup. Males and females not used in this study were assigned to a parallel protocol.

The main circadian component, acrophase, mesor, and rhythm-amplitude are different between the adult male and intact female mice. Locomotor activity increases during the proestrus and estrous phases displaying a clear 4–5 infradian cycle. We chose only male offspring to avoid the gender mentioned issues (Krizo and Mintz 2015; Mizuta et al. 2018). Control (Co) and perinatal nicotine-exposed (pN) offspring groups were formed and maintained at the vivarium until the experiment. For all procedures, time is expressed as zeitgeber time (ZT), with ZT0 defined as the time when lights were turned on and ZT12 turned off in the light–dark (LD) cycle.

Nicotine administration

Nicotine NicSelect[®] for a commercial electronic cigarette (24 mg/mL) was used; the purity (98%) was determined by

thin-layer chromatography and HPLC using a nicotine standard (Sigma Aldrich N5260).

Using a model of oral nicotine consumption, in concordance to previous studies (Pitela and Anthee 2000; McBurnie et al. 1988, and Martin et al. 2020), 1 ml from the stock solution was diluted in 2000 ml (12 µg/mL).

Drinking water was flavored with vanilla, supplied, and freshened daily 10 days before mating and throughout pregnancy. Nicotine was diluted into the flavored drinking water for the pN. We calculate the dose considering body/weight relationship and daily drinking solution, comparable to similar protocols to reach 3 mg/kg/day (Trauth et al. 2000; Slotkin et al. 1995; Huang et al. 2006; Pietila and Ahtee 2000; Rowell et al. 1983). Nicotine drinking solution was initially supplied 10 days before and through mating, gestation, and lactation until weaning. This protocol was chosen to reduce manipulation stress, and its use has been well documented (Balfour 1980; Kita et al. 1985; Nordberg et al. 1985; Pekonen et al. 1993; Robison et al. 1996; Rowell et al. 1983; Stolerman et al. 1973).

Nicotine concentration in blood was measured by *dried blood-spot analysis* in pregnant dams and their offspring. Quantification was carried out by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) (Waters Quattro Micro API triple quadrupole Milford, USA) and nicotine and cotinine (both from Sigma Aldrich) as standards.

Locomotor activity analysis

Using a non-invasive infrared sensors system, locomotor activity began at 30 days of age for Co and pN male offspring ($n = 6$, each) individually housed in glass chambers. Animals were housed in the same room and racks they were born and maintained throughout the recording period. Locomotor activity counts were collected every 10 min without interruption for at least 3 months and were recorded under different consecutive light protocols at least during ten days for each condition: At first, animals were placed in a 12:12 Light–Dark (LD) cycle, lights on at 06:00 h and off at 18:00 h. Each cage was illuminated using a white LED light (≈ 150 Lx), controlled by a domestic timer. Then, data were collected in a constant darkness (DD) cycle throughout 28 days, to expose free-running or endogenous rhythms. While in this condition, animal maintenance was performed under dim red light (1–3 Lx) when needed and randomly at different times of the day. Afterward, the original LD conditions were re-established for at least 10 days (resynchronization), before constant light (LL) photoperiod was imposed for at least 28 days. The recorded activity data were analyzed, and daily activity rhythms visually presented as double-plotted actograms

using ActiView (ActiView™; Minimitter Co., Sunriver, Oregon, USA).

Spatial navigation and memory acquisition rhythm

Control ($n = 32$) and pN ($n = 32$) 30-day-old males. Four groups ($n = 8$) were formed equidistantly for 24 h period and were named according to the zeitgeber time zero (lights on). Each subgroup was tested in a Barnes maze (Barnes 1979; Harrison et al. 2009; Sunyer et al. 2007), using a video tracking system (ANY-maze, Stoelting CO, USA) to determine spatial navigation at their assigned zeitgeber subgroup (ZT3 = 09:00, ZT9 = 15:00, ZT15 = 21:00 or ZT21 = 03:00) as in Sunyer et al. (2007). To maintain the heterogeneity, only one mouse per litter was assigned to each group.

To analyze spatial memory, Barnes maze tests were performed by three consecutive trials once a day for 4 days. Forty-five minutes after last trial and after 7 days the maze test was performed without the escape tunnel. Learning efficiency and escape latency for learning acquisition, short-term and long-term memory were recorded for posterior analysis. Data collected was submitted to COSINOR analysis using Chronos-Fit (Zuther and Lemmer 2005).

All procedures described were conducted following the ethical guidelines of Declaration of Helsinki and National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No.8023), Institutional guidelines, and the Government agency SEMARNAP (General Law of Health for Research Studies (NOM-Z00-2000) and signed by the National Institute of Pediatrics bioethical committee (INV/B/RGC/107/18).

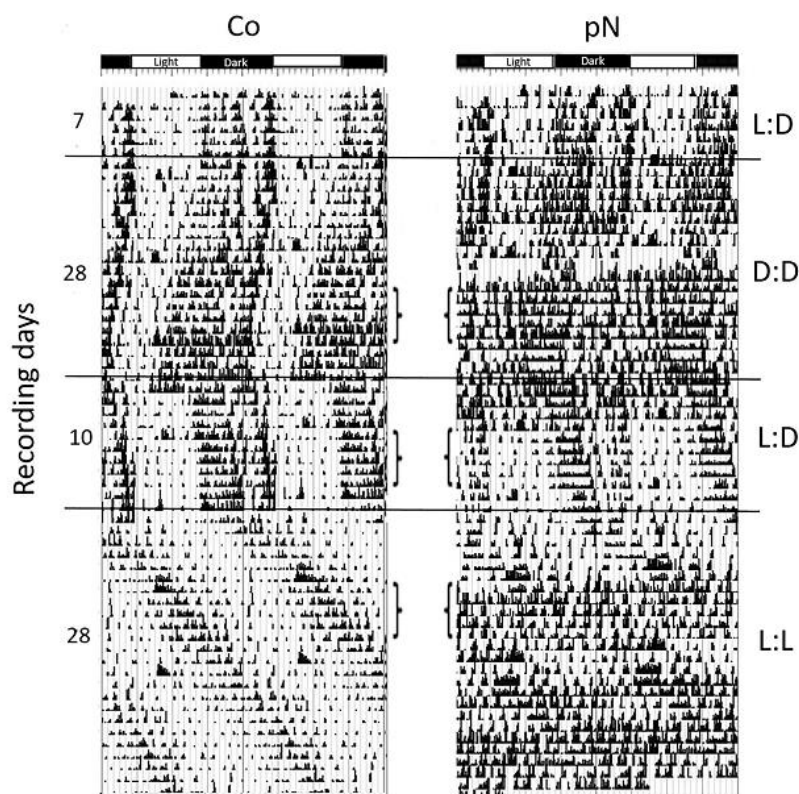
Data and statistical analysis

Locomotor activity (LA) rhythm was analyzed by χ^2 periodograms (Sokolove and Bushell 1978) using TAU software (MiniMitter), when LA temporal distribution was stable (at least five consecutive recorded days). Only those periods above the confidence interval ($p < 0.05$) were considered as an actual rhythm.

As aforementioned all data were submitted to COSINOR analysis which is based on fitting a cosine curve to the data, using the least squares method for the actual adjustment. As rhythmometric parameters: an adjusted curve, acrophase, mesor, amplitude and period were subjected to a $p < 0.5$ to consider significance. All rhythmometric parameters used data from the days, where LA manifested a stable phase and period (indicated by a square bracket in Fig. 1), to avoid transitory adjustments. Data within two horizontal lines as marked in Fig. 1, were analyzed to determine the circadian period power and dominance in different conditions.

Spatial Navigation results were analyzed using two-way ANOVA, and Newman-Keuls test as post hoc (Statistica

Fig. 1 Representative actograms of locomotor activity rhythm. Representative actogram of response to different photoperiodic conditions, LEFT Co group response, RIGHT pN group response, CENTER the photoperiodic protocol to which both groups were exposed, L:D 12:12 acclimation, D:D constant dark (free running behavior), L:D synchronization and L:L constant light (free running behavior). Bracket lines mark those days where a periodogram analysis was performed, using stable day's response for controls to compare with pN. First column, days in every condition



12-StatSoft software) intragroup and intergroup, statistical differences were considered when $p < 0.05$. Results are presented a mean (\pm SEM) unless indicated.

Results

We did not find significant differences in water drinking intake. We measured the daily water volume consumed by Co and pN dams 1 week prior to mating (Co = 5.1 ± 0.52 ml; pN = 5 ± 0.87 ml), gestational week 2 (Co = 7.53 ± 0.87 ; pN = 6.78 ± 2.41) and lactation week 2

(Co = 14.58 ± 0.83 ; pN = 13.81 ± 1.21). The *t* Student test reported no significant treatment differences were found.

Nicotine in blood

The commercial nicotine NicSelect[®] used in this study was chromatographed, revealing 98% purity, as aforementioned. Nicotine and its metabolite cotinine were present in the sampled blood test for the offspring postnatal period (P3–P35) (see Table 1).

Table 1 Presence of nicotine and its metabolite cotinine in the progeny of the mice exposed to nicotine ingestion, samples were taken from birth to lactation period (Nanograms/mL)

	P3	P7	P10	P16	P35
Nicotine	0.599 ± 0.2	0.515 ± 0.2	0.428 ± 0.2	0.517 ± 0.1	0.003 ± 0.1
Cotinine	0.737 ± 0.1	3.973 ± 0.9	1.665 ± 0.7	1.766 ± 0.6	0.001 ± 0.2

* \pm sd; P means postnatal day

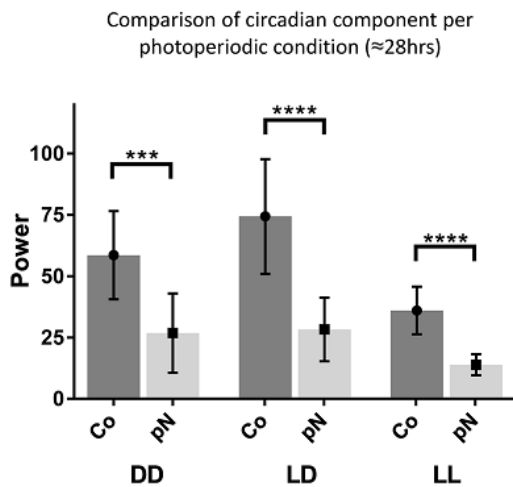


Fig. 2 Period length and power. Contribution of circadian component after Periodogram analysis by condition, where the circadian component shows a significant higher value in Co group than pN group. The vertical lines represent \pm SD. Co ($n = 6$); pN ($n = 6$). $P = 0.039$ (**); $P < 0.001$ (****)

Table 2 Response of both group to constant condition of photoperiod, remarking how many days to arrhythmic behavior of locomotor activity and tau of the end of D:D and L:L condition; meanwhile, in L:L condition how many days to synchronization to on-off light. pN ($n = 6$), Co ($n = 6$)

	D:D (tau)	L:L (tau)	Days to arrhythmic	Days to synchronization
pN	Arrhythmia	Arrhythmia	11 ± 3 D:D/ 7 ± 2 L:L	7 ± 1
Co	23.5 ± 0.23 h	25.68 ± 0.21 h	-	5 ± 1

Circadian Locomotor activity

The locomotor activity rhythm for both Co and pN groups during regular 12:12 LD photoperiod showed an evident nocturnal activity. Under constant dark or *free-running* conditions (DD), Co showed an apparent and stable circadian period, whereas pN became arrhythmic after several days. When rescheduled to a 12/12 LD after DD, Co required 4 ± 1 days; meanwhile, pN spend about 10 days to resynchronize. During the constant light condition, Co maintained a circadian period; meanwhile, pN became arrhythmic (see actogram in Fig. 1).

Periodogram

The activity power analysis showed a significant diminished power in pN for all lighting conditions: DD ($t_{df(18)} = 4.15$, $P < 0.001$), LD ($t_{df(18)} = 5.45$, $P < 0.001$) and LL ($t_{df(18)} = 6.6$, $P < 0.001$) and only during LL for Co (see Fig. 2).

Meanwhile, the circadian period (tau) Co displayed a 23.5 ± 0.2 h in DD, 24 h in LD, and 25.7 ± 0.2 hrs in LL, where pN became arrhythmic, except when synchronized by LD (see Table 2).

Behavioral test

Spatial navigation activity rhythm test

The learning efficiency was confirmed by a correlation analysis, where latency decreased through the 12 trials ($r^2 = 0.68$ -Co and 0.75 -pN) for all subgroups (ZT03, ZT9, ZT15, and ZT21). Short term memory tested 45 min after the last trial when compared intragroup performed differently. The intergroup behavioral tests analyses scheduled at different times during the day showed marked differences in learning efficiency, being the highest at ZT3 and the lowest at ZT15 ($F_{3,56} = 13.02$, $p < 0.0001$; ZT3 vs ZT15 Co $p = 0.003$, pN $p = 0.0009$), *posthoc* tests determined. For both groups, the analysis established the acrophase (higher efficiency) at the beginning of the photophase (Fig. 3-Left).

In comparison, a different distribution between distinct temporal execution ZT's was observed. Within each group; between ZT3 and ZT15 ($p = 0.003$), ZT3 and ZT9 ($p = 0.014$) and a tendency ZT15 and ZT21 ($p = 0.052$) in Co. Meanwhile, ZT3 and ZT9 ($p = 0.005$), ZT3, and ZT21 ($p = 0.003$) ZT3 and ZT15 ($p = 0.009$) were different in pN. Comparing these schedules within groups, we found a differential distribution of spatial memory between execution time in both groups (see Fig. 3-Left). Only ZT21 showed intragroup difference, being Co higher than pN ($p = 0.03$).

Remote spatial navigation activity rhythm test

When the remote (long term) memory was analyzed, the obtained results showed the differences due to the ZT when the test was performed. Differences in the Co subgroups were observed ($F_{3,56} = 13.02$, $p < 0.0001$; Fig. 3-Right up), whereas no differences were found in the pN subgroups ($F_{3,28} = 0.89$, $p = 0.460$; Fig. 3-Right down). *Post-hoc* tests determined differences within Co group between ZT3-ZT9 ($p = 0.006$), ZT9-ZT15 ($p = 0.02$) and ZT9-ZT21 ($p < 0.001$).

No daily rhythm or circadian fluctuation was shown for pN at any ZT; meanwhile, Co showed a clear fluctuation during the day, the difference between groups was found in two ZT (ZT3 Co vs pN $p = 0.006$; ZT21 Co vs pN $p < 0.001$).

Fig. 3 Learning efficiency. Shows the spatial memory efficiency rhythm in double-plotted. Up Co group and down pN group. Cosinor analysis spatial memory for short term (Left) and long-term (Right) probes scheduled at different temporal points for Co and pN group. Same letter means that inside the group there are statistical differences ($p \leq 0.05$) obtained by two ways-ANOVA and Newman-Keuls post hoc, vertical lines represent \pm SEM. Greek symbols mean that intergroups there are statistical differences ($F_{3,56} = 13.02$, $p < 0.0001$; $\alpha p = 0.03$; $\beta p = 0.006$; $\gamma p = 0.0005$). Grey background line in every plot is the diary oscillation obtained by COSINOR analysis. Small squares represent de learning progress in trials before short term task

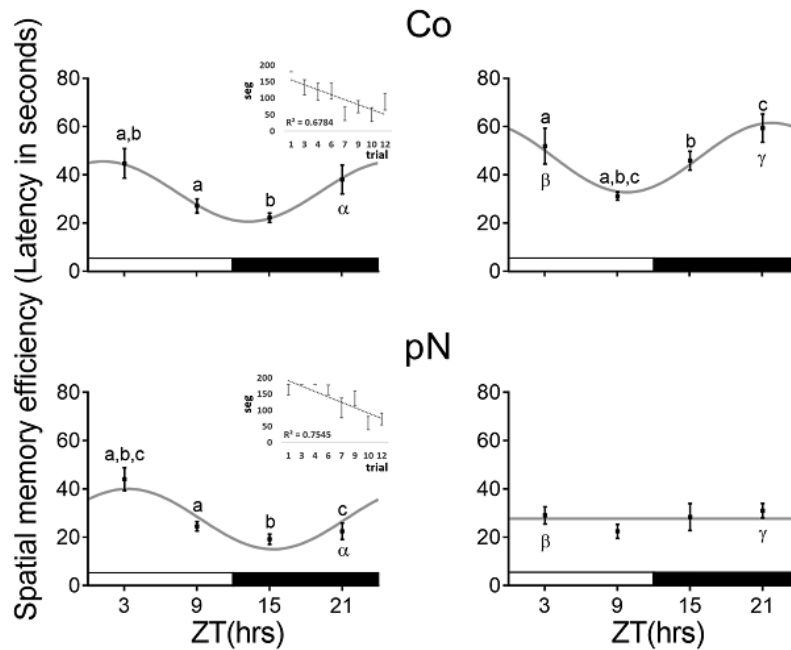


Table 3 Cosinor analysis

	Co(st)	pN(st)	Co(lt)	pN(lt)
Mesor	33.11	27.54	47.16	27.68
Amplitude	12.48	12.49	14.37	–
Acrophase	1.27	3.31	21.80	–
F-value	7.6	12.51	7.89	Ns
P-value	0.0022	0.0001	0.0018	Ns
% Rhythm	34.38	46.33	35.24	Ns

Circadian properties to spatial memory probes for short term (st) and long term (lt) in both groups. *P* values under 0.05 indicate an oscillation statistically significant

Ns no significant

Long-term memory recall showed differences in Co, not seen in the pN. However, comparing the timing of tasks between Co and pN, a significant decrease in efficiency was found.

Learning and memory rhythm. Circadian analysis

The COSINOR analysis confirmed a daily rhythm for short term spatial memory in both groups, although the circadian components were different between Co and pN as shown in Fig. 3-Left. While both groups presented a daily

24-h rhythm, a 1.3-h phase-lag in the acrophase, lower amplitude, and mesor for pN were observed when compared to Co. (see Table 3).

On the other hand, long-term spatial memory (Fig. 3-Right) showed the presence of a single daily rhythm in Co, with acrophase in the second part of scotophase (darkness), and a higher mesor than in the Co at short term spatial memory, suggesting consolidation of memory.

While the significant rhythmicity reduction cannot be confirmed, the presence of rhythm and lack of incremental mesor suggest that the pN group fails in the consolidation of the memory process (Table 2).

Discussion

Several studies have suggested the presence of negative effects of nicotine during CNS perinatal development, including premature death (Wickstrom 2007). However, there is a lack of information in the scientific literature on how perinatal exposure of nicotine affects the development of the circadian system and its long-term effects on animals. In the present study, the pN locomotor activity rhythm shows difficulty to maintain and synchronize to the changing light environmental condition, meaning some physiological, cognitive, and behavioral responses are altered. Since the system to record locomotor activity is a non-invasive infrared

sensors based outside a regular house-cage, we maintain the animals housed in the same facilities and racks they were born throughout the recording protocol, allowing us to observe changes related to the system maturation as well as the impact of prenatal nicotine exposure on its photic-related responses.

Nicotine withdrawal has been reported to last 4 days before thresholds return to baseline levels (Stoker et al. 2008) when adult mice (same strain and similar dose administered here to dams) have been tested. For dams, we did not find drinking water intake significant treatment differences when compared before mating or throughout gestational and lactation periods, similar to those reported by Pietilä and Ahtee (2000) and McBurnie et al. (1988). However, Martin et al. (2020) reported for the control and nic100 groups (a similar nicotine concentration used for us), not significant differences between groups when prenatal and postnatal periods were compared, but they reported nic100 dams consumed a significantly lower volume of drinking water than controls before mating. As aforementioned, we did not find differences in our comparisons, maybe due to the vanilla-flavored drinking water we supplied to both (Co and pN) groups, which could mask the distasteful nicotine flavor.

Our results for nicotine and its metabolite cotinine (Table 1) presence in pN, though were positive in blood samples immediately after birth and during lactation showed lowest concentrations than those reported in chronic nicotine administration models, or those to produce withdrawal in adults. After weaning and through the experiment, the drinking water supply was without nicotine. At 35 days of age, we did not find nicotine or cotinine in our samples. It is important to consider that nicotine was administered to dams during gestation and lactation and reached embryos to an unknown concentration.

During the first two lactation weeks, the offspring were not able to drink the nicotine solution, because the nozzle bottle was at a height where pups were unable to reach before 14–16 pp day. The week prior weaning, pups drank the nicotine solution to an unknown concentration.

We report low nicotine and cotinine concentration in blood samples. The acute nicotine injection of 1 mg/Kg metabolizes in 60 min, meanwhile, cotinine metabolizes at 240 min (Li et al. 2013). Our results are in concordance to those reported by Pietilä and Ahtee (2000), since they used nicotine diluted in drinking water *ad libitum*; they reported that doses below 200 µg/ml did not affect even weight gain nor water consumption. The timing for sampling could influence the results, since sampling was done at ZT4, clearly in the light phase, where mice display the lowest activity and drinking behavior, being nocturnal animals; if nicotine consumption via water intake occurred mainly during the night (the activity phase) in plasma nicotine and cotinine

presence could be mostly metabolized before or around the sampling time, this could explain our lower results compared to other groups.

The circadian locomotor activity recording started at 30 days of age or juvenile male mice, did permit to scope the maturation milestone to the hypothalamic circadian system maturation (Moore 1982), as well to determine the impact of perinatal nicotine exposure on its photic-related responses.

Several studies have correlated the daily fluctuations of various components from the cholinergic system (such as ACh, ChAT, and AChE) with locomotor activity rhythm, which in general show a high release of ACh during the activity phase and high activity of AChE in the resting phase (Hut 2011).

In this study, we looked for a relationship between nicotine insult during perinatal development and offspring circadian response to photic stress conditions of higher cognitive processes such as memory and locomotor activity during young adulthood.

At different time windows throughout the day, both groups showed a similar profile in short-term memory. However, the circadian profile displayed different characteristics, showing a delay in pN acrophase (1.3 h.) compared to the control. These results are comparable to those reported by Durán et al. (2011) regarding the phase change in a malnutrition model affecting the daily rhythm of working memory.

Actograms representation provides an indirect view of SCN activity that controls the circadian expression for several behaviors as the locomotor activity. The power in a periodogram means how strong is the oscillation, with a higher power the oscillation express and strong circadian regulated rhythm; meanwhile, a lower power the oscillation expresses a non-regulated rhythm, the absence of a regulated rhythm alters the temporal efficiency on metabolic and physiologic parameters particularly the circadian regulated, thus provide an efficient tool to suggest modifications in the neuro-anatomical substrate.

These anomalies could be caused by altered Ca²⁺ homeostasis through the nAChR $\alpha 7$ and the action of second messengers. It has been shown that intracellular Ca²⁺ is essential for the rhythmic function of neuronal firing and coupling in the SCN (Welsh et al. 2010). Additionally, Ca²⁺ regulates protein expression, especially the clock protein *Per*, which is dependent on intracellular calcium for cAMP response element-binding protein (CREB) activation and its coupling to CREs (calcium/cAMP regulatory elements) in DNA, thus promoting the transcription of this gene that controls the negative loop of the molecular clock (Ikeda et al. 2003; Travnickova-Bendova et al. 2002; Welsh et al. 2010). Other studies involving developmental exposure to nicotine in rodents have reported structural changes in the CNS morphology, causing long-term abnormal neural function, which modifies the response to stimuli. Therefore,

nicotine exposure during perinatal development may also be affecting the morphological organization of SCN and its response to changing light conditions (Slotkin 2004).

The spatial memory tested several times during the day allowed determining the best performance time (acrophase) for the groups, since different studies have shown that biological rhythms influence cognitive and behavioral responses to the environment (Duran et al. 2011). Nicotine exposure in utero delays the acrophase for short-term memory recall and attenuates the circadian oscillation with an almost null long-term memory recall.

Spatial memory performance was different between groups. Meanwhile, Co had a clear daily rhythm during memory consolidation and retrieval, the pN group failed to show a clear rhythm and always presented a diminished learning efficiency, when compared to Co. These results are consistent with several reports regarding long-term memory deficits on perinatal nicotine models (Deiana et al. 2011).

These results suggest that during pregnancy, nicotine deleteriously modifies the development of both the cholinergic signals and neural circuits or structures involved in cognitive (hippocampus and prefrontal cortex) and circadian control by the SCN of the offspring (Welsh et al. 2010; Huang et al. 2007; Dwyer et al. 2009).

It is well known that the disruption of the cholinergic system during CNS development and maturation influences attention processes, essential for learning and memory. Studies looking at the effects on CNS maturation, after manipulation of the cholinergic system (by particular components) at different periods of maturation, demonstrate a close relationship between these systems. These studies also confirm the necessity for both systems in the establishment of attention processes, such as learning and memory (Hut 2011; Levin et al. 1996; Huang et al. 2007), and that nicotine causes alterations in CNS development due to its interaction with nicotine acetylcholine receptors (nAChRs), which are critical for signaling and maturation of the CNS and in all stages of development from conception to adulthood (Abreu-Villaça et al. 2011; Slotkin 2004; Finlay and Darlington 1995; Torráo and Britto 2002).

On the other hand, O'Hara et al. (1999) have demonstrated that signaling from the cholinergic system in the SCN is crucial for normal development. Modulation of cellular ionic influx by differential expression of nAChRs in early development allows differences in gene regulation and protein expression. Our results may imply a modification of the circadian system development, caused by nicotine interactions with the nAChRs resulting in altered cholinergic signaling during perinatal development, such implication should be tested further. It is widely known, that prenatal exposure to maternal smoking or vaping is related to some neurophysiological and cognitive disorders such as deficits, insomnia, anxiety, attention in humans, and that those responses and behaviors are influenced by the sleep-wake cycle, a circadian rhythm controlled by the hypothalamic SCN. Early exposure to nicotine may disrupt the

cholinergic signals and system organization, as well as influence those structures as the suprachiasmatic nuclei (SCN) known as the circadian clock, a further approach is necessary to understand better how the molecular clock in the SCN, its interactions and modulations influence and determine some behavioral response driven by circadian synchronization.

Conclusion

In this research, we have found that nicotine exposure during early perinatal development produces effects on behavioral and cognitive performance as well as its circadian expression in postnatal life. These suggest, particularly that the cholinergic system plays an important role in these responses and mechanisms and that their development and maturation were affected in the short and long term. The exposition to some legal but addictive substances during pregnancy can have severe health consequences for women and newborn children. Besides, the direct effects of abuse substances exposure in utero, when critical periods of development, particularly in the Nervous System take place, may predispose the body to develop maladaptive physiological responses throughout its lifespan.

Acknowledgements This research was partially supported by PD-LBAE-FC UNAM 2015-2018 and PCBM-2016. Martín A. Fuentes-Cano is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 364988 from CONACYT. We thank Liliana Rivera Espinosa, Technician INP-SS, and Roberto Enrique Llanos Romero, Technician Lab Fitoquímica, FC-UNAM for assistance with nicotine/cotinine quantification in blood samples and solution, Martín Fuentes Cruz, engineer IIMAS-UNAM for developing DACIR (Data Acquisition Circadian Rhythms system) and Dr. Rosa María Viguera Villaseñor, researcher, INP-SS for comments that greatly improved the manuscript. We also thank Dr. Manuel Miranda from UMDI-FC, UNAM and Dr. Luz Navarro Angulo, FM, UNAM who provided insight and expertise that greatly assisted the research, although they may not agree with all of the interpretations/conclusions of this paper. We are also immensely grateful to Jesús González Ruano, Nayeli Ortega Villegas and Roberto Mendoza Barraza, undergraduate students for assistance in the animals' care and recording supervision. Finally, we thank Ms. Maria Cox for her English language revision.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Abreu-Villaça Y, Filgueiras CC, Manhães AC (2011) Developmental aspects of the cholinergic system. *Behav Brain Res* 221(2):367–378. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.12.049>
- Balfour DJK (1980) Studies on the biochemical and behavioral effects of oral nicotine. *Arch Int Pharmacodynamics* 245:95–103

- Barnes CA (1979) Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 93(1):74–104. <https://doi.org/10.1037/h0077579>
- Berger F, Gage FH, Vijayaraghavan S (1998) Nicotinic receptor-induced apoptotic cell death of hippocampal progenitor cells. *J Neurosci* 18(17):6871–6881. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-17-06871.1998>
- Berger-Sweeney J (2003) The cholinergic basal forebrain system during development and its influence on cognitive processes: important questions and potential answers. *Neurosci Biobehav Rev* 27(4):401–411. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(03\)00070-8](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00070-8)
- Berger-Sweeney J, Stearns NA, Frick KM, Beard B, Baxter MG (2000) Cholinergic basal forebrain is critical for social transmission of food preferences. *Hippocampus* 10(6):729. [https://doi.org/10.1002/1098-1063\(2000\)10:6<729::AID-HIPO1010>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1098-1063(2000)10:6<729::AID-HIPO1010>3.0.CO;2-M)
- Bhide PG (2009) Dopamine, cocaine and the development of cerebral cortical cytoarchitecture: a review of current concepts. *Seminars in cell & developmental biology* 20(4):395–402. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2009.01.006>
- Byers DM, Irwin LN, Moss DE, Sumaya IC, Hohmann CF (2005) Prenatal exposure to the acetylcholinesterase inhibitor methanesulfonyl fluoride alters forebrain morphology and gene expression. *Brain Res Dev Brain Res* 158(1–2):13–22. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2005.05.003>
- Deiana S, Platt B, Riedel G (2011) The cholinergic system and spatial learning. *Behav Brain Res* 221(2):389–411. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.036>
- Dobbing J (1990) Early nutrition and later achievement. *Proc Nutr Soc* 49(2):103–118. <https://doi.org/10.1079/PNS19900017>
- Durán P, Miranda-Anaya M, Romero M, Mondragon-Soto K, Cintra L (2011) Time-place learning is altered by perinatal low-protein malnutrition in adult rat. *Nutr Neurosci* 14(4):145–150. <https://doi.org/10.1179/147683011X13009738172567>
- Dwyer JB, McQuown SC, Leslie FM (2009) The dynamic effects of nicotine on the developing brain. *Pharmacol Ther* 122(2):125–139. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.02.003>
- Earnest DJ, Digiorgio SM, Sladek CD (1991) Effects of tetrodotoxin on the circadian pacemaker mechanism in suprachiasmatic explants in vitro. *Brain Res Bull* 26(5):677–682. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(91\)90160-L](https://doi.org/10.1016/0361-9230(91)90160-L)
- Ferguson SA, Kennaway DJ, Moyer RW (1999) Nicotine phase shifts the 6-sulphatoxymelatonin rhythm and induces c-Fos in the SCN of rats. *Brain Res Bull* 48(5):527–538. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(99\)00033-7](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(99)00033-7)
- Finlay BL, Darlington RB (1995) Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains. *Science* 268(5217):1578–1584. <https://doi.org/10.1126/science.7777856>
- Frank MG, Srere H, Ledezma C, O'Hara B, Heller HC (2001) Prenatal nicotine alters vigilance states and AchR gene expression in the neonatal rat: implications for SIDS. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280(4):R1134–R1140. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.280.4.R1134>
- Franken P, Dijk DJ (2009) Circadian clock genes and sleep homeostasis. *Eur J Neurosci* 29(9):1820–1829. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06723.x>
- Harrison FE, Hosseini AH, MacDonald MP (2009) Endogenous anxiety and stress responses in water maze and Barnes maze spatial memory tasks. *Behav Brain Res* 198:247–251. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.10.015>
- Herzog ED (2007) Neurons and networks in daily rhythms. *Nat Rev Neurosci* 10:790–802. <https://doi.org/10.1038/nrn2215>
- Hohmann CF (2003) A morphogenetic role for acetylcholine in mouse cerebral neocortex. *Neurosci Biobehav Rev* 27(4):351–363. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(03\)00066-6](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00066-6)
- Hohmann CF, Brooks AR, Coyle JT (1988) Neonatal lesions of the basal forebrain cholinergic neurons result in abnormal cortical development. *Brain Res* 470(2):253–264. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(88\)90244-1](https://doi.org/10.1016/0165-3806(88)90244-1)
- Holgate JY, Bartlett SE (2015) Early life stress, nicotinic acetylcholine receptors and alcohol use disorders. *Brain Sci* 5(3):258–274. <https://doi.org/10.3390/brainsci5030258>
- Huang L, Hsiao SH, Trzeciakowski JT, Frye GD, Winzer-Serhan UH (2006) Chronic nicotine induces growth retardation in neonatal rat pups. *Life Sci* 78(13):483–493. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.07.047>
- Huang LZ, Abbott LC, Winzer-Serhan UH (2007) Effects of chronic neonatal nicotine exposure on nicotinic acetylcholine receptor binding, cell death and morphology in hippocampus and cerebellum. *Neuroscience* 146(4):1854–1868. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.03.008>
- Hut RA (2011) The cholinergic system, circadian rhythmicity, and time memory. *Behav Brain Res* 221(2):466–480. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.039>
- Ikeda M, Sugiyama T, Wallace CS, Gompf HS, Yoshioka T, Miyawaki A, Allen CN (2003) Circadian dynamics of cytosolic and nuclear Ca²⁺ in single suprachiasmatic nucleus neurons. *Neuron* 38(2):253–263. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00164-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00164-8)
- Keefe DL, Earnest DJ, Nelson D, Takahashi JS, Turek FW (1987) A cholinergic antagonist, mecamylamine, blocks the phase-shifting effects of light on the circadian rhythm of locomotor activity in the golden hamster. *Brain Res* 403(2):308–312. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)90068-0](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90068-0)
- Kita T, Nakashima T, Kuroguchi Y (1985) Effects of oral administration of nicotine on circadian rhythms of ambulatory activity and drinking in rats. *Japan J Pharmacol* 39:554–557. <https://doi.org/10.1254/jjp.39.554>
- Klein DC, Moore RY, Reppert SM (1991) Suprachiasmatic nucleus: the mind's clock. Oxford University Press, Oxford, pp 1–467
- Klinkenberg I, Sambeth A, Blokland A (2011) Acetylcholine and attention. *Behav Brain Res* 221(2):430–442. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.11.033>
- Krzo JA, Mintz EM (2015) Sex differences in behavioral circadian rhythms in laboratory rodents. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5:234. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00234>
- Lauder JM, Schambra UB (1999) Morphogenetic roles of acetylcholine. *Environ Health Perspect* 107(Suppl):65–69. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107s165>
- Lefta M, Wolff G, Esser KA (2011) Circadian rhythms, the molecular clock, and skeletal muscle. *Curr Top Dev Biol* 96:231–271. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385940-2.00009-7>
- Levin ED, Wilkerson A, Jones JP, ChristopherBriggs NCSJ (1996) Prenatal nicotine effects on memory in rats pharmacological and behavioral challenges. *Brain Res Dev Brain Res* 97(2):207–215. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(96\)00144-7](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(96)00144-7)
- Li L, Jia K, Zhou X, McCallum SE, Hough LB, Ding X (2013) Impact of nicotine metabolism on nicotine's pharmacological effects and behavioral responses: insights from a Cyp2a(4/5)bgs-null mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 347(3):746–754. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.208256>
- Martin MM, McCarthy DM, Schatschneider C, Trupiano MX, Jones SK, Kalluri A, Bhide PG (2020) Effects of developmental nicotine exposure on frontal cortical GABA-to-Non-GABA neuron ratio and novelty-seeking behavior. *Cereb Cortex* 30(3):1830–1842. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhz207>
- McBurnie M, Denton D, Tarjan E (1988) Influence of pregnancy and lactation on Na appetite of BALB/c mice. *Am J Physiol* 255(6 Pt 2):R1020–R1024. <https://doi.org/10.1152/ajpgu.1988.255.6.R1020>

- McDonald JW, Johnston MV (1990) Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Rev* 15(1):41–70. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(90\)90011-c](https://doi.org/10.1016/0165-0173(90)90011-c)
- Mendoza J, Challet E (2009) Brain clocks: from the suprachiasmatic nuclei to a cerebral network. *Neuroscientist* 15:477–488. <https://doi.org/10.1177/1073858408327808>
- Mizuta S, Sugiyama M, Tokuda IT, Nakamura W, Nakamura TJ (2018) Photic phase-response curves for cycling female mice. *Horm Behav* 2018(105):41–46. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh>
- Moore YR (1982) The suprachiasmatic nucleus and the organization of a circadian system. *Trends Neurosci* 5:404–407. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(82\)90224-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(82)90224-7)
- Moore-Ede MC (1986) Physiology of the circadian timing system: predictive versus reactive homeostasis. *Am J Physiol* 250(19):R735–R752. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1986.250.5.R737>
- Morgane PJ, Austin-LaFrance R, Bronzino J, Tonkiss J, Díaz-Cintra S, Cintra L, Kemper T, Galler JR (1993) Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 17(1):91–128. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(05\)80234-9](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(05)80234-9)
- Murakami N, Furukawa T, Yokawa T, EtohTakahashi TK (1986) Effects of continuous supply of light or carbachol to the SCN on the rat free-running rhythm. *Jpn J Physiol* 36(2):411–416. <https://doi.org/10.2170/jjphysiol.36.411>
- Navarro HA, Seidler FJ, Eylers JP, Baker FE, Dobbins SS, Lappi SE, Slotkin TA (1989) Effects of prenatal nicotine exposure on development of central and peripheral cholinergic neurotransmitter systems. Evidence for cholinergic trophic influences in developing brain. *J Pharmacol Exp Ther* 251(3):894–900
- Navarro HA, Mills E, Seidler FJ, Baker FE, Lappi SE, Tayyeb MI, Spencer JR, Slotkin TA (1990) Prenatal nicotine exposure impairs beta-adrenergic function: persistent chronotropic subsensitivity despite recovery from deficits in receptor binding. *Brain Res Bull* 25:233–237. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(90\)90066-9](https://doi.org/10.1016/0361-9230(90)90066-9)
- Navarro HA, Basta PV, Seidler FJ, Slotkin TA (2003) Short-term adolescent nicotine exposure in rats elicits immediate and delayed deficits in T-lymphocyte function: critical periods, patterns of exposure, dose thresholds. *Nicotine Tob Res* 5:859–868. <https://doi.org/10.1080/14622200310001614610>
- Nordberg A, Wahlström G, Arnelo U, Larsson C (1985) Effect of long-term nicotine treatment on (3H)-nicotine binding sites in the rat brain. *Drug Alcohol Depend* 16(1):9–17. [https://doi.org/10.1016/0376-8716\(85\)90077-8](https://doi.org/10.1016/0376-8716(85)90077-8)
- O'Hara BF, Edgar DM, Cao VH, Wiler SW, Heller HC, Kilduff TS, Miller JD (1998) Nicotine and nicotinic receptor in the circadian system. *Psychoneuroendocrinology* 23(2):161–173. [https://doi.org/10.1016/s0306-4530\(97\)00077-2](https://doi.org/10.1016/s0306-4530(97)00077-2)
- O'Hara BF, Macdonald E, Clegg D, Wiler SW, Andretic R, Cao VH, Miller JD, Heller HC, Kilduff TS (1999) Developmental changes in nicotinic receptor mRNAs and responses to nicotine in the suprachiasmatic nucleus and other brain regions. *Mol Brain Res* 66(1–2):71–82. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(99\)00004-2](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(99)00004-2)
- Ohdo S (2010) Chronopharmacological strategies: Intra- and inter-individual variability of molecular clock. *Adv Drug Deliv Rev* 62(9–10):885–897. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.04.005>
- Pekonen K, Karlsson C, Laakso I, Ahtee L (1993) Plasma nicotine and cotinine concentrations in mice after chronic oral nicotine administration and challenge doses. *Eur J Pharmacol* 1:13–18. [https://doi.org/10.1016/0928-0987\(93\)90013-Z](https://doi.org/10.1016/0928-0987(93)90013-Z)
- Pietilä K, Ahtee L (2000) Chronic nicotine administration in the drinking water affects the striatal dopamine in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 66(1):95–103. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(00\)00235-5](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(00)00235-5)
- Robinson SF, Marks MJ, Collins AC (1996) Inbred mouse strains vary in oral self-selection of nicotine. *Psychopharmacology* 124:332–339. <https://doi.org/10.1007/BF02247438>
- Rodier PM (1994) Vulnerable periods and processes during central nervous system development. *Environ Health Perspect* 102(2):121–124. <https://doi.org/10.1289/ehp.94102121>
- Rowell PP, Hurst HE, Marlowe C, Bennett DB (1983) Oral administration of nicotine: it's up take and distribution after chronic administration to mice. *J Pharmacol Methods* 9:249–261. [https://doi.org/10.1016/0160-5402\(83\)90064-5](https://doi.org/10.1016/0160-5402(83)90064-5)
- Rüdiger T, Bolz J (2008) Acetylcholine influences growth cone motility and morphology of developing thalamic axons. *Cell Adhes Migr* 2(1):30–37. <https://doi.org/10.4161/cam.2.1.5909>
- Schneider AS, Atluri P, Shen Q, Barnes W, Mah SJ, Stadfeldt D, Goderie SK, Temple S, Fleck MW (2002) Functional nicotinic acetylcholine receptor expression on stem and progenitor cells of the early embryonic nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 971:135–138. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04447.x>
- Slotkin T (2004) Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. *Toxicol Appl Pharmacol* 198(2):132–151. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2003.06.001>
- Slotkin TA, Orband-Miller L, Queen KL, Whitmore WL, Seidler FJ (1987) Effects of prenatal nicotine exposure on biochemical development of rat brain regions: maternal drug infusions via osmotic minipumps. *J Pharmacol Exp Ther* 240(2):602–611
- Slotkin TA, Lappi SE, McCook EC, Lorber BA, Seidler FJ (1995) Loss of neonatal hypoxia tolerance after prenatal nicotine exposure: implications for sudden infant death syndrome. *Brain Res Bull* 38(1):69–75. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(95\)00073-n](https://doi.org/10.1016/0361-9230(95)00073-n)
- Slotkin TA, Skavicus S, Card J, Levin ED, Seidler FJ (2015) Amelioration strategies fail to prevent tobacco smoke effects on neurodifferentiation: nicotinic receptor blockade, antioxidants, methyl donors. *Toxicology* 333:63–75. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.04.005>
- Sokolove PG, Bushell WN (1978) The chi square periodogram: its utility for analysis of circadian rhythms. *J Theor Biol* 72(1):131–160. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(78\)90022-X](https://doi.org/10.1016/0022-5193(78)90022-X)
- Stoker AK, Semenova S, Markou A (2008) Affective and somatic aspects of spontaneous and precipitated nicotine withdrawal in C57BL/6J and BALB/cByJ mice. *Neuropharmacology* 54(8):1223–1232. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.03.013>
- Stolerman IP, Fink R, Jarvik ME (1973) Acute and chronic tolerance to nicotine measured by activity in rats. *Psychopharmacology* 30:329–342. <https://doi.org/10.1007/BF00429192>
- Sunyer B, Patil S, Höger H, Lubec G (2007) Barnes maze, a useful task to assess spatial reference memory in the mice. *Protoc Exch*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.390>
- Torrão AS, Britto LRG (2002) Neurotransmitter regulation of neural development: acetylcholine and nicotinic receptors. *An Acad Bras Cienc* 74(3):453–461. <https://doi.org/10.1590/s0001-37652002000300008>
- Trauth JA, Seidler FJ, Slotkin TA (2000) An animal model of adolescent nicotine exposure: effects on gene expression and macromolecular constituents in rat brain regions. *Brain Res* 867(1–2):29–39. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02208-3](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02208-3)
- Travnickova-Bendova Z, Cermakian N, Reppert SM, Sassone-Corsi P (2002) Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(11):7728–7733. <https://doi.org/10.1073/pnas.102075599>
- Waterhouse JM, Minors DS, Akerstedt T, Reilly T, Atkinson G (2000) Rhythms of human performance. In: Takahashi JS, Turek FW, Moore RY (Eds) *Handbook of behavioral neurobiology. Circadian clocks* 12:571–94
- Wee BE, Anderson KD, Kouchis NS, Turek FW (1992) Administration of carbachol into the lateral ventricle and suprachiasmatic nucleus (SCN) produces dose-dependent phase shifts in the circadian

- rhythm of locomotor activity. *Neurosci Lett* 137(2):211–215. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90406-W](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90406-W)
- Welsh DK, Takahashi JS, Kay SA (2010) Suprachiasmatic nucleus: cell autonomy and network properties. *Annu Rev Physiol* 72:551–577. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135919>
- Wickstrom R (2007) Effects of Nicotine during pregnancy: human and experimental Evidence. *Curr Neuropharmacol* 5(3):213–222. <https://doi.org/10.2174/157015907781695955>
- Zhang Y, Zee PC, Kirby JD, Takahashi JS, Turek FW (1993) A cholinergic antagonist, mecamylamine, blocks light-induced fos immunoreactivity in specific regions of the hamster suprachiasmatic nucleus. *Brain Res* 615(1):107–112. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)91120-H](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)91120-H)
- Zuther P, Lemmer B (2005) Chronos-Fit 1.05 <https://www.ma.uni-heidelberg.de/inst/phar/lehre/chronos.html>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.