



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

**Efectos de la administración perinatal de nicotina sobre
la expresión de PER1 y BMAL1 en el área CA1 y el
giro dentado en el hipocampo del ratón**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN NEUROCIENCIAS**

PRESENTA:

DANIEL LOMBARDI MARTÍNEZ

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. PILAR DURÁN HERNÁNDEZ

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.
2023**

Facultad de Medicina





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Este proyecto de tesis se realizó en el Laboratorio de Biología Animal Experimental (LBAE) de la Facultad de Ciencias-UNAM en Ciudad Universitaria, bajo la tutela de la Dra. Pilar Durán Hernández en la licenciatura en Neurociencias de la UNAM. El proyecto fue financiado por los recursos otorgados al LBAE-FC 2021-2023 y los apoyos PAPIIT-IA207419 y IA207521.

Agradecimientos

Institucionales y académicos

Agradezco primero que nada a la Universidad Nacional Autónoma de México por todos los años que me ha acogido como alumno desde que ingresé a la Escuela Nacional Preparatoria 9, Pedro de Alba, pasando brevemente por la Facultad de Estudios Superiores Aragón y culminando en la Licenciatura en Neurociencias de la Facultad de Medicina.

A la Dra. Pilar Durán Hernández, por la dedicación, la guía y el apoyo brindado durante el proceso de mi formación como futuro investigador, así como la oportunidad de iniciarme en el área que más me interesa de las Neurociencias.

Al grupo de Neurobiología del desarrollo y Bioseñales, liderado por la Dr. Pilar Durán en el laboratorio de biología animal experimental de la Facultad de Ciencias de la UNAM, por el espacio, los apoyos y los recursos.

A mis sinodales, el Dr. Raúl Aguilar Roblero, el Dr. César Casasola Castro, la Dra. Ma. de la Luz Navarro Angulo y la Dra. Claudia Gómez Acevedo, por los comentarios y la retroalimentación que permitieron generar un trabajo adecuado y digno de la máxima casa de estudios.

Al Dr. Martín Alejandro Fuentes Cano por el apoyo técnico, entrenamiento y sobre todo la disposición de tiempo y dedicación para lograr la conclusión de este proyecto.

A la Bióloga Dulce Jocelyn Bustamante Valdez por su apoyo en el análisis de datos y las observaciones para el desarrollo de tesis.

Al Dr. Alonso Martínez Canabal y a la M. en C. Sofía Grecia López Oropeza, por la instrucción en la manipulación de animales e inmunohistoquímica, así como los consejos y observaciones brindados durante el desarrollo de mi tesis.

A la Lic. en Neurociencias Ángela Renata Jiménez Pérez por su apoyo y su experiencia en procesamiento y análisis digital.

Personales

Agradezco a mi familia, por el apoyo que me brinda en mi día a día y por toda la felicidad que me ha proporcionado a lo largo de mi vida. Con especial énfasis en mi madre, Matilde, por ser la persona más bonita y considerada que conozco.

Agradezco a la segunda generación de la Licenciatura en Neurociencias, por ser un grupo que se apoyó incondicionalmente durante toda la carrera, y porque cada uno de mis compañeros siempre tenía algo interesante para platicar. Es el mejor salón en el que he estado.

A los Fullmetal Neuronites, Ángel, Ozmar, Alan y Chema, que fueron con quienes inicié y sufrí la licenciatura. No habría podido con los primeros semestres de no ser por ellos.

A los Adictos a Cristo, Diana, Andrea, Bernardo, José, Lashmi y Marino, por brindarme incontables momentos de diversión y algunos de los mejores viajes que he vivido.

Agradezco al Laboratorio de Biología Animal Experimental, no solo por la formación académica, sino por las amistades que encontré durante la misma.

A Martín, Dulce, Eve, Karli, Angy, Diana, Ana, Javi, Faty, Santi, Jime, Grecia y Amanda, con quienes pude preparar soluciones dentro y fuera del laboratorio.

Índice

Abreviaturas	6
Resumen	7
Abstract	8
Introducción	9
Desarrollo del sistema nervioso central en mamíferos.....	9
Periodos críticos en el desarrollo del cerebro.....	11
Sistema colinérgico.....	12
Ritmos circadianos.....	14
Ritmos circadianos intracelulares.....	17
Oscilación temporal diferencial del reloj molecular.....	19
Efectos de la nicotina sobre el sistema nervioso central.....	20
Efectos de la nicotina sobre el desarrollo del sistema nervioso.....	20
Hipocampo.....	21
Hipocampo y reloj circadiano.....	23
Hipocampo y sistema colinérgico.....	24
Hipocampo y nicotina.....	25
Justificación	26
Hipótesis	27
Objetivos generales	27
Objetivos específicos	27
Materiales y métodos	28
Animales.....	28
Formación de subgrupos.....	29
Obtención y seccionamiento de muestras.....	29
Inmunohistoquímica.....	30
Tinción.....	31
Adquisición de imágenes.....	32
Densidad y volumen celular.....	32
Densidad óptica.....	33
Análisis estadístico.....	33
Resultados	34
Expresión de BMAL1 y PER1.....	34
Giro dentado.....	35
Área CA1.....	38
Morfometría celular.....	40
Discusión	43
Conclusiones	46
Referencias	47
Suplementario	58
Bibliografía	59

Abreviaturas

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
BMAL1	Basic Helix-Loop-Helix ARNT Like 1
BSA	Albúmina de suero bovino
CA1	Cornu Ammonis 1
CA2	Cornu Ammonis 2
CA3	Cornu Ammonis 3
Ctl	Control
DO	Densidad óptica
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
GD	Giro dentado
JPG	Joint Photographic Experts Group
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
nAChRs	Receptores nicotínicos de acetilcolina
Nic	Nicotina
NSQ	Núcleo supraquiasmático
PER1	Period circadian protein homolog 1
SNC	Sistema nervioso central
ZT	Zeitgeber Time
α Bgtx-nAChRs	Receptores nicotínicos de acetilcolina afines a α -Bungarotoxina

Resumen

El desarrollo del sistema nervioso central es un proceso que puede ser fácilmente alterado debido a la acción de agonistas exógenos sobre distintos tipos de receptores a lo largo de ventanas temporales críticas. El consumo de nicotina durante el periodo de gestación perturba el neurodesarrollo de la descendencia gracias a la activación de receptores nicotínicos de acetilcolina distribuidos en la gran mayoría de las áreas cerebrales. Uno de los sistemas que podrían ser afectados es el reloj molecular, encargado de mantener un ritmo circadiano, de aproximadamente 24 horas, en las células de prácticamente todos los tejidos de un individuo con la finalidad de asegurar la correcta sincronización y funcionamiento del organismo. En este proyecto se evalúan los efectos de la administración perinatal de nicotina sobre la expresión de las proteínas del reloj biológico PER1 y BMAL1 a lo largo de un ciclo circadiano en el área CA1 y el giro dentado del hipocampo del ratón adulto. Los resultados muestran que el ritmo de expresión de dichas proteínas se altera a lo largo del día por la exposición a nicotina durante el desarrollo. Asimismo, se evaluaron cambios en la morfometría de las áreas analizadas, y se encontró que la exposición a nicotina en etapas perinatales aumenta la densidad celular en el área CA1 y el giro dentado del hipocampo en el ratón adulto.

Palabras clave: Periodos críticos, nicotina, reloj molecular, CA1 y giro dentado.

Abstract

The development of the central nervous system can be easily altered by the action of receptor exogenous agonists at the moment of critical stages. The use of nicotine during gestation periods disrupts the offspring's physiological brain development due to the activation of nicotinic acetylcholine receptors distributed throughout the entire nervous system. One of the possible targets for this disruption is the molecular clock, in charge of maintaining a circadian rhythm for cells in practically all tissues of an individual, which ensures the correct synchronization and wellbeing of the organism. In this project we evaluate the effects of nicotine perinatal administration on the expression of the biological clock proteins PER1 and BMAL1 over 24 hours in the CA1 region and the dentate gyrus of the hippocampus. The results show an alteration in the temporal distribution of the expression for both proteins due to nicotine exposure during development. In addition, we assess morphology changes in the same areas, after which we found that nicotine exposure during perinatal stages increases cell density in the CA1 region and the dentate gyrus of the hippocampus.

Key words: Critical periods, nicotine, molecular clock, CA1 region and dentate gyrus.

Introducción

Desarrollo del sistema nervioso central en mamíferos

El desarrollo del sistema nervioso central (SNC) en mamíferos desempeña un papel fundamental en la formación de las capacidades cognitivas y el comportamiento de estos animales. A lo largo de diversos procesos celulares y moleculares, se lleva a cabo la construcción de este sistema de una manera regular y coordinada bajo condiciones fisiológicas. Desde la etapa de fertilización, los cigotos experimentan una serie de divisiones celulares que conducen a la formación de un blastocisto. Posteriormente, el blastocisto se divide en tres capas germinales: el endodermo, el mesodermo y el ectodermo. Es precisamente esta última capa germinal, el ectodermo, la que da origen al tubo neural, a partir del cual se forma el SNC gracias a señales activadas por moléculas que regulan la expresión temporal y espacial de genes en las células ectodérmicas. Las células del tubo neural comienzan a dividirse repetidamente durante el desarrollo embrionario temprano, dando origen a dos tipos distintos de células; los neuroblastos y los precursores de células gliales. El periodo de proliferación varía entre los diferentes tipos celulares y cada población distribuida en el cerebro sigue un patrón propio para finalizar su ciclo de división.

El desarrollo del SNC en mamíferos implica una secuencia compleja de eventos celulares y moleculares que culminan en la formación de redes neuronales funcionales. Una vez completado el ciclo mitótico celular, las células inician un proceso de migración guiada por la glía radial hacia sus ubicaciones finales. Esta migración es crucial para establecer una organización cerebral adecuada, ya que la

mayoría de los neuroblastos no permanecen en el lugar donde se formaron. Para lograr una migración exitosa, se requieren procesos de señalización molecular. La migración de las células hacia su destino final marca el comienzo del proceso de diferenciación y crecimiento dendrítico. Estos procesos promueven la formación de sinapsis y la creación de redes neuronales mediante la comunicación entre células (Delhay-Bouchaud, 2001). La formación de sinapsis marca el final de una serie de etapas constructivas, como la multiplicación, la migración y la diferenciación, que son momentos cruciales en el desarrollo del cerebro (Figura 1).

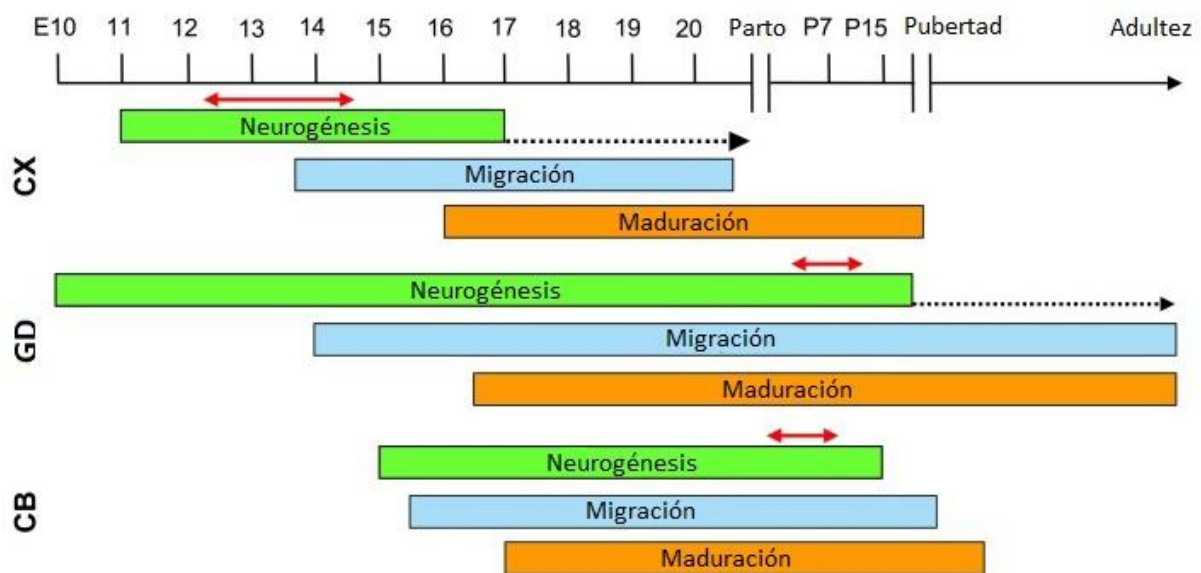


Figura 1. Representación esquemática de los principales eventos del desarrollo del cerebro en ratones. Las líneas punteadas representan una reducción en el ritmo de la neurogénesis. Las flechas rojas indican el periodo de máxima neurogénesis en distintas áreas del cerebro. CB: cerebelo; GD: giro dentado; CX: neocorteza. Modificado de Stagni et al., 2015.

Sin embargo, además de la formación de conexiones neuronales, es necesario afinar y refinar las redes neuronales. Esto se logra a través de procesos

como la muerte neuronal programada y la poda sináptica, donde las ramificaciones poco utilizadas de los axones se eliminan mediante competición (Hua y Smith, 2004). Estos mecanismos de refinamiento permiten optimizar las conexiones cerebrales y mejorar la eficiencia del sistema nervioso. El entendimiento de estos procesos es fundamental para comprender la organización cerebral y cómo influye en las capacidades cognitivas y el comportamiento de los mamíferos.

Periodos críticos en el desarrollo del cerebro

Los periodos sensibles son etapas en las que el efecto de una cierta experiencia en el cerebro es inusualmente potente durante un periodo limitado en el desarrollo. Los periodos críticos son un tipo especial de periodo sensible que resultan en cambios irreversibles de la función cerebral (Knudsen, 2004). Durante estos periodos críticos, existen ventanas de tiempo en las que los circuitos cerebrales subyacentes a una función específica son particularmente receptivos para adquirir ciertos tipos de información o estímulos, lo que contribuye o interfiere con el desarrollo normal del cerebro.

No todas las regiones cerebrales se desarrollan al mismo tiempo, sino que siguen un ritmo y duración de periodos críticos a través de los diferentes sistemas. Además, cada área cerebral se rige por diversos niveles jerárquicos de procesamiento, lo que implica que el periodo crítico de una etapa no puede comenzar hasta que finalicen las señales o entradas de una etapa previa (Hensch, 2004). Durante los periodos críticos, los estímulos que intervienen pueden ser tanto extrínsecos como intrínsecos. Los estímulos extrínsecos pueden incluir el lenguaje

que se escucha durante la infancia, mientras que los estímulos intrínsecos pueden ser hormonas o neuromoduladores generados por el propio organismo. Estas moléculas, como la acetilcolina (ACh), influyen en diferentes etapas del desarrollo, desde la proliferación y diferenciación celular, hasta la neurogénesis, gliogénesis, maduración y supervivencia de las células (Dehorter, 2020; Abreu-Villaça et al., 2011). Es importante tener en cuenta que si los estímulos se presentan de manera anormal o se omiten por completo, el desarrollo de los circuitos neuronales puede verse afectado negativamente y de forma definitiva (Hensch, 2005).

Por tanto, los periodos críticos del desarrollo son etapas en las que los circuitos cerebrales son especialmente receptivos a la adquisición de información y estímulos específicos. Durante estos periodos, tanto los estímulos extrínsecos como los intrínsecos desempeñan un papel fundamental en la formación y desarrollo adecuado del cerebro.

Sistema colinérgico

El sistema colinérgico es una red de neuronas distribuidas en todo el SNC, abarcando desde el tallo cerebral hasta áreas como el hipocampo, el estriado y la neocorteza. Estas neuronas se caracterizan por expresar enzimas, transportadores y receptores que interactúan con la ACh, un neurotransmisor sintetizado a partir de colina y acetil coenzima A mediante la acción de la colina acetiltransferasa (Gotti y Clementi, 2004; Abreu-Villaça et al., 2011). Una vez liberada de las vesículas hacia el espacio sináptico, la acetilcolina se une a receptores muscarínicos de acetilcolina o a receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs). Estos receptores están expresados diferencialmente en todo el SNC y desempeñan un papel crucial en la

modulación de la proliferación de células, la diferenciación neuronal, la regulación de la expresión de genes y la formación de sinapsis (Abreu-Villaça et al., 2011).

Los nAChRs pertenecen al grupo de canales de iones catiónicos activados por ligando. Existen al menos 12 genes que codifican las diferentes subunidades que conforman los nAChRs, incluyendo nueve subunidades alfa ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) y tres subunidades beta ($\beta 2$ - $\beta 4$). Cada subunidad está compuesta por cuatro dominios transmembranales hidrofóbicos, un bucle intracelular, un extremo amino-terminal y un fragmento C-terminal extracelular (Figura 2). Las diferentes configuraciones de subunidades en los nAChRs determinan las propiedades fisiológicas y farmacológicas de cada receptor, lo que lleva a la clasificación de los nAChRs en función de su afinidad con la α -Bungarotoxina o la falta de afinidad hacia la misma. A su vez, los nAChRs afines a la α -Bungarotoxina (α Bgtx-nAChRs) pueden ser homoméricos, formados por homopentámeros de subunidades $\alpha 7$ - $\alpha 9$, o heteroméricos, formados por heteropentámeros de subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 9$ o $\alpha 10$ (Gotti y Clementi, 2004).

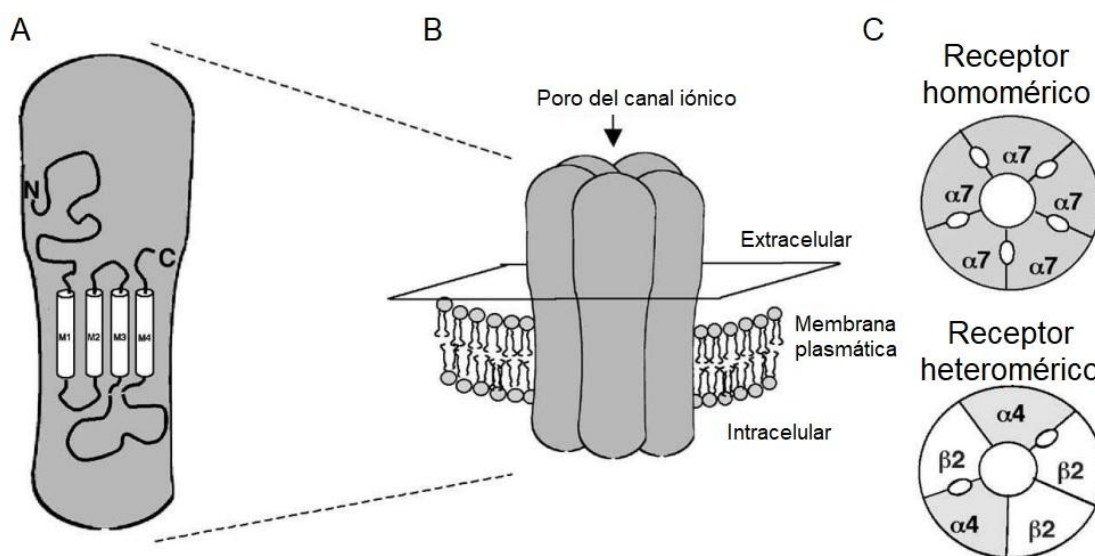


Figura 2. Estructura de los nAChRs. Modificado de Gotti y Clementi, 2004.

Cuando la acetilcolina se une a los nAChRs, se produce una apertura de los canales iónicos. Esta apertura permite la entrada de iones de sodio (Na^+) y, en algunos casos, iones de calcio (Ca^{2+}) a la célula. La entrada de estos iones provoca una despolarización de la membrana celular, generando un potencial de acción y permitiendo la transmisión de señales eléctricas en las células excitables, como las neuronas y las células musculares (Gotti y Clementi, 2004). Además de la despolarización de la membrana, la activación de los nAChRs también desencadena vías de señalización intracelular. Por ejemplo, la entrada de calcio a través de los nAChRs puede activar enzimas y proteínas intracelulares, como la proteína quinasa C (PKC), la fosfolipasa C (PLC) y la proteína quinasa dependiente de calcio-calmodulina (CaMK). Estas enzimas y proteínas, a su vez, pueden regular la expresión génica, la función celular y otros procesos intracelulares (Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004).

Ritmos circadianos

A lo largo de la vida de los organismos, incluidos los mamíferos, se producen cambios fisiológicos y conductuales en respuesta a variaciones en el entorno. Estos cambios ambientales promueven la sincronización temporal interna de los seres vivos, permitiéndoles interactuar de manera adecuada con su entorno. Esta sincronización entre el organismo y su entorno está coordinada por un "reloj biológico" que anticipa las necesidades individuales. Cualquier alteración en este reloj puede tener consecuencias negativas para el bienestar y la supervivencia del organismo (Isomura y Kageyama, 2014).

La cronobiología, una rama de la ciencia que estudia los ritmos biológicos y sus efectos en los seres vivos, describe diferentes ciclos que regulan procesos específicos dependiendo del organismo. Por ejemplo, existen ritmos ultradianos, que se producen en intervalos iguales o inferiores a 20 horas, como la liberación pulsátil de hormonas a lo largo del día, la actividad de las cinasas fosforiladas o la frecuencia cardíaca (Isomura y Kageyama, 2014). También existen ritmos infradianos, que tienen una duración mayor a 24 horas, como el ciclo menstrual o los ciclos reproductivos en ciertas especies (Gachon et al., 2004). Por último, están los ritmos circadianos, que tienen una duración cercana a las 24 horas.

Los ritmos circadianos continúan sucediendo incluso en ausencia de señales ambientales que marquen el paso de 24 horas. Este fenómeno, conocido como "free running", significa que el ritmo no está sincronizado por cambios recurrentes en el entorno físico, sino por el reloj biológico interno. Sin embargo, los ritmos circadianos están principalmente influenciados por los ciclos de luz y oscuridad que resultan del movimiento de rotación de la Tierra, lo que ayuda a mantener la precisión de las diferentes fases de estos ritmos (Vitaterna et al., 2001).

En el estudio de los ritmos circadianos, se cuantifican las variaciones en los niveles de una variable específica a lo largo del tiempo, como se muestra en la figura 3. También se utiliza un Zeitgeber, que es una señal externa capaz de sincronizar la oscilación endógena. El ciclo de luz y oscuridad es el principal Zeitgeber de los organismos. Se utilizan unidades de tiempo basadas en el periodo del Zeitgeber, conocidas como Tiempo de Zeitgeber (ZT). En un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas cada uno, ZT0 representa el momento en que se encienden las luces y ZT12 representa el momento en que se apagan las luces (Karatsoreos y Silver, 2017).

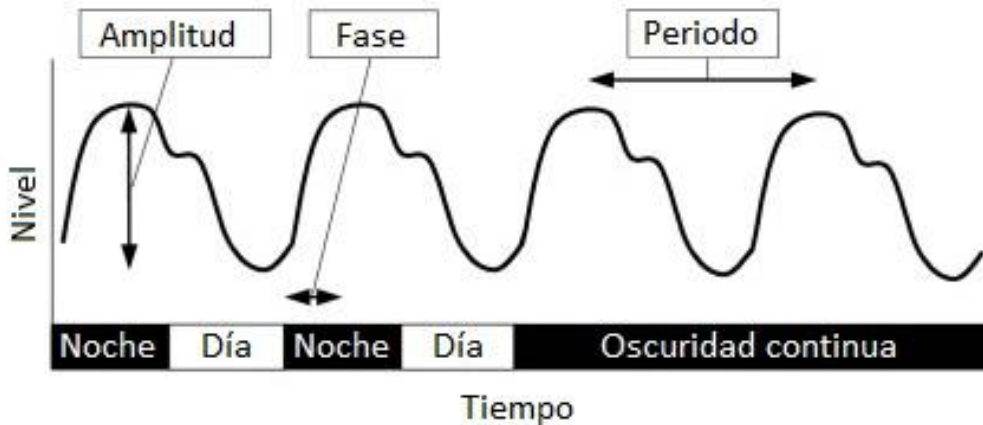


Figura 3. Representación de un ritmo circadiano. Los niveles de una variable cambian de acuerdo al momento del día. Las variaciones persisten incluso cuando el organismo se encuentra sujeto a oscuridad continua. Modificado de Vitaterna et al., 2001.

El núcleo supraquiasmático (NSQ) es el principal generador de ritmos circadianos en mamíferos. Se encuentra ubicado en el hipotálamo anteroventral, justo por encima del quiasma óptico y a los lados del tercer ventrículo. El NSQ desempeña un papel crucial en la regulación de los ritmos circadianos del organismo. El NSQ recibe información fótica directa de la retina a través del tracto retino-hipotalámico. Este proceso se lleva a cabo mediante células ganglionares retinales intrínsecamente fotorreceptoras, las cuales son sensibles a la luz y transmiten señales al NSQ. Esta entrada de información luminosa permite que el NSQ se sincronice con los ciclos ambientales de luz y oscuridad, ajustando así los ritmos circadianos del organismo (Mohawk et al., 2012).

Es importante destacar que las neuronas del NSQ tienen la capacidad de generar potenciales de acción de manera circadiana, independientemente de la presencia de un fotoperiodo regular. Esto significa que estas neuronas mantienen un ritmo endógeno que les permite seguir generando ritmos circadianos incluso en ausencia de señales externas de luz (Welsh et al., 2010). Además, el NSQ envía

proyecciones eferentes a otras áreas cerebrales, como el tálamo e hipotálamo, así como a tejidos periféricos, a través de hormonas y conexiones neurales autonómicas, lo que contribuye a la sincronización de los ritmos circadianos en todo el organismo. El NSQ desempeña un papel central en la generación y regulación de los ritmos circadianos, tanto mediante la recepción de señales de luz a través del tracto retino-hipotalámico como a través de su capacidad intrínseca para generar ritmos endógenos.

Ritmos circadianos intracelulares

Al ser un tejido, el NSQ produce una señal circadiana más precisa que la generada por células individuales (Herzog et al., 2004), y a su vez tolera de manera más eficaz las interrupciones rítmicas causadas por perturbaciones genéticas gracias a interacciones de acoplamiento entre neuronas (Liu et al., 2007). No obstante, los mecanismos moleculares desempeñan una tarea de igual importancia en el funcionamiento rítmico de los seres vivos. A nivel intracelular, los ritmos circadianos son controlados por un conjunto de osciladores moleculares que operan en las células individuales. Estos osciladores moleculares consisten en un conjunto de genes y proteínas reguladoras que interactúan en un bucle de retroalimentación negativa (Mohawk et al., 2012). Dos de los genes más destacados en el reloj molecular de los mamíferos son *Bmal1* y *Per1*. La transcripción de *Bmal1* permite que la proteína BMAL1 actúe junto con CLOCK formando un heterodímero (BMAL1-CLOCK) que funge como factor de transcripción de *Per1* y *Cry1*, cuyos productos conforman un complejo represor (PER-CRY) que consecuentemente impide su propia producción por medio de una translocación hacia el núcleo que le

permite inhibir la actividad de BMAL1-CLOCK (Figura 4). La regulación de estos genes y proteínas se produce en un patrón cíclico a lo largo del día, lo que da lugar a la generación de ritmos circadianos intracelulares (Harbour et al., 2014; Partch et al., 2014). Estos ritmos se sincronizan y coordinan entre células y tejidos a través de señales de sincronización, como la luz y los neurotransmisores, por lo que los ritmos circadianos intracelulares son de vital importancia para la homeostasis y la función fisiológica adecuada. Disrupciones en estos ritmos, ya sea por cambios en el ambiente o por alteraciones genéticas, se han asociado con una amplia gama de trastornos, como trastornos del sueño, trastornos metabólicos y trastornos del estado de ánimo (Bass y Takahashi, 2010)

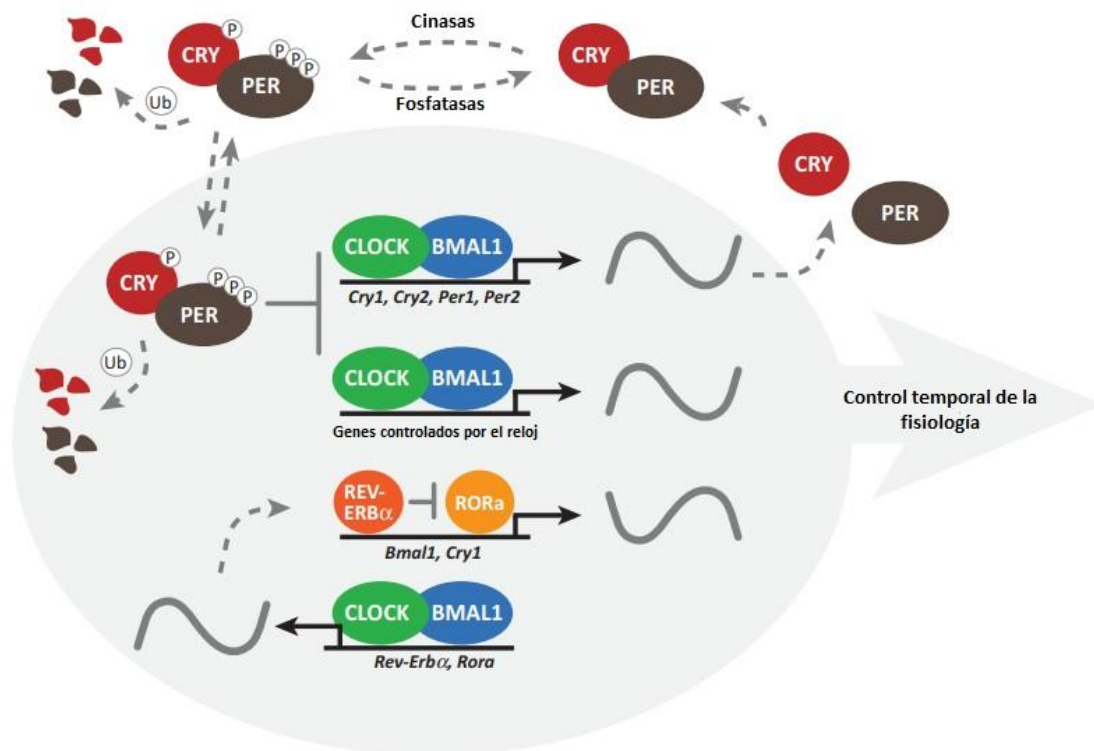


Figura 4. Control temporal intracelular. Modificado de Partch et al., 2014.

Oscilación temporal diferencial del reloj molecular

En un estudio realizado por Harbour et al. (2014), se observó que en el giro dentado del hipocampo los picos de niveles de ARN mensajero (mRNA) de *bmal1* y *per2* ocurren en los ZT2.5 y ZT16.5, respectivamente. En cambio, en el NSQ y el núcleo central de la amígdala, los picos de expresión de mRNA de *bmal1* y *per2* se presentan en los ZT17.5 y ZT9.5, y en los ZT18 y ZT9, respectivamente. Es importante destacar que la expresión de la proteína puede presentar un retraso respecto al pico de mRNA, lo que indica que la traducción y estabilización de los transcritos pueden llevar algún tiempo y variar de acuerdo a la zona que se observa. Sin embargo, estos y otros resultados demuestran claramente que la expresión de genes, y su posterior traducción a proteínas del reloj molecular, presenta fases de oscilación distintas a través de los diferentes tejidos y áreas del organismo en roedores (Yan y Okamura, 2002; Koike et al., 2012). Estas diferencias en las fases de oscilación de las proteínas del reloj entre tejidos y áreas del organismo son una característica importante de los ritmos circadianos. Indican que cada tejido y área puede tener una función específica en relación con los ritmos circadianos y que la coordinación precisa de estos ritmos requiere una interacción y comunicación entre los diferentes relojes circadianos presentes en los distintos tejidos del organismo.

Efectos de la nicotina sobre el sistema nervioso central

La nicotina es un alcaloide y compuesto activo principal de la planta de tabaco. Es capaz de estimular al SNC fungiendo como agonista sobre los distintos tipos de nAChRs, desencadenando la liberación de neurotransmisores y dando como resultado la vasoconstricción periférica, taquicardia y presión sanguínea elevada, así como la activación del circuito de recompensa, motivo por el cual se le considera una sustancia de abuso debido a la facilidad con la que inicia el proceso de adicción (National Center for Biotechnology Information, 2022). La administración crónica de nicotina promueve cambios a nivel del SNC, desde el reforzamiento de sinapsis glutamatérgicas hasta la alteración de procesos epigenéticos (Wittenberg et al., 2020). De igual manera, suscita la regulación en la cantidad de nAChRs como respuesta a la persistencia del alcaloide en el espacio sináptico, ya que, a diferencia de la acetilcolina, no puede ser hidrolizado por la acetilcolinesterasa (AChE) (Besson et al., 2007; Henderson y Lester, 2015).

Efectos de la nicotina sobre el desarrollo del sistema nervioso

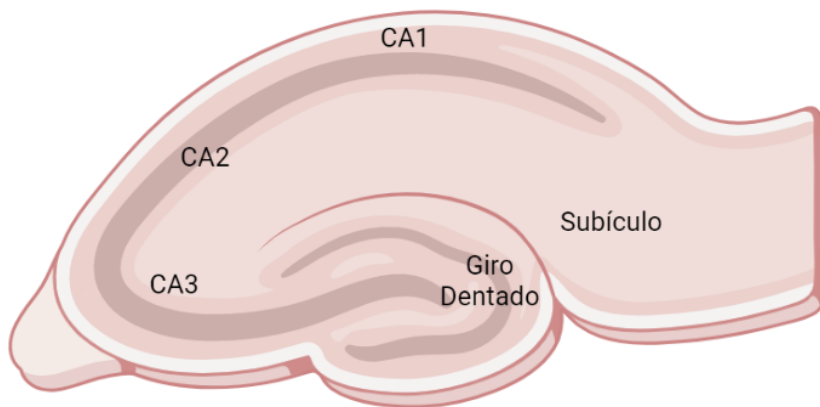
Durante el desarrollo del sistema nervioso, se han observado efectos adversos de la nicotina en el SNC. La exposición crónica a la nicotina durante el periodo de gestación en roedores ha sido asociada con alteraciones en el desarrollo cerebral y problemas cognitivos. Estos efectos se atribuyen a la interferencia de la nicotina en la modulación normal de la acetilcolina a través de los nAChRs durante momentos críticos del desarrollo. Investigaciones han demostrado que la exposición prenatal a

la nicotina puede resultar en déficits en la memoria y el aprendizaje, así como un aumento en la actividad locomotriz y una reducción del peso de las crías. Estos efectos negativos se han observado en estudios donde se administraron dosis altas de nicotina durante la gestación de roedores (Huang et al., 2006; Wickström, 2007). Además, se ha encontrado que la aplicación de nicotina en etapas tempranas del desarrollo puede provocar daño celular, reducción en el tamaño de las células, cambios en la morfología del cerebro y alteraciones en la liberación de neurotransmisores (Slotkin et al., 1987; Roy et al., 2002; Xu et al., 2001). Estos hallazgos resaltan la importancia de evitar la exposición a la nicotina en etapas perinatales, ya que puede tener consecuencias negativas en el desarrollo adecuado del sistema nervioso.

Hipocampo

El hipocampo es una estructura cerebral crucial en la investigación de las bases neurológicas de la memoria. Es especialmente conocido por su papel en la codificación y formación de la memoria. Se encarga de la memoria declarativa, que incluye la memoria semántica y la memoria episódica, y desempeña un papel vital en el procesamiento de la memoria espacial. Utiliza células especializadas para formar mapas mentales y recordar ubicaciones específicas en su entorno. Además, contribuye al aprendizaje asociativo, permitiendo que los ratones hagan conexiones entre estímulos y eventos para ajustar su comportamiento en función de las asociaciones aprendidas (Igarashi et al, 2014; Zemla y Basu, 2017). El hipocampo es una región relativamente grande ubicada debajo de la neocorteza y está dividido en diferentes subregiones, como el Cornu Ammonis 1, 2 y 3 (CA1, CA2, CA3,

respectivamente), el giro dentado y el subículo (Figura 5). Las principales células que se encuentran en el hipocampo son las neuronas piramidales y las células granulares. Estas células se comunican entre sí a través de las diferentes subáreas del hipocampo, formando un circuito sináptico complejo. Es esta conectividad entre las áreas del hipocampo y con otras regiones cerebrales lo que permite la formación de la memoria episódica al integrar información sensorial, espacial y temporal (Knierim, 2015; Zemla y Basu, 2017).



Created in BioRender.com bio

Figura 5. Estructura general del hipocampo de los roedores. Creado en biorender.com.

El circuito tri sináptico del hipocampo desempeña un papel esencial en la formación de la memoria. La información ingresa al hipocampo a través del giro dentado, donde las células granulares reciben señales sensoriales y las transmiten a las células piramidales del CA3. Las células piramidales del CA3, a su vez, envían proyecciones sinápticas a las células piramidales del CA1, donde se integra la información y se envía a otras áreas cerebrales para su almacenamiento a largo plazo. Este proceso de comunicación entre las subáreas del hipocampo es

fundamental para la consolidación y recuperación de la memoria (Knierim, 2015; Zemla y Basu, 2017).

Por tanto, el hipocampo es una estructura cerebral esencial para la formación de la memoria. Su compleja organización y conectividad entre las diferentes subáreas permiten la integración de información sensorial, espacial y temporal, lo que contribuye a la formación de la memoria episódica.

Hipocampo y reloj circadiano

Al igual que el NSQ y otros tejidos, las células del hipocampo también expresan proteínas del reloj circadiano que ayudan a regular los ritmos a lo largo de un periodo de 24 horas. Como se mencionó anteriormente, los genes reloj muestran variaciones en su expresión a lo largo del día en diferentes partes del organismo, incluyendo el hipocampo (Yan y Okamura, 2002; Koike et al., 2012). Esta variación temporal en la expresión de las proteínas del reloj circadiano en el hipocampo está relacionada con el procesamiento de la memoria (Jilg et al., 2009; Rawashdeh et al., 2014). La evidencia demuestra que la delección de genes del reloj circadiano en el hipocampo resulta en un deterioro en las tareas cognitivas que dependen de esta estructura (Jilg et al., 2009; Wardlaw et al., 2014). Además, la administración de agonistas exógenos a distintos tipos de receptores puede afectar la expresión adecuada de los genes del reloj circadiano molecular tanto en el hipocampo (Gilhooley et al., 2011; Moriya et al., 2014) como en órganos fuera del sistema nervioso central (Khan et al., 2019). Estos hallazgos resaltan la importancia de un funcionamiento adecuado del reloj molecular en los procesos del hipocampo y su susceptibilidad a la influencia de agentes externos. La alteración en la función de los

genes reloj, ya sea por su delección o por la administración de sustancias exógenas, puede afectar negativamente las funciones cognitivas dependientes del hipocampo.

Hipocampo y sistema colinérgico

El hipocampo contiene una abundante cantidad de nAChRs $\alpha 7$, así como diferentes tipos de nAChRs heteropentaméricos, lo que permite la liberación de neurotransmisores como el glutamato o el ácido γ -aminobutírico (GABA). Estudios en roedores sugieren que la ACh y los nAChRs desempeñan un papel fundamental en la plasticidad sináptica y la formación de la memoria en el hipocampo. En el giro dentado, una subregión del hipocampo, la ACh promueve el incremento de la potenciación a largo plazo a través de la activación de los nAChRs, lo cual está relacionado con la plasticidad sináptica y la consolidación de la memoria (Haam y Yakel, 2017). Asimismo, se ha observado que los niveles de marcadores de ACh se elevan durante tareas de memoria espacial, lo que respalda la importancia de la ACh en la función cognitiva (Park et al., 1992). Por otro lado, se ha encontrado que la disminución de los niveles de ACh está asociada con el declive cognitivo relacionado con el envejecimiento (Baxter et al., 1999). Además, se ha demostrado que el bloqueo de los nAChRs mediante antagonistas afecta negativamente la memoria episódica y espacial, que son procesos regulados principalmente por el hipocampo. De manera interesante, la eliminación selectiva de las neuronas colinérgicas que proyectan hacia la formación hipocampal conlleva una disminución significativa en la efectividad de la memoria dependiente del hipocampo (Haam y Yakel, 2017).

En resumen, el sistema colinérgico, a través de los nAChRs, desempeña un papel fundamental en el hipocampo, especialmente en la plasticidad sináptica y la

formación de la memoria. Los estudios realizados en roedores y las investigaciones sobre los niveles de ACh en humanos respaldan la importancia de este sistema en las funciones cognitivas asociadas con el hipocampo.

Hipocampo y nicotina

Estudios en ratones han demostrado que la administración continua de nicotina por vía oral en etapas de desarrollo conduce a deficiencias en tareas de memoria dependientes del hipocampo como la memoria espacial (Fuentes-Cano et al., 2020). De igual manera, se ha reportado que la administración subcutánea de nicotina en las primeras etapas de desarrollo tiene efectos negativos en la memoria espacial y la localización de objetos (Ankarberg et al., 2001; Nakauchi et al., 2014). Estos hallazgos sugieren que la administración de nicotina por medio de distintas vías en etapas tempranas puede interferir con el desarrollo normal de las funciones de memoria relacionadas con el hipocampo.

Además, se ha observado que la exposición a nicotina durante el periodo perinatal afecta la producción y actividad de la ACh en el hipocampo. Estudios en ratones cuyas madres fueron expuestas a nicotina muestran una disminución en los niveles de ACh, así como en la actividad de la AChE, encargada de degradar la ACh (Gavini et al., 2021). Asimismo, se ha encontrado una disminución en la expresión del mRNA del transportador de colina de alta afinidad, responsable de la captación de colina necesaria para la síntesis de ACh en el hipocampo (Gavini et al., 2021). Estos cambios a nivel molecular indican que la exposición a nicotina durante el desarrollo puede alterar el equilibrio de la ACh en el hipocampo, lo que podría tener consecuencias en el funcionamiento adecuado de esta región cerebral.

Investigaciones adicionales respaldan la idea de que la exposición a nicotina durante etapas perinatales produce alteraciones morfológicas, funcionales y conductuales asociadas al hipocampo. Estudios han demostrado que la exposición prenatal a nicotina resulta en cambios morfológicos en el hipocampo, como reducción del tamaño de las células y cambios en la morfología de las neuronas (Zeid et al., 2018). Además, se ha observado que la exposición perinatal a nicotina altera la liberación de neurotransmisores en el hipocampo, lo que podría tener implicaciones en el procesamiento de la información y la función cognitiva (Zeid et al., 2018).

En definitiva, la exposición a la nicotina durante el desarrollo temprano tiene efectos perjudiciales en el hipocampo. Estos efectos se reflejan en deficiencias en la memoria dependiente del hipocampo, alteraciones en los niveles de ACh y cambios morfológicos y funcionales en esta región cerebral.

Justificación

La nicotina administrada en periodos perinatales afecta estructuras y funciones del cerebro (Slotkin et al., 1987; Dwyer et al., 2008). Sin embargo, se desconoce el efecto que tiene el agonista sobre proteínas del reloj molecular en distintas zonas del hipocampo.

Por otro lado, existen discrepancias acerca de cómo interfiere el consumo de nicotina sobre la densidad celular del hipocampo de las ratas durante el desarrollo (Chen et al., 2006; Roy et al., 2002; Slotkin et al., 1987), pero aún se ignora la consecuencia del mismo postulado en ratones.

Hipótesis

Si la señalización colinérgica es importante en el establecimiento de ritmos circadianos del hipocampo, entonces la exposición perinatal a la nicotina generará alteraciones en la distribución temporal diaria de las proteínas BMAL1 y PER1 en el giro dentado y en el área CA1 del hipocampo de ratones.

Objetivos generales

Señalar las alteraciones provocadas por la exposición perinatal a nicotina sobre la ritmicidad diaria de las proteínas BMAL1 y PER1 en las regiones CA1 y GD del hipocampo de ratones, así como cambios en la morfología de estas regiones.

Objetivos específicos

- Por medio de inmunohistoquímica, determinar los niveles de expresión de las proteínas BMAL1 y PER1 en el giro dentado y el área CA1 del hipocampo a lo largo de 24 horas en un grupo de ratones control y un grupo de ratones con exposición perinatal a nicotina (3.0 mg/kg/día del G1 al PN 21) por medio de densidad óptica.
- Determinar si existen diferencias de morfología y en la densidad celular en el giro dentado y en el área CA1 del hipocampo entre el grupo control y el grupo de ratones expuestos perinatalmente a nicotina.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron ratones albinos de la cepa BALB/c criados por el experimentador en el bioterio de la Facultad de Ciencias. Para el grupo control, se colocaron dos hembras y un macho de dos meses de edad en cajas estándar de acrílico de 19x29x12, con agua y alimento ad libitum. Cada caja fue etiquetada con la fecha de cruce y se esperó hasta que las madres presentaron un aumento considerable de peso y signos de gestación para ser separadas de los machos en cajas estándar de acrílico individuales con material para la formación del nido, así como agua y alimento ad libitum. Las crías fueron destetadas a los 21 días posteriores al parto, colocando cinco por caja de acuerdo a su sexo. Se les proporcionó agua y alimento ad libitum, y fueron mantenidas en un ciclo de luz-oscuridad 12:12 con luz desde las 7:00 hrs (ZT0) hasta las 19:00 hrs (ZT12) y oscuridad desde las 19:00 hrs hasta las 7:00 hrs. El grupo experimental se obtuvo de la misma manera y recibió los mismos cuidados que el grupo control, salvo por la diferencia en que al grupo experimental se le administró una dosis continua de 3.0 mg/kg/día de nicotina diluida en el agua tomando en cuenta la cantidad consumo promedio de ratones adultos (5.8 ml) y el peso de las madres, comparable a protocolos similares (Fuentes-Cano et al., 2020; Nemoto et al., 2021; Huang et al., 2006; Schneider et al., 2010) durante los periodos de cruce (aproximadamente 3 días), gestación (entre 18 y 21 días) y lactancia (21 días post natales).

Formación de subgrupos

Una vez que los ratones cumplieron tres meses de edad, se seleccionaron únicamente a los machos con la finalidad de evitar efectos de la nicotina dependientes de sexo causados por los ciclos hormonales de las hembras o cambios estructurales relacionados a los dimorfismos sexuales en el cerebro (Cross et al., 2017). Se formaron dos grupos, el grupo control y el grupo experimental, de los cuales se formaron seis subgrupos por cada grupo con una n=5 cada subgrupo, obteniendo 12 subgrupos y una n=60 en total. Cada subgrupo homólogo fue asignado a un ZT distinto, iniciando a las 09:00 hrs (ZT2) y avanzando cada cuatro horas hasta llegar a las 5:00 hrs (ZT22). Es decir, se formaron subgrupos en los ZT2 (09:00 hrs), ZT6 (13:00 hrs), ZT10 (17:00 hrs), ZT14 (21:00 hrs), ZT18 (01:00 hrs) y ZT22 (05:00 hrs).

Obtención y seccionamiento de muestras

Los ratones fueron sacrificados a los 90 días de nacidos por medio de sobredosis anestésica durante cada ZT correspondiente. Se utilizó una dosis letal de pentobarbital sódico de 150 mg/kg por vía intraperitoneal con una jeringa de insulina. Al momento en que dejaron de presentar reflejos musculares, los animales fueron colocados en posición decúbito dorsal sobre una rejilla de metal y se realizó un corte en el abdomen para abrir la caja torácica con la finalidad de cortar el costillar y exponer el corazón. El órgano fue sujeto y perforado en el ventrículo izquierdo con una aguja desechable de 18Gx38 mm para entrar a la circulación arterial. Por medio

de una bomba de perfusión ajustada a una presión de 130 mmHg, se introdujeron 50 ml de solución salina al 0.9%. y, una vez comprobado que los tejidos estaban limpios, se cambió la configuración de la bomba para dispensar 50 ml de paraformaldehído al 4% y así fijar el tejido. Al finalizar, se decapitó a los ratones y se extrajeron sus cerebros. Posteriormente fueron guardados en paraformaldehído al 4% para su conservación de acuerdo a su grupo. Previo a los procesos de inmunohistoquímica, se utilizó un criostato configurado para hacer cortes de 40 μ m a una velocidad de avance 5 y oscilación 4. Se colectaron las secciones desde los -0.22 mm hasta los -1.82 mm de distancia con respecto del bregma, según marcado en el atlas de coordenadas estereotáxicas en ratón (Paxinos, 2001). Finalmente, los cortes fueron sumergidos en PBS y almacenados a temperatura ambiente por dos horas en cajas de cultivo.

Inmunohistoquímica

Por cada ZT se utilizaron cuatro pozos de caja de cultivo. Dos pozos fueron designados para el grupo control y dos para el grupo experimental. Se tomaron dos secciones de cada ratón por subgrupo y se distribuyeron en los pozos correspondientes, dando un total de cinco secciones por pozo y 20 secciones por ZT. Las secciones fueron lavadas en solución buffer de fosfato (PBS) tres veces durante 10 minutos cada lavado, para posteriormente ser lavadas con albúmina de suero bovino y polisorbato (BSA-Tween) al 5% durante una hora. Una vez terminados los lavados, las secciones fueron incubadas por un día dentro del pozo de la caja de cultivo con BSA-Tween 5% y el anticuerpo primario correspondiente. Cada tipo de anticuerpo primario fue incubado en un pozo de grupo control y en un pozo de grupo

experimental. Los anticuerpos primarios utilizados fueron PER1 (Novus biologicals NB300-564) y BMAL1 (Santa Cruz Biotechnology H-170-sc-48790), a una concentración de 1:500.

Al día siguiente se realizaron cinco lavados con PBS-Tween durante 10 minutos cada lavado. Se procedió a incubar las secciones en PBS-Tween con un anticuerpo secundario biotinilado (BA-1100 Vector) durante dos horas. Después se bloqueó la peroxidasa endógena con tres lavados de cinco minutos con PBS-Tween y peróxido de hidrógeno al 3%. Las secciones fueron lavadas de nuevo tres veces con PBS-Tween durante cinco minutos cada lavado. A continuación, los cortes fueron colocados en estreptavidina-peroxidasa durante 30 minutos.

Por último, los tejidos fueron revelados con una solución de sustrato de peroxidasa conteniendo 1.6 mililitros de agua destilada, 20 microlitros de tampón de sustrato 10x, 40 microlitros de cromógeno de diaminobencidina 50x y peróxido de hidrógeno al 1% en metanol durante 10 minutos.

Tinción

La solución de violeta de cresilo es utilizada para marcar la soma de células neuronales y el núcleo de células gliales (Pilati et al., 2008). Las secciones de los ratones control y experimentales fueron montadas en portaobjetos previamente gelatinizados hasta que se secaron completamente para después aplicar el violeta de cresilo durante cinco minutos. Las láminas fueron tratadas con un tren de alcoholes al 100%, 95%, 70% y 50%, durante cinco minutos por cada alcohol. Finalmente, fueron sumergidas en xilol al 100% y se les colocó una gota de medio de montaje sin agua a base de un polímero de acrilatos mixtos, conocido

comercialmente como Entellan (Sigma-Aldrich), y un cubreobjetos para su preservación.

Adquisición de imágenes

Cada corte fue fotografiado con un microscopio ZEISS PrimoStar3 y una cámara ZEISS Axiocam 208 color. Las imágenes fueron tomadas y transformadas a un formato JPG con el software ZEISS ZEN 3.3 (blue edition). Posteriormente, las fotografías se procesaron con el software de ImageJ (Abramoff et al., 2004) de acuerdo al análisis a realizar.

Densidad y volumen celular

Las fotografías para el conteo celular del área CA1 fueron capturadas haciendo uso de un objetivo 40x. Las imágenes fueron ajustadas en brillo y contraste para mejorar la visibilidad. Las células fueron contadas de manera manual en un área de con la herramienta Multi-point de ImageJ y sólo se tomaron en cuenta las células en las que la delimitación era claramente visible. Para determinar el volumen celular se utilizaron objetivos 4x y 10x en el giro dentado y el área CA1, respectivamente, y se delimitaron con la selección Freehand de ImageJ.

Densidad óptica

La técnica de la densidad óptica (DO) sirve para la medición cualitativa de la turbidez o la medición cuantitativa de la intensidad de la luz transmitida a través de una biomasa (Myers et al., 2013). La DO también puede ser utilizada para evaluar los niveles de expresión de una proteína por medio de un cromóforo, como fue hecho por Mufson et al. (1997). Para el presente proyecto se comparó el nivel de expresión de PER1 y BMAL1 en las regiones de interés y se le restó el ruido medido en zonas donde las proteínas no fueron expresadas.

Análisis estadístico

Todos los datos fueron sometidos a pruebas de normalidad y homocedasticidad para determinar las pruebas estadísticas adecuadas con GraphPad Prism 9. Se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis para determinar si existen diferencias significativas entre las medianas de los subgrupos de un solo grupo (control o experimental) y posteriormente se realizó una prueba de comparaciones múltiples de Dunn a modo de prueba post hoc. El análisis de las diferencias de expresión de PER1 y BMAL1 entre el grupo experimental y el grupo control por cada ZT individual fue realizado con una prueba U de Mann-Whitney. Además, se tomaron todos los datos de la fase de luz y todos los datos de la fase de oscuridad por separado como un conjunto cada uno, y se analizó el cambio en la expresión de la fase de luz a la fase de oscuridad de las proteínas PER1 y BMAL1 por medio de una prueba U de Mann-Whitney. Esta misma prueba fue utilizada para

analizar las diferencias de la densidad celular y el área en píxeles cuadrados entre el grupo control y el grupo experimental del GD y la región CA1 del hipocampo. Sin embargo, debido a la falta de muestras adecuadas, no se tomaron en cuenta los valores del ZT12 tanto de BMAL1 como de PER1 en los grupos control. Un valor $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo (*; ^; v).

Resultados

Expresión de BMAL1 y PER1

La expresión de proteínas del reloj molecular como PER1 y BMAL1 denotan cambios de manera intracelular a lo largo del día, como se muestra en la figura 6.

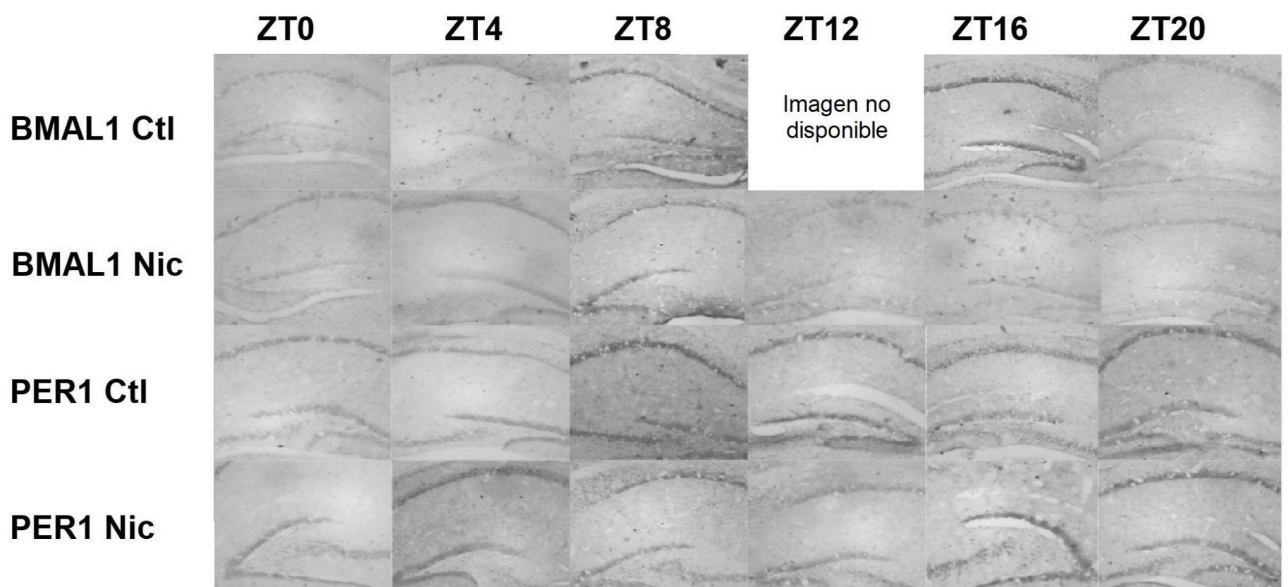


Figura 6. Expresión de PER1 y BMAL1. Imágenes representativas de cortes coronales obtenidos posterior a la inmunohistoquímica. Se muestra el cambio temporal por ZT en la expresión de las

proteínas del reloj del hipocampo para los grupos control y experimental. La imagen del ZT12 BMAL1 Ctl no se muestra debido a falta de muestras adecuadas. Ctl=control; Nic= nicotina.

Giro dentado

La oscilación de la expresión de BMAL1 en el giro dentado del grupo control muestra la acrofase, es decir, el punto donde se expresa el valor máximo de la proteína, en el ZT8, mientras que el valor mínimo, o batifase, se encuentra al momento del ZT4. Se puede observar que en cuanto a PER1, la oscilación presenta un adelanto de 4 horas con respecto de BMAL1, con la acrofase en el ZT4 y la batifase en el ZT0 (Figura 7A). En el cambio de fase de luz a fase de oscuridad se observó que BMAL1 permanece con niveles similares en ambas fases, mientras que PER1 denota una mayor expresión durante en la fase de luz y disminuye en la fase de oscuridad (Figura 7B). La oscilación del grupo experimental presenta la acrofase de BMAL1 en el ZT8 y la batifase en el ZT0. En cambio, la mayor expresión de PER1 se encuentra en el ZT16 y el punto más bajo en el ZT8. La oscilación de PER1 presenta un retraso de ocho horas en comparación con la de BMAL1 (Figura 7C). Los análisis estadísticos mostraron que, al comparar los niveles de expresión de proteínas entre grupos, PER1 disminuye significativamente durante la fase de luz del grupo experimental con respecto del grupo control. Por el contrario, PER1 aumenta durante la fase de oscuridad del grupo tratado con nicotina en comparación con el grupo control (Figuras 7B y 7D).

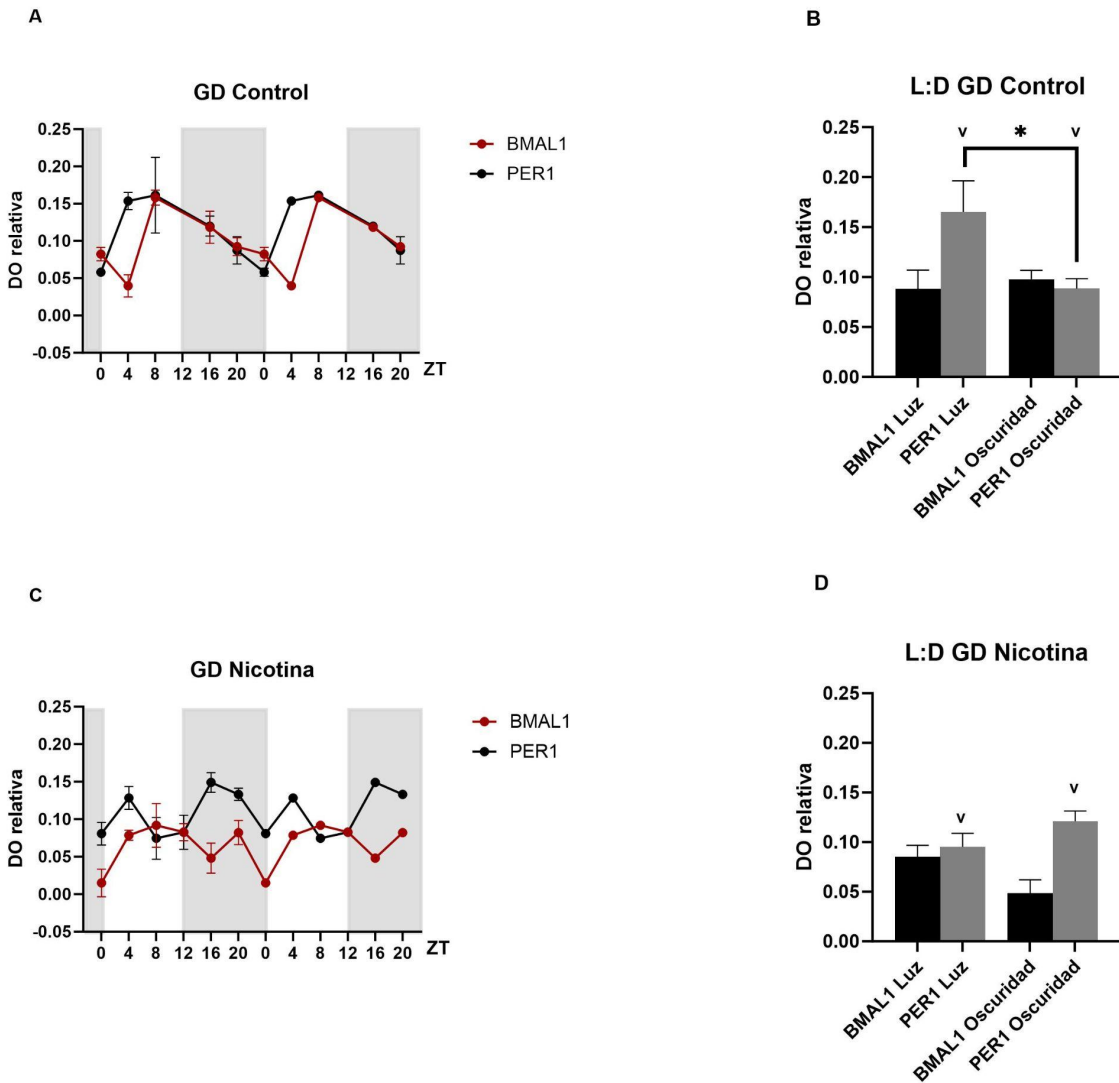


Figura 7. Expresión de las proteínas PER1 y BMAL1 en el GD. Cambios a lo largo de los distintos ZT para el grupo control (A) y el grupo experimental (C). Cambios en la expresión de PER1 y BMAL1 en las fases de luz y oscuridad del grupo control (B) y el grupo experimental (D). Los resultados muestran la media \pm SEM. $n=5$. *: $p<0.05$ según la prueba de Mann-Whitney; v: $p<0.05$ en comparación con el grupo homólogo según la prueba de Mann-Whitney.

Los análisis estadísticos también indicaron una diferencia sobre la expresión de la proteína BMAL1 entre los subgrupos de cada ZT del grupo control (Kruskal-Wallis: $p=0.0092$), con un aumento significativo entre el ZT4 contra el ZT8 (prueba de comparaciones múltiples de Dunn: $p=0.0051$) (Figura 8A). Por el

contrario, no se encontraron diferencias de expresión de BMAL1 entre los diferentes ZT para el grupo tratado con nicotina (Kruskal-Wallis: $p=0.1314$). Al realizar las comparaciones entre la señal de BMAL1 del grupo control y el grupo experimental por cada ZT, se encontró que el grupo experimental denota una disminución en la expresión de la proteína únicamente en el ZT0 (Mann-Whitney: $p=0.0079$) (Figura 8A). La expresión de PER1 en el giro dentado no mostró diferencias significativas entre los ZT del grupo control (Kruskal-Wallis: $p=0.0531$) ni del grupo experimental (Kruskal-Wallis: $p=0.0513$). Se puede observar también que en el ZT20 existe un aumento en la expresión de PER1 del grupo experimental en comparación con el grupo control (Mann-Whitney: $p=0.0317$) (Figura 8B).

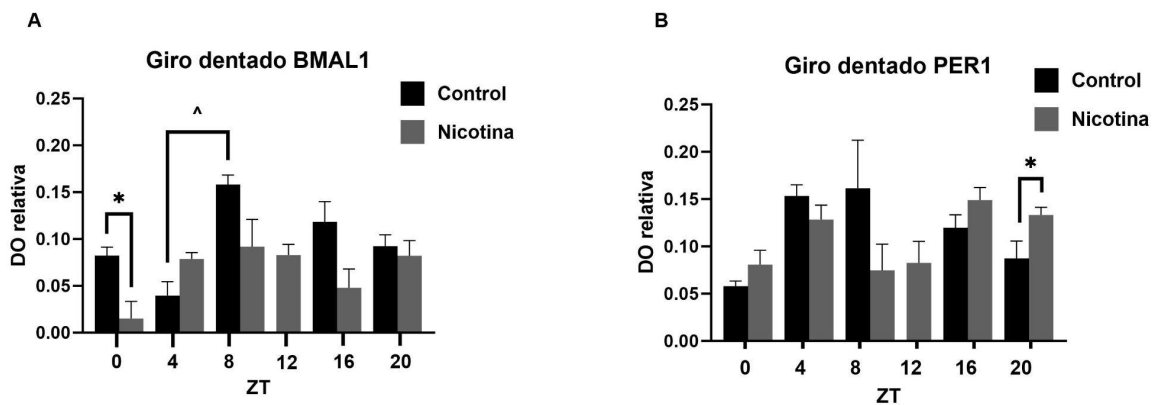


Figura 8. Comparación de la expresión de las proteínas BMAL1 (A) y PER1 (B) entre el grupo control y el grupo experimental a través de los distintos ZT en el GD. Los resultados muestran la media \pm SEM. $n=5$. *: $p<0.05$ según la prueba de Mann-Whitney. ^: $p<0.05$ según la prueba de comparaciones múltiples de Dunn.

Área CA1

La acrofase de BMAL1 en el área CA1 del grupo control se observa en el ZT20, mientras que el punto de expresión más alto de PER1 se muestra en el ZT4. Sin embargo, debido al error estándar de dicho ZT y al patrón que muestra la oscilación, se tomó en cuenta el ZT16 como la acrofase para PER1. Dicho esto, se observa un retraso de cuatro horas por parte de BMAL1 con respecto de PER1 (Figura 9A). La expresión de BMAL1 en la fase de oscuridad aumentó en comparación con la fase de luz, mientras que PER1 se mantuvo igual en ambas fases. Los resultados del grupo experimental indican que las acrofases de BMAL1 y PER1 están en el ZT8 y ZT16, respectivamente, mostrando un retraso de ocho horas por parte de PER1. La batifase de BMAL1 se puede observar en el ZT16, en tanto que la de PER1 se coloca en el ZT0 (Figura 9C). No se muestran cambios significativos tanto en la expresión de BMAL1 como de PER1 al momento de hacer la comparación por la transición de las fases luz-oscuridad.

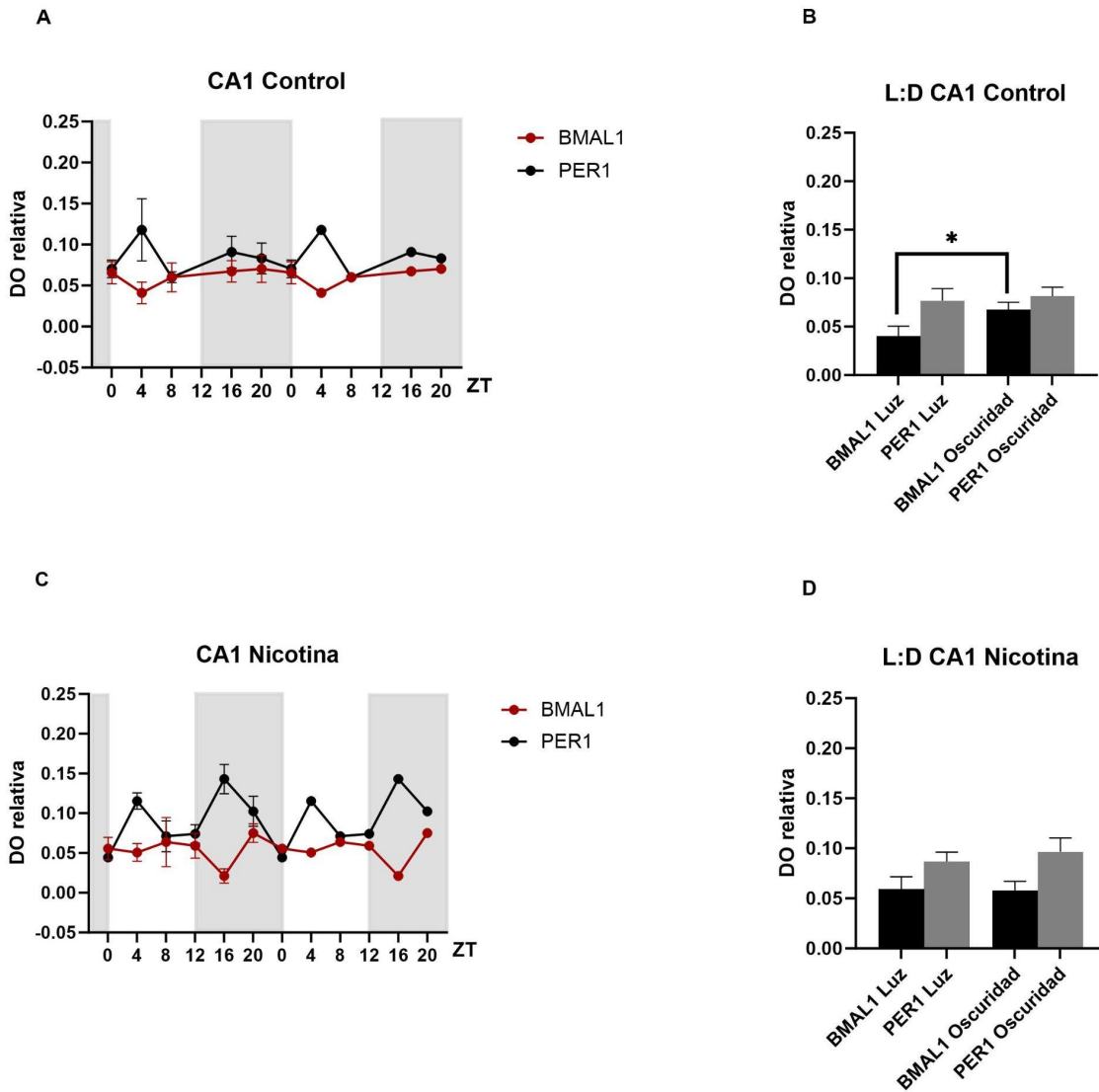


Figura 9. Expresión de las proteínas PER1 y BMAL1 en el área CA1. Cambios a lo largo de los distintos ZT para el grupo control (A) y el grupo experimental (C). Cambios en la expresión de PER1 y BMAL1 en las fases de luz y oscuridad del grupo control (B) y el grupo experimental (D). Los resultados muestran la media \pm SEM. n=5. *: $p < 0.05$ según la prueba de Mann-Whitney.

En el área CA1 no se encontraron diferencias significativas de la expresión de BMAL1 entre los cinco subgrupos del grupo control (Kruskal-Wallis: $p = 0.6676$) ni los seis subgrupos del grupo experimental (Kruskal-Wallis: $p = 0.4424$). Asimismo, la estadística muestra que no se presentan diferencias significativas de la proteína

BMAL1 entre el grupo control y el grupo expuesto a nicotina a lo largo del ciclo de 24 horas (Figura 10A). Por otro lado, la expresión de PER1 se mostró igual entre todos los subgrupos de los ZT en el grupo control (Kruskal-Wallis: $p=0.4921$), pero con un cambio en los subgrupos del grupo experimental (Kruskal-Wallis: $p=0.0061$), donde la única comparación significativa fue entre el subgrupo del ZT0 contra el subgrupo del ZT16 (prueba de comparaciones múltiples de Dunn: $p=0.006$). El cotejo entre el grupo control y el grupo experimental por cada ZT individual no manifestó diferencia alguna (Mann-Whitney: $p>0.05$) (Figura 10B).

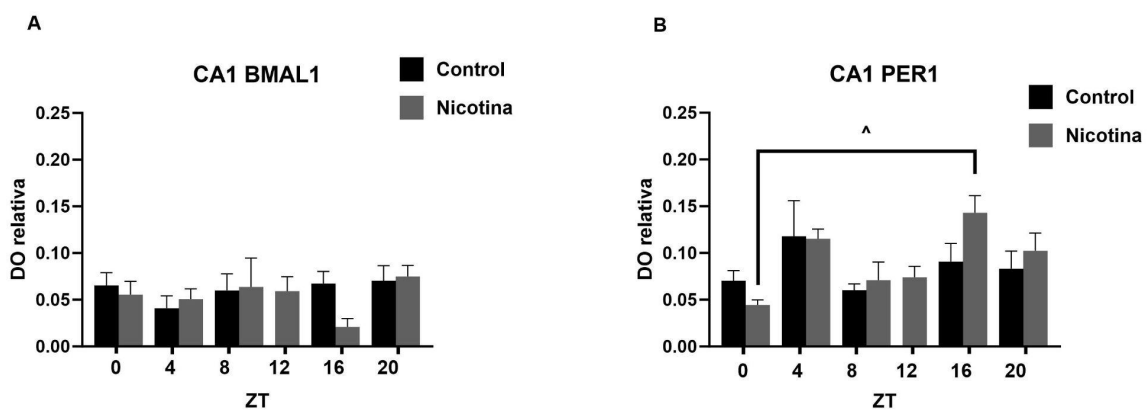


Figura 10. Comparación de la expresión de las proteínas BMAL1 (A) y PER1 (B) entre el grupo control y el grupo experimental a través de los distintos ZT en el área CA1. Los resultados muestran la media \pm SEM. $n=5$. ^: $p<0.05$ según la prueba de comparaciones múltiples de Dunn.

Morfometría celular

Como ya se mencionó, la administración de nicotina en periodos perinatales induce alteraciones en las células de distintas maneras como morfología o tamaño (Slotkin et al., 1987; Roy et al., 2002; Xu et al., 2001). Es por ello que se optó por determinar si la cantidad de células en el área CA1 y el giro dentado del hipocampo

cambia tras el aumento en la actividad de receptores nicotínicos durante periodos críticos activados por un agonista exógeno. De igual manera, se evaluó si existen diferencias de volumen en el área CA1 y el GD tras la aplicación de nicotina durante el desarrollo.

La medición del volumen del giro dentado y el área CA1 no mostró diferencias significativas entre el grupo control y el grupo experimental (Figuras 11A y 11B, respectivamente). Por otro lado, el conteo celular reveló que existe un aumento significativo en el número de células del grupo experimental con respecto del grupo control tanto en el GD como en el área CA1 del hipocampo de los ratones (Mann-Whitney: $p=0.0023$) (Figuras 11C y 11D).

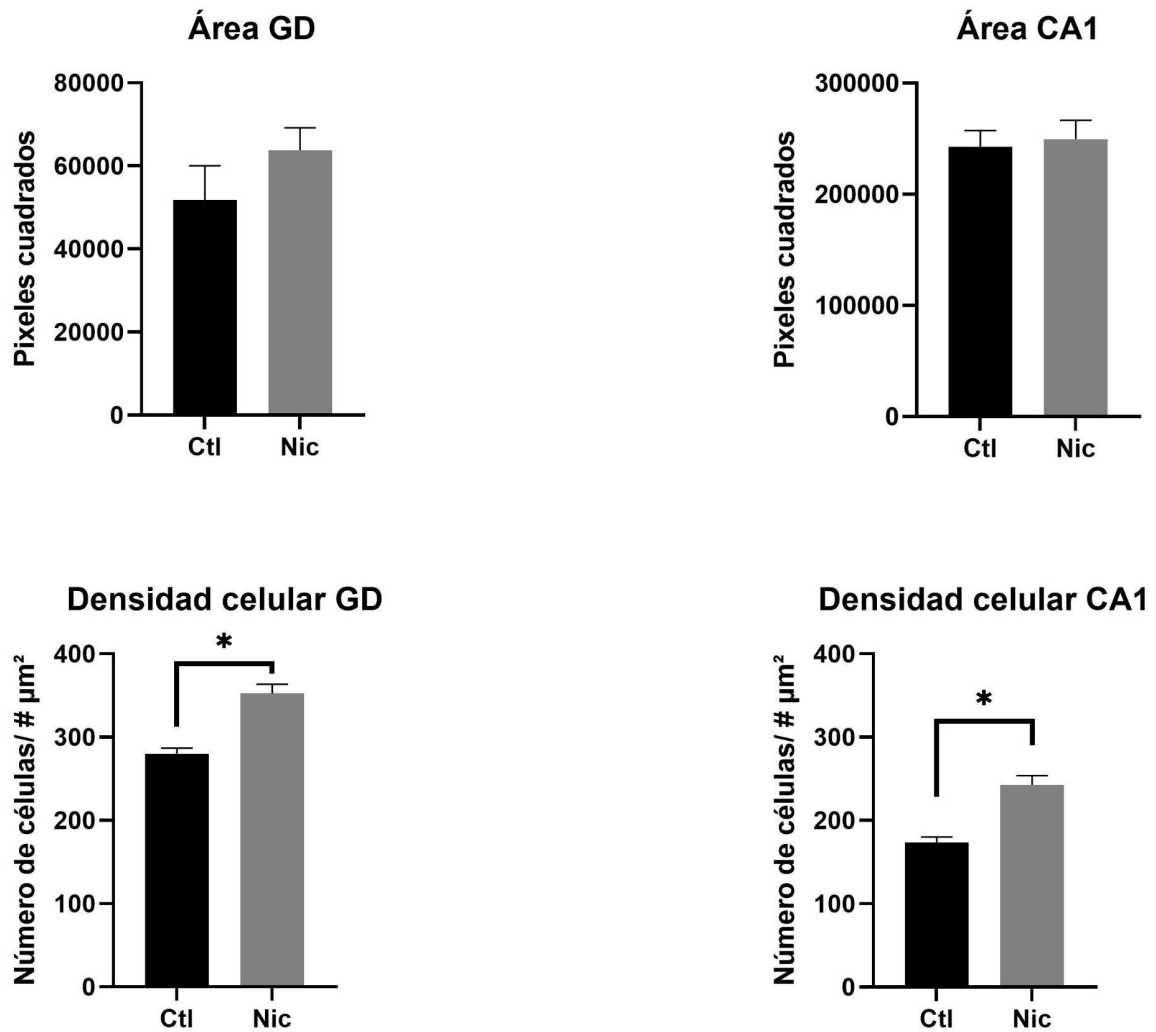


Figura 11. Morfometría del GD y el área CA1 del hipocampo. A-B. Análisis estadístico de la cuantificación de píxeles cuadrados para determinar si existen cambios en el volumen del GD y el área CA1 del hipocampo. C-D. Análisis estadístico de la cuantificación celular del GD y el área CA1. Los resultados muestran la media \pm SEM. n=5. #=99721.

Discusión

Los resultados de este estudio proporcionan un complemento a la comprensión de los efectos de la nicotina en el reloj molecular del hipocampo durante el desarrollo y su potencial influencia en la regulación de los ritmos circadianos en esta área del cerebro. Estos hallazgos podrían tener implicaciones importantes para comprender los efectos de la exposición a la nicotina durante el desarrollo temprano y sus consecuencias a largo plazo en la función cerebral.

En estudios previos se ha examinado la distribución temporal diaria de las proteínas del reloj molecular en diferentes áreas del cerebro de roedores (Jilg et al., 2009; Yan y Okamura 2002), así como alteraciones en la misma causada por nicotina administrada en periodos perinatales del desarrollo (Fuentes-Cano, 2022). Como se observa en las figuras 8 y 10, los resultados obtenidos indican que la nicotina tiene un efecto sobre los niveles de expresión de las proteínas BMAL1 y PER1 en dos regiones distintas del hipocampo. Se observaron cambios en la ritmicidad de estas proteínas en el grupo tratado con nicotina en comparación con el grupo control, similar a lo reportado por Fuentes-Cano (2022) en el NSQ. Estos cambios sugieren que la interacción de la nicotina con los nAChRs durante el período perinatal del desarrollo puede alterar la dinámica de expresión de las proteínas PER1 y BMAL1.

Se sabe que los nAChRs neuronales se expresan desde etapas tempranas del neurodesarrollo (Zoli et al, 1995). Además, la exposición crónica a la nicotina durante el desarrollo ha sido asociada con un aumento en la afinidad de unión de la nicotina al cerebro de roedores debido a la regulación al alza de los nAChRs. Este aumento en la expresión de los receptores puede llevar a una variedad de

alteraciones a nivel celular y molecular (Heath y Picciotto, 2009). Como ya se mencionó, algunos subtipos de nAChRs son permeables a Ca^{2+} , destacando los $\alpha 7$ Bgtx-nAChRs. La despolarización de la membrana causada por el flujo de Ca^{2+} de estos receptores permite la entrada de más iones a la célula a través de los canales de calcio dependientes de voltaje. En conjunto, la acumulación de calcio citoplasmático induce la liberación de las reservas de calcio del retículo endoplásmico que, a su vez, inician respuestas intracelulares importantes que influyen en la gestión de diversas funciones dentro de la célula a corto y largo plazo (Shen y Yakel, 2009). La regulación del asa de retroalimentación del reloj molecular se logra por medio de cascadas de señalización que derivan en la activación de la proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc (CREB), el cual se acopla a los elementos de respuesta de AMPc (CREs) que se encuentran dentro de las regiones promotoras de los genes reloj en mamíferos, permitiendo su transcripción (Cavieres-Lepe y Ewer, 2021). Considerando todo lo anterior, los cambios observados en este estudio sobre la expresión de las proteínas del reloj molecular podrían ser explicados gracias a las señalizaciones intracelulares anormales desencadenadas por la activación de los nAChRs $\alpha 7$ sobreexpresados en células del hipocampo debido a la exposición crónica de nicotina durante el desarrollo (Heath y Picciotto, 2009).

Ahora bien, la observación de las oscilaciones de las proteínas PER1 y BMAL1 en el grupo control reveló una diferencia de acrofase de solo cuatro horas entre ambas proteínas, tanto en el GD durante la fase de luz como en el área CA1 durante la fase de oscuridad. Estos hallazgos son consistentes con el estudio realizado por Jilg et al. en 2009, donde también se observó un retraso de duración similar en los picos de expresión de PER1 y BMAL1 durante la fase de oscuridad.

Más aún, los resultados contrastan con las oscilaciones en antifase reportadas en el NSQ, según lo señalado por Fuentes-Cano en 2022 y Sládek et al. en 2012, lo cual podría sugerir que las proteínas PER1 y BMAL1 no se regulan el uno al otro mediante bucles de retroalimentación negativa (Partch et al., 2014) en el hipocampo de los ratones, lo que a su vez podría indicar que estas proteínas no funcionan como un oscilador molecular.

En cuanto al estudio de la morfometría, se han llevado a cabo diversas investigaciones para examinar el impacto de la administración de nicotina durante el desarrollo en la densidad celular del hipocampo. Al analizar los hallazgos de estudios previos, se han observado resultados contradictorios en relación con el cambio en el número de células en el hipocampo debido a la administración de nicotina. Algunos estudios, como los de Roy y Sabherwal (1998) y Roy et al. (2002), así como Slotkin et al. (1987), han encontrado que la densidad celular puede aumentar o disminuir como resultado de la exposición a la nicotina. Sin embargo, Chen et al. (2006) han señalado que el número de células en el área hipocámpal no experimenta cambios significativos. Una posible explicación para las discrepancias entre los resultados de los estudios hasta el momento radica en las diferentes vías de administración de la nicotina utilizadas. Como se sugirió en el estudio de Roy y Sabherwal (1998), cada método de administración puede implicar niveles variables de estrés, lo cual quizá compromete la integridad de los sistemas no relacionados con el objetivo observado en el protocolo. Estos factores estresantes y las diferentes vías de administración que provocan concentraciones efectivas distintas a nivel del hipocampo podrían influir en los resultados y generar divergencias entre los estudios.

Con respecto de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se ha sugerido que la unión de la nicotina a receptores nicotínicos $\alpha 7$ desencadena

cascadas de señalización que activan vías antiapoptóticas, al tiempo que bloquea proteínas que promueven la apoptosis (Resende y Adhikari, 2009). Por lo tanto, se postula que el aumento en el número de células observado en el grupo experimental puede atribuirse a la supervivencia celular durante etapas de muerte neuronal programada, gracias a la activación de estas vías antiapoptóticas inducidas por la unión de la nicotina a los receptores nicotínicos $\alpha 7$ en las neuronas del hipocampo. Sin embargo, es importante tener en cuenta que se requiere una investigación adicional para comprender completamente los mecanismos subyacentes y confirmar estos hallazgos. Las complejidades de la morfometría y los efectos de la nicotina en el cerebro son temas continuos de estudio, y se necesita una mayor exploración para obtener una comprensión más completa de los cambios en la densidad celular en el hipocampo inducidos por la nicotina durante el desarrollo.

Conclusiones

La administración de nicotina en periodos perinatales altera los niveles de expresión y la distribución temporal de las proteínas PER1 y BMAL1 en el área CA1 y el GD del hipocampo de ratones. Esto abre paso a investigaciones acerca de los mecanismos intracelulares bajo los cuales la nicotina afecta la expresión de proteínas reloj.

Por otro lado, la administración perinatal de nicotina incrementa el número de células en el área CA1 y el GD del hipocampo. Sin embargo, es necesario hacer más estudios con el fin de determinar si este aumento en la densidad celular mantiene una relación directa con las deficiencias en tareas dependientes del hipocampo observadas en estudios previos donde se aplican dosis de nicotina durante el desarrollo.

Referencias

1. Abramoff, M. D., Magalhaes, P. J., & Ram, S. J. (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11(7), 36-42.
2. Abreu-Villaça, Y., Figueiras, C. C., & Manhães, A. C. (2011). Developmental aspects of the cholinergic system. *Behav Brain Res*, 221(2), 367-378. doi: 10.1016/j.bbr.2009.12.049.
3. Ankarberg, E., Fredriksson, A., & Eriksson, P. (2001). Neurobehavioural defects in adult mice neonatally exposed to nicotine: changes in nicotine-induced behavior and maze learning performance. *Behavioural Brain Research*, 123(2), 185-192. doi: 10.1016/s0166-4328(01)00207-8.
4. Bass, J., & Takahashi, J. S. (2010). Circadian Integration of Metabolism and Energetics. *Science*, 330(6009), 1349-1354. doi: 10.1126/science.1195027.
5. Baxter, M., Frick, K., Price, D., Breckler, S., Markowska, A., & Gorman, L. (1999). Presynaptic markers of cholinergic function in the rat brain: relationship with age and cognitive status. *Neuroscience*, 89, 771-780. doi: 10.1016/S0306-4522(98)00374-1.
6. Besson, M., Granon, S., Mameli-Engvall, M., Cloëz-Tayarani, I., Maubourguet, N., Cormier, A., ... Faure, P. (2007). Long-term effects of chronic nicotine exposure on brain nicotinic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(19), 8155-8160. doi: 10.1073/pnas.0702698104.
7. Bolsius, Y. G., Zurbruggen, M. D., Kim, J. K., Kas, M. J., Meerlo, P., Aton, S. J., ... Havekes, R. (2021). The role of clock genes in sleep, stress and memory. *Biochem Pharmacol*, 191, 114493. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114493.

8. Cavieres-Lepe, J., & Ewer, J. (2021). Reciprocal Relationship Between Calcium Signaling and Circadian Clocks: Implications for Calcium Homeostasis, Clock Function, and Therapeutics. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14, 666673. doi:10.3389/fnmol.2021.666673
9. Chen, W. J. A., King, K. A., Lee, R. E., Sedtal, C. S., & Smith, A. M. (2006). Effects of nicotine exposure during prenatal or perinatal period on cell numbers in adult rat hippocampus and cerebellum: A stereology study. *Life Sciences*, 79(23), 2221–2227. doi:10.1016/j.lfs.2006.07.019
10. Cross, S. J., Linker, K. E., & Leslie, F. M. (2017). Sex-dependent effects of nicotine on the developing brain. *Journal of Neuroscience Research*, 95(1-2), 422-436. doi:10.1002/jnr.23878
11. Dajas-Bailador, F., & Wonnacott, S. (2004). Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signaling. *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(6), 317–324. doi:10.1016/j.tips.2004.04.006
12. Dani, J. A., & Heinemann, S. (1996). Molecular and cellular aspects of nicotine abuse. *Neuron*, 16(5), 905-908. doi:10.1016/S0896-6273(00)80112-9
13. Dehorter, N., & Del Pino, I. (2020). Shifting Developmental Trajectories During Critical Periods of Brain Formation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14, 283. doi:10.3389/fncel.2020.00283
14. Delhay-Bouchaud, N. (2001). Développement du système nerveux central chez les mammifères [Development of the central nervous system in mammals]. *Neurophysiologie Clinique*, 31(2), 63-82. doi:10.1016/S0987-7053(01)00249-0

15. Dwyer, J. B., Broide, R. S., & Leslie, F. M. (2008). Nicotine and brain development. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 84(1), 30-44. doi:10.1002/bdrc.20118
16. Fuentes-Cano, M. A. (2022). Efecto de la nicotina sobre el desarrollo perinatal de los sistemas colinérgico y circadiano en el ratón [Tesis doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México].
17. Fuentes-Cano, M. A., Bustamante-Valdez, D. J., & Durán, P. (2020). Perinatal exposure to nicotine disrupts circadian locomotor and learning efficiency rhythms in juvenile mice. *Brain Structure and Function*, 225(7), 2287-2297. doi:10.1007/s00429-020-02126-2
18. Gachon, F., Nagoshi, E., Brown, S., Ripperger, J., & Schibler, U. (2004). The mammalian circadian timing system: From gene expression to physiology. *Chromosoma*, 113(3). doi:10.1007/s00412-004-0296-2
19. García-Cabezas, M. Á., John, Y. J., Barbas, H., & Zikopoulos, B. (2016). Distinction of Neurons, Glia and Endothelial Cells in the Cerebral Cortex: An Algorithm Based on Cytological Features. *Frontiers in Neuroanatomy*, 10, 107. doi:10.3389/fnana.2016.00107
20. Gavini, K., Yang, E., & Parameshwaran, K. (2021). Developmental nicotine exposure impairs memory and reduces acetylcholine levels in the hippocampus of mice. *Brain Research Bulletin*, 176, 1-7. doi:10.1016/j.brainresbull.2021.07.030
21. Gilhooley, M. J., Pinnock, S. B., & Herbert, J. (2011). Rhythmic expression of *per1* in the dentate gyrus is suppressed by corticosterone: Implications for neurogenesis. *Neuroscience Letters*, 489(3), 177-181. doi:10.1016/j.neulet.2010.12.011

22. Gotti, C., & Clementi, F. (2004). Neuronal nicotinic receptors: From structure to pathology. *Progress in Neurobiology*, 74(6), 363-396. doi:10.1016/j.pneurobio.2004.09.006
23. Haam, J., & Yakel, J. L. (2017). Cholinergic modulation of the hippocampal region and memory function. *Journal of Neurochemistry*, 142(Suppl 2), 111-121. doi:10.1111/jnc.14052
24. Harbour, V. L., Weigl, Y., Robinson, B., & Amir, S. (2014). Phase Differences in Expression of Circadian Clock Genes in the Central Nucleus of the Amygdala, Dentate Gyrus, and Suprachiasmatic Nucleus in the Rat. *PLoS ONE*, 9(7), e103309. doi:10.1371/journal.pone.0103309
25. Heath, C. J., & Picciotto, M. R. (2009). Nicotine-induced plasticity during development: Modulation of the cholinergic system and long-term consequences for circuits involved in attention and sensory processing. *Neuropharmacology*, 56 (Suppl 1), 254-262. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.07.020
26. Hensch, T. K. (2005). Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(11), 877-888. doi:10.1038/nrn1787
27. Hensch, T. K. (2004). Critical period regulation. *Annual Review of Neuroscience*, 27, 549-579. doi:10.1146/annurev.neuro.27.070203.144327
28. Herzog, E. D., Aton, S. J., Numano, R., Sakaki, Y., & Tei, H. (2004). Temporal Precision in the Mammalian Circadian System: A Reliable Clock from Less Reliable Neurons. *Journal of Biological Rhythms*, 19(1), 35-46. doi:10.1177/0748730403260776

29. Hua, J. Y., & Smith, S. J. (2004). Neural activity and the dynamics of central nervous system development. *Nature Neuroscience*, 7(4), 327–332. doi:10.1038/nn1218
30. Huang LZ, Hsiao SH, Trzeciakowski J, Frye GD, Winzer-Serhan UH. Chronic nicotine induces growth retardation in neonatal rat pups. *Life Sci*. 2006 Feb 23;78(13):1483-93. doi: 10.1016/j.lfs.2005.07.047. Epub 2005 Dec 1. PMID: 16324718.
31. Igarashi, K. M., Lu, L., Colgin, L. L., Moser, M.-B., & Moser, E. I. (2014). Coordination of entorhinal–hippocampal ensemble activity during associative learning. *Nature*, 510(7503), 143–147. doi:10.1038/nature13162
32. Isomura A, Kageyama R. Ultradian oscillations and pulses: coordinating cellular responses and cell fate decisions. *Development*. 2014 Oct;141(19):3627-36. doi: 10.1242/dev.104497. PMID: 25249457; PMCID: PMC4197574.
33. Jilg, A., Lesny, S., Peruzki, N., Schwegler, H., Selbach, O., Dehghani, F., & Stehle, J. H. (2009). Temporal dynamics of mouse hippocampal clock gene expression support memory processing. *Hippocampus*, NA–NA. doi:10.1002/hipo.20637
34. Karatsoreos, I. N., & Silver, R. (2017). Body Clocks in Health and Disease. *Conn's Translational Neuroscience*, 599–615. doi:10.1016/b978-0-12-802381-5.00043-9
35. Khan NA, Yogeswaran S, Wang Q, Muthumalage T, Sundar IK, Rahman I. Waterpipe smoke and e-cigarette vapor differentially affect circadian molecular clock gene expression in mouse lungs. *PLoS One*. 2019 Feb

- 27;14(2):e0211645. doi: 10.1371/journal.pone.0211645. PMID: 30811401; PMCID: PMC6392409.
36. Knierim JJ. The hippocampus. *Curr Biol*. 2015 Dec 7;25(23):R1116-21. doi: 10.1016/j.cub.2015.10.049. PMID: 26654366.
37. Knudsen EI. Sensitive periods in the development of the brain and behavior. *J Cogn Neurosci*. 2004 Oct;16(8):1412-25. doi: 10.1162/0898929042304796. PMID: 15509387.
38. Koike, N., Yoo, S.-H., Huang, H.-C., Kumar, V., Lee, C., Kim, T.-K., & Takahashi, J. S. (2012). Transcriptional Architecture and Chromatin Landscape of the Core Circadian Clock in Mammals. *Science*, 338(6105), 349–354. doi:10.1126/science.1226339
39. Liu, A. C., Welsh, D. K., Ko, C. H., Tran, H. G., Zhang, E. E., Priest, A. A., Kay, S. A. (2007). Intercellular Coupling Confers Robustness against Mutations in the SCN Circadian Clock Network. *Cell*, 129(3), 605–616. doi:10.1016/j.cell.2007.02.047
40. Mohawk, J. A., Green, C. B., & Takahashi, J. S. (2012). Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals. *Annual Review of Neuroscience*, 35(1), 445–462. doi:10.1146/annurev-neuro-060909-153128
41. Moriya, S., Tahara, Y., Sasaki, H., Hamaguchi, Y., Kuriki, D., Ishikawa, R., ... Shibata, S. (2014). Effect of Quetiapine on Per1, Per2, and Bmal1 Clock Gene Expression in the Mouse Amygdala and Hippocampus. *Journal of Pharmacological Sciences*, 125(3), 329–332. doi:10.1254/jphs.14071sc
42. Mufson, E. J., Lavine, N., Jaffar, S., Kordower, J. H., Quirion, R., & Saragovi, H. U. (1997). Reduction in p140-TrkA Receptor Protein within the Nucleus

- Basalis and Cortex in Alzheimer's Disease. *Experimental Neurology*, 146(1), 91–103. doi:10.1006/exnr.1997.6504
43. Myers, J. A., Curtis, B. S., & Curtis, W. R. (2013). Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. *BMC Biophysics*, 6(1), 4. doi:10.1186/2046-1682-6-4
44. Nakauchi, S., Malvaez, M., Su, H., Kleeman, E., Dang, R., Wood, M. A., & Sumikawa, K. (2015). Early postnatal nicotine exposure causes hippocampus-dependent memory impairments in adolescent mice: Association with altered nicotinic cholinergic modulation of LTP, but not impaired LTP. *Neurobiology of Learning and Memory*, 118, 178–188. doi:10.1016/j.nlm.2014.12.007
45. National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 89594, Nicotine. Retrieved August 1, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nicotine>.
46. Nemoto T, Ando H, Nagao M, Kakinuma Y, Sugihara H. Prenatal Nicotine Exposure Induces Low Birthweight and Hyperinsulinemia in Male Rats. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Jun 9;12:694336. doi: 10.3389/fendo.2021.694336. PMID: 34177815; PMCID: PMC8220205.
47. Noviello CM, Gharpure A, Mukhtasimova N, Cabuco R, Baxter L, Borek D, Sine SM, Hibbs RE. Structure and gating mechanism of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Cell*. 2021 Apr 15;184(8):2121-2134.e13. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.049. Epub 2021 Mar 17. PMID: 33735609; PMCID: PMC8135066.

48. Park GA, Pappas BA, Murtha SM, Ally A. Enriched environment primes forebrain choline acetyltransferase activity to respond to learning experience. *Neurosci Lett* (1992) 143: 259–62. doi:10.1016/0304-3940(92)90278-F.
49. Partch, C. L., Green, C. B., & Takahashi, J. S. (2014). Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends in Cell Biology*, 24(2), 90–99. doi:10.1016/j.tcb.2013.07.002
50. Paxinos, G. and Franklin, K.B.J. (2001) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd Edition, Academic Press, San Diego.
51. Picciotto MR, Higley MJ, Mineur YS. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron*. 2012 Oct 4;76(1):116-29. doi: 10.1016/j.neuron.2012.08.036. PMID: 23040810; PMCID: PMC3466476.
52. Pilati N, Barker M, Panteleimonitis S, Donga R, Hamann M. A rapid method combining Golgi and Nissl staining to study neuronal morphology and cytoarchitecture. *J Histochem Cytochem*. 2008 Jun;56(6):539-50. doi: 10.1369/jhc.2008.950246. Epub 2008 Feb 18. PMID: 18285350; PMCID: PMC2386766.
53. Rawashdeh, O., Jilg, A., Jedlicka, P., Slawska, J., Thomas, L., Saade, A., ... Stehle, J. H. (2014). PERIOD1 coordinates hippocampal rhythms and memory processing with daytime. *Hippocampus*, 24(6), 712–723. doi:10.1002/hipo.22262
54. Resende, R.R., Adhikari, A. Cholinergic receptor pathways involved in apoptosis, cell proliferation and neuronal differentiation. *Cell Commun Signal* 7, 20 (2009). <https://doi.org/10.1186/1478-811X-7-20>

55. Roy, T. y Sabherwal, U. (1998). Effects of Gestational Nicotine Exposure on Hippocampal Morphology. *Neurotoxicology and Teratology*, 20(4), 465–473. doi:10.1016/s0892-0362(97)00137-2
56. Roy TS, Seidler FJ, Slotkin TA. Prenatal nicotine exposure evokes alterations of cell structure in hippocampus and somatosensory cortex. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Jan;300(1):124-33. doi: 10.1124/jpet.300.1.124. PMID: 11752107.
57. Schneider, T., Bizarro, L., Asherson, P. J. E., & Stolerman, I. P. (2010). Gestational exposure to nicotine in drinking water: teratogenic effects and methodological issues. *Behavioural Pharmacology*, 21(3), 206–216. doi:10.1097/fbp.0b013e32833a5bb5
58. Shen JX, Yakel JL. Nicotinic acetylcholine receptor-mediated calcium signaling in the nervous system. *Acta Pharmacol Sin*. 2009 Jun;30(6):673-80. doi: 10.1038/aps.2009.64. Epub 2009 May 18. PMID: 19448647; PMCID: PMC4002362.
59. Sládek M, Polidarová L, Nováková M, Parkanová D, Sumová A. Early chronotype and tissue-specific alterations of circadian clock function in spontaneously hypertensive rats. *PLoS One*. 2012;7(10):e46951. doi: 10.1371/journal.pone.0046951. Epub 2012 Oct 2. PMID: 23056539; PMCID: PMC3462770.
60. Slotkin TA, Orband-Miller L, Queen KL, Whitmore WL, Seidler FJ. Effects of prenatal nicotine exposure on biochemical development of rat brain regions: maternal drug infusions via osmotic minipumps. *J Pharmacol Exp Ther*. 1987 Feb;240(2):602-11. PMID: 2433431.
61. Stagni F, Giacomini A, Guidi S, Ciani E, Bartesaghi R. Timing of therapies for Down syndrome: the sooner, the better. *Front Behav Neurosci*. 2015 Oct

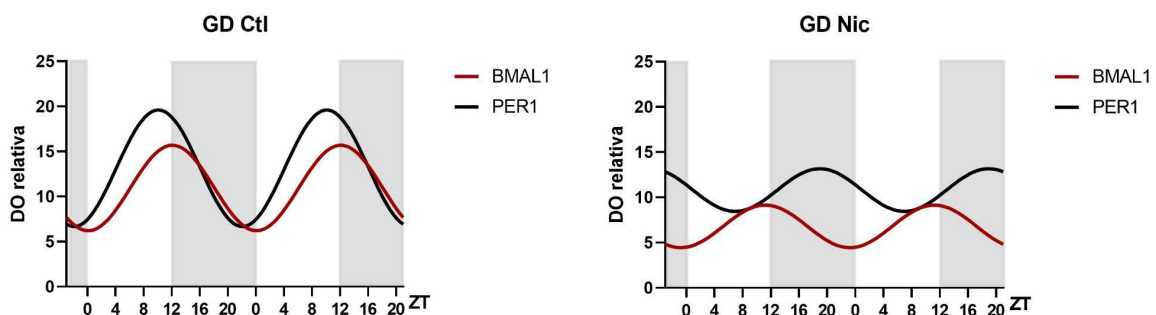
- 6;9:265. doi: 10.3389/fnbeh.2015.00265. PMID: 26500515; PMCID: PMC4594009.
62. Vitaterna MH, Takahashi JS, Turek FW. Overview of circadian rhythms. *Alcohol Res Health*. 2001;25(2):85-93. PMID: 11584554; PMCID: PMC6707128.
63. Wang, L. M.-C., Dragich, J. M., Kudo, T., Odom, I. H., Welsh, D. K., O'Dell, T. J., & Colwell, C. S. (2009). Expression of the Circadian Clock Gene *Period2* in the Hippocampus: Possible Implications for Synaptic Plasticity and Learned Behaviour. *ASN Neuro*, 1(3), AN20090020. doi:10.1042/an20090020
64. Wardlaw SM, Phan TX, Saraf A, Chen X, Storm DR. Genetic disruption of the core circadian clock impairs hippocampus-dependent memory. *Learn Mem*. 2014 Jul 17;21(8):417-23. doi: 10.1101/lm.035451.114. Erratum in: *Learn Mem*. 2014 Sep;21(9):498. PMID: 25034823; PMCID: PMC4105720.
65. Welsh, D. K., Takahashi, J. S., & Kay, S. A. (2010). Suprachiasmatic Nucleus: Cell Autonomy and Network Properties. *Annual Review of Physiology*, 72(1), 551–577. doi:10.1146/annurev-physiol-021909-135919
66. Wickström R. Effects of nicotine during pregnancy: human and experimental evidence. *Curr Neuropharmacol*. 2007 Sep;5(3):213-22. doi: 10.2174/157015907781695955. PMID: 19305804; PMCID: PMC2656811.
67. Wittenberg RE, Wolfman SL, De Biasi M, Dani JA. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotine addiction: A brief introduction. *Neuropharmacology*. 2020 Oct 15;177:108256. doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108256. Epub 2020 Jul 29. PMID: 32738308; PMCID: PMC7554201.

68. Xu Z, Seidler FJ, Ali SF, Slikker W Jr, Slotkin TA. Fetal and adolescent nicotine administration: effects on CNS serotonergic systems. *Brain Res.* 2001 Sep 28;914(1-2):166-78. doi: 10.1016/s0006-8993(01)02797-4. PMID: 11578609.
69. Yan, L., & Okamura, H. (2002). Gradients in the circadian expression of Per1 and Per2 genes in the rat suprachiasmatic nucleus. *European Journal of Neuroscience*, 15(7), 1153–1162. doi:10.1046/j.1460-9568.2002.01955.x
70. Zeid D, Kutlu MG, Gould TJ. Differential Effects of Nicotine Exposure on the Hippocampus Across Lifespan. *Curr Neuropharmacol.* 2018;16(4):388-402. doi: 10.2174/1570159X15666170714092436. PMID: 28714396; PMCID: PMC6018186.
71. Zemla R, Basu J. Hippocampal function in rodents. *Curr Opin Neurobiol.* 2017 Apr;43:187-197. doi: 10.1016/j.conb.2017.04.005. Epub 2017 May 3. PMID: 28477511; PMCID: PMC5690575.
72. Zoli, M, Le Novère, N, Hill, J.J., Changeux, J., 1995. Developmental regulation of nicotinic ACh receptor subunit mRNAs in the rat central and peripheral nervous systems. *J. Neurosci.* 15, 1912–1939.

Suplementario

La herramienta para el estudio de oscilaciones Chronos-Fit muestra los ritmos de expresión de las proteínas tras realizar un análisis de Fourier parcial y una regresión paso a paso (Zuther et al., 2009). En las figuras suplementarias 1 y 2 se observan las oscilaciones ajustadas de la expresión relativa de las proteínas del reloj molecular del GD y el área CA1 a través de los distintos ZT, así como los parámetros circadianos de cada área, proteína y grupo al que pertenecen.

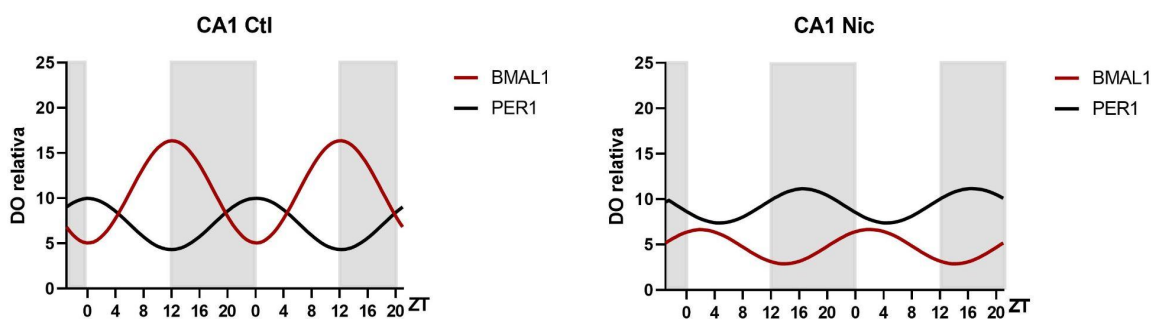
En la figura suplementaria 1A, se puede observar que la expresión de la proteína PER1 en el GD del grupo control mantiene una mayor potencia que la proteína BMAL1, con una diferencia de 2.11 horas entre cada acrofase. En el grupo tratado con nicotina también se nota una mayor potencia en la expresión de PER1 al comparar con la expresión de BMAL1; sin embargo, la diferencia de tiempo entre las acrofases de ambas proteínas aumentó a 16.27 horas debido al retraso que presenta la señal de PER1 en su oscilación (Figura suplementaria 1B).



GD	F	p	%rhythm	Mesor	Amp	Acr
Ct BMAL	20.42	0.000000001729	65.51	11.97	7.23	18.2
Ct PER	26.16	0.0001777	85.32	13.14	6.47	16.09
Nt BMAL	4.6	0.00338	29.01	6.79	2.35	17.21
Nt PER	22.1	0.0001247	94.95	10.81	2.36	0.94

Figura suplementaria 1. Expresión ajustada de PER1 y BMAL1 del GD en un plazo de 48 horas.

En el área CA1 del grupo control, la acrofase de la expresión de la proteína BMAL1 se muestra con mayor potencia que PER1, con un tiempo de desfase de 12.02 horas entre cada acrofase (Figura suplementaria 2A). Por el contrario, la expresión de PER1 del grupo experimental denota una mayor potencia que BMAL1 y un tiempo de desfase de 13.2 horas (Figura suplementaria 2B). Esta última diferencia de fase se debe a que ambas oscilaciones muestran un cambio en el momento donde se presenta la acrofase de la expresión de la proteína en comparación con el grupo control; la oscilación de BMAL1 presenta un adelanto de 9.3 horas, mientras que la de PER1 denota un retraso de 15.92 horas.



CA1	F	p	%rhythm	Mesor	Amp	Acr
Ct BMAL	21.52	0.0000000008373	66.68	11.3	7.23	18.2
Ct PER	25	<0.00001	100	7.38	2.51	6.18
Nt BMAL	19.27	1.77E-06	80.22	5.42	0.77	8.9
Nt PER	57.42	1.96E-05	97.04	9.17	1.94	22.1

Figura suplementaria 2. Expresión ajustada de PER1 y BMAL1 del área CA1 en un plazo de 48 horas.

Bibliografía

1. Zuther P., Gorbey S., Lemmer B. (2009). Chronos-Fit 1.06. Available online at: <http://www.ma.uni-heidelberg.de/inst/phar/lehre/chrono.html>