



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ALTERACIONES PRODUCIDAS POR LA ADMINISTRACIÓN  
PERINATAL DE NICOTINA SOBRE LOS PROCESOS DE  
APRENDIZAJE Y MEMORIA.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**MARTIN ALEJANDRO FUENTES CANO**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. PILAR DURÁN HERNÁNDEZ  
2013**



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.



## Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno  
Fuentes  
Cano  
Martin Alejandro  
55 82 45 34  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
303066637
2. Datos del Tutor  
Doctora  
Pilar  
Durán  
Hernández
3. Datos del sinodal 1  
Doctor  
Manuel  
Miranda  
Anaya
4. Datos del sinodal 2  
Doctor  
Julio César  
Rojas  
Castañeda
5. Datos del sinodal 3  
Doctora  
Leticia  
Granados  
Rojas
6. Datos del sinodal 4  
M. en C.  
Enrique  
Moreno  
Sáenz
7. Datos del trabajo escrito  
Alteraciones producidas por la administración perinatal de nicotina sobre los procesos de aprendizaje y memoria espacial.  
62 p.  
2013

## Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por mi formación universitaria y personal, por brindarme un ambiente académico de la más alta calidad y con las mejores oportunidades de desarrollo intelectual.

A la Facultad de Ciencias por el uso de sus instalaciones y por el apoyo del personal. Al laboratorio de Biología Animal Experimental por permitirme el uso de sus instalaciones en mis procedimientos experimentales,

Al Bioterio de la Facultad de Ciencias por proveerme de animales para experimentación y por orientarme en el manejo y cuidado de los mismos. Al personal que me apoyó, M.V.Z. Mario Javier Soriano Bautista, Biól. Dora Salazar Castelo y al M. en C. Agustín Carmona Castro.

A mis guías académicos, la Dra. Pilar Durán, la Dra. María del Carmen Miñana Solís, al Dr. Manuel Miranda Anaya y al M. en C. Enrique Moreno Sáenz, que me enseñaron el mundo de la Cronobiología y de la Memoria y Aprendizaje.

Al presupuesto interno de la Facultad de Ciencias, así como a las aportaciones personales de la Dra. Pilar Durán y de Martín Fuentes Cruz para la elaboración de mi proyecto.

Al apoyo y la experiencia recibida por la investigación del Dr. Manuel Miranda, “Estudio sobre la biología del ratón de los volcanes (*Neotomodon alstoni*): mantenimiento, cuidado y reproducción en cautiverio”

A los miembros del jurado por el tiempo dedicado a mi trabajo:

- Dr. Manuel Miranda Anaya
- Dr. Julio César Rojas Castañeda
- Dra. Pilar Durán Hernández
- Dra. Leticia Granados Rojas
- M. en C. Enrique Moreno Sáenz

A mi familia por su apoyo incondicional a lo largo de mi formación académica, por la ayuda en tiempos difíciles y por el amor que me han brindado.

A mis amigos que siempre estuvieron para apoyarme.

A mis compañeros y amigos del laboratorio por su ayuda, consejos y risas.

## DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a las personas que me impulsaron a seguir:

A mis padres, **Hermé y Martín**

A mi tutora, **Dra. Pilar Durán**

A mis **Compañeros del Laboratorio**

A mis **Amigos**

Y al apoyo y amor de **Sesangare**

## INDICE

1. Resumen .....	7
2. Introducción .....	8
3. Antecedentes.....	12
<i>Ritmos circadianos</i> .....	15
<i>Reloj Circadiano en Mamíferos</i> .....	17
<i>Desarrollo del Sistema Nervioso Central en mamíferos</i> .....	18
<i>Periodos críticos en el desarrollo del cerebro en mamíferos</i> .....	20
<i>Alteraciones durante el desarrollo</i> .....	21
<i>Proceso de atención y memoria</i> .....	23
<i>Estructuras cerebrales involucradas en el proceso de aprendizaje y memoria espacial</i> .....	24
a) <i>Sistema límbico</i> .....	24
b) <i>Hipocampo</i> .....	25
c) <i>Corteza prefrontal</i> .....	26
<i>Técnicas conductuales para el análisis del aprendizaje y la memoria espacial en el roedor (Laberintos)</i> .....	27
<i>Nicotina y el desarrollo del sistema nervioso central</i> .....	29
<i>Nicotina y la formación del hipocampo</i> .....	31
<i>Nicotina y el desarrollo del sistema circadiano</i> .....	32
<i>Nicotina y el núcleo supraquiasmático</i> .....	34
4. Planteamiento del problema.....	35
5. Hipótesis.....	36
6. Objetivo General .....	36
7. Objetivos Particulares.....	36
8. Material y Método .....	37
a) <i>Animales</i> .....	37
b) <i>Método de administración de Nicotina y obtención de grupos</i> .....	38
9. Procedimiento de registro .....	40
a) <i>Laberinto de Barnes</i> .....	40
b) <i>Registro de datos en ZE</i> .....	41
10. Análisis de datos .....	41
11. Resultados.....	42
12. Discusión .....	51
13. Conclusión .....	55
14. Bibliografía.....	56

## 1.-Resumen

El consumo de nicotina a nivel mundial se ha incrementado en los últimos años, este compuesto alcaloide se encuentra en los cigarrillos de tabaco, y es el compuesto activo que crea adicción al fumar. Los efectos de este compuesto en el cuerpo son muchos y tiene principal efecto sobre el Sistema Nervioso Central, vinculándose a los receptores nicotínicos de la acetilcolina (nAChR) de las neuronas. Fumar es considerado un problema de salud mundial en la actualidad, debido a que se presenta la ingesta de nicotina en todas las clases sociales, y tiene efecto en los individuos que la consume directamente (fumadores activos) y a los que no (fumadores pasivos). Un problema particular del consumo de nicotina es el presentado por la mujer en periodo de gestación consumidora activa o pasiva, ya que se ha demostrado la capacidad de la nicotina al atravesar la barrera placentaria e incluso mantener concentraciones mayores a las que se tiene en tejido materno. La nicotina al afectar el Sistema Nervioso Central, durante la gestación tiene efecto en el desarrollo del mismo en periodos críticos, con resultados de alteración en procesos de maduración del cerebro, manifestados como cambios en las funciones cognitivas de memoria y aprendizaje. Se ha demostrado que la administración de nicotina en dosis constantes durante el desarrollo, promueve cambios morfológicos y neurodegenerativos en el hipocampo con resultados de disminución en la memoria. Otra estructura importante es el Núcleo Supraquiasmático (NSQ) que es el marcapasos circadiano en los mamíferos, y el responsable de la ritmicidad de procesos conductuales y fisiológicos. Se ha reportado que la nicotina en roedores adultos afecta el ritmo cardiaco, la temperatura corporal y la actividad locomotriz, que son controlados por el NSQ del hipotálamo.

El objetivo de este trabajo es determinar los efectos de la nicotina perinatal sobre la capacidad de aprendizaje y memoria espacial, con especial énfasis en su distribución temporal diaria. Se formaron dos grupos de experimentación, uno control (Co) y uno de administración perinatal de nicotina (Ntp) de ratones juveniles machos albinos (cepa BALB/c) de 25 días de nacidos, los cuales se distribuyeron en cuatro subgrupos de n=8 cada uno en un fotoperiodo de 12:12. Se tomaron cuatro puntos horarios (ZT3, ZT9, ZT15 y ZT21) en los cuales se compararon la eficiencia de ejecución de las pruebas. Las pruebas se llevaron a cabo en el laberinto de Barnes modificado para ratones, para evaluar memoria espacial y aprendizaje, la que consiste en 3 ensayos por animal de entrenamiento por día durante 4 días, con una duración de 3 minutos por ensayo y descanso de 15 minutos entre ensayos, y una prueba final al quinto día con duración de 90 segundos para la memoria a corto plazo, y una final de 90 segundos ocho días después para la memoria a largo plazo. El tiempo de latencia que se presenta en la prueba final se considera la capacidad de evocación de memoria espacial, mientras que el número de ensayos que tarda el individuo en llegar a la solución en los ensayos es la evidencia del aprendizaje.

Los resultados indican que el proceso de memoria espacial tiene un ritmo diario, con eficiencias diferentes a lo largo del día, el grupo Co y el Ntp en memoria espacial reciente (recuerdo de experiencias pasadas en periodos cortos de tiempo) presentan eficiencias semejantes, con un ligero desfase en el grupo Ntp. Mientras que en la memoria remota el grupo Co presenta un marcado ritmo diario y una mayor eficiencia en comparación al grupo Co reciente, sin embargo el grupo de Ntp la memoria remota (capacidad de recordar información sobre hechos sucedidos en un periodo largo de tiempo) al compararse con el grupo Co de memoria remota, presenta una eficiencia considerablemente disminuida en todos los horarios, y una atenuación tal del ritmo diario de eficiencia en memoria espacial, que se considera la carencia del mismo.

Este trabajo propone que las alteraciones producidas por la exposición perinatal a nicotina sobre la eficiencia de memoria espacial y aprendizaje están ligadas a una mala comunicación de las diferentes estructuras del Sistema Nervioso Central, producidas durante los periodos críticos de su desarrollo.

## **2.-Introducción**

La presencia de ritmos es una característica fundamental en la vida, su origen se presenta de dos formas: a) externo, los cuales son ritmos que se presentan por factores externos al ser vivo, como los ambientales (luz, humedad, temperatura, salinidad, etc.) o los cósmicos (día-noche, ciclo lunar, presencia de estaciones, ciclos mareales, etc.), b) interno, son ritmos regidos endógenamente por factores genéticos, que se presentan a pesar de ausencia de estímulos externos, pero que en presencia de algunos pueden modificarse. Ejemplos de actividades rítmicas son el ciclo sueño- vigilia, ritmo cardiaco, respiración, ciclos hormonales, expresión de oscilaciones cerebrales. Los ritmos biológicos son aquellos que se presentan en sistemas vivos con recurrencia en intervalos más o menos regulares, con la característica de ser genéticamente determinados y heredados. La capacidad de predicción y preparación es de suma importancia para los seres vivos, por esto se da una relación entre los ritmos biológicos y los factores ambientales llamada sincronización, que permite a los organismos vivos estar en óptimas condiciones para eventos relacionados con factores ambientales, esto puede ser el momento de disponibilidad de comida, presencia o ausencia de predadores, etc. La duración de un ciclo en el ritmo (periodo) es la constante que lo define, y según el periodo establece la variedad del ritmo, los cuales están clasificados como circadianos, circamareales, circalunares y circanuales, o en otra clasificación como ultradianos e infradianos (Dunlap, Loros y DeCoursey, 2004).

Los ritmos biológicos están regidos en los mamíferos por un reloj maestro, el Núcleo Supraquiasmático (NSQ), una estructura que se encuentra en el Hipotálamo que se encarga de sincronizar a los diferentes osciladores del organismo. Se ha demostrado que la lesión o ausencia del NSQ, tiene efectos negativos sobre el individuo al no poder responder éste de forma adecuada a los cambios ambientales.

Por otro lado, actualmente a nivel mundial se presenta un aumento de consumo de sustancias que son socialmente aceptadas para la vida cotidiana, que tienen efectos ya sean positivos o negativos para el cuerpo en el momento, pero que además a largo plazo tienen repercusiones muy importantes, manifestándose en el aumento de diferentes trastornos. Entre las más consumidas se encuentra el tabaco, que en las últimas décadas se ha incrementado su consumo a nivel mundial, convirtiéndose en un problema de salud pública mundial. Una característica importante del alcance de este problema es la interacción de fumadores y no fumadores, llevando a una clasificación de afectados denominados fumadores activos y fumadores pasivos, de los cuales los activos son los que consumen el producto, y los pasivos tienen los efectos de convivir con los primarios a pesar de no consumir el producto directamente, un ejemplo de esto es la cantidad de nicotina ambiental, que puede llevar a alcanzar niveles tan altos en los no fumadores como en los fumadores. Por ejemplo en México se ha calculado que entre las edades de 15 a 34 años, el 15.9% (10.9 millones) de la población es fumadora activa, 24.8% (8.1 millones) de hombres y 7.8% (2.8 millones) de las mujeres para el 2008 (OMS, 2010). El principal problema del consumo de tabaco se asocia a la nicotina, el principal alcaloide que contiene y que se ha logrado tener evidencia de su impacto en muchos aspectos de la vida de los humanos. Esto resulta de gran importancia ya que la exposición a la nicotina por fumadores activos y pasivos de cigarrillos tiene efecto en aspectos de salud tan importantes como el desarrollo embrionario, un dato interesante en los Estados Unidos es que en madres gestantes, el problema es tal que del 21 al 28 % de las mujeres embarazadas en los Estados Unidos son fumadoras activas, mientras que las mujeres embarazadas fumadoras pasivas se estima que es de un medio a un tercio del total de embarazos de mujeres no fumadoras. (Tong y cols., 2009), en ambos casos concentrándose las edades entre 15 y 30 años (Martin y cols.,

2007); mientras que en países con menos grado de industrializados estas tendencias tienen un incremento (WHO, 2011).

La razón principal del incremento de consumo del tabaco, especialmente en su variedad de presentación el cigarro, es la nicotina, un compuesto altamente adictivo, tan adictivo que solo el cinco por ciento de las personas que quieren dejar de fumar lo logran (CDC, 2004).

La nicotina es un alcaloide que puede pasar fácilmente a través de la membrana lipoproteica, se puede absorber fácilmente por los pulmones al inhalar, de forma similar se puede absorber por la mucosa oral al consumir o ingerir productos que la contengan, y por la mucosa del intestino delgado, en todos estos casos debido a que el pH alcalino favorece la absorción; sin embargo, también se ha probado su absorción a través de la piel. La nicotina presenta un efecto de reforzamiento al tabaco, incrementando el consumo del mismo, así mismo la nicotina presenta características que favorece su consumo, las cuales son 1) neuroadaptación, que ocurre con el uso persistente de la nicotina (tolerancia), 2) síntomas de síndrome de abstinencia al dejar de consumirla, 3) el mismo efecto de reforzamiento de la nicotina que promueve su consumo, ya que tiene un efecto positivo de recompensa (psicoactivo) (Rockville, 2010), al ser un estimulante en actividad y al vincularse con los receptores nicotínicos de la acetilcolina (nAChR) de las neuronas. Imitando al neurotransmisor acetilcolina, que suele acoplarse a las proteínas canaliculares haciendo que las neuronas liberen abundante dopamina fomentando la adicción (Parameshwaran y cols., 2012).

Se ha demostrado que la exposición a la nicotina también la sufren fetos, recién nacidos, niños y adolescentes, demostrando su gran espectro de influencia (Dwyer, McQuown y Leslie, 2009). Durante el embarazo es capaz de afectar el desarrollo de los fetos durante la gestación ya que es capaz de cruzar la capa placentaria, y puede mantener concentraciones

iguales o superiores a la de los tejidos maternos, manifestándose principalmente en nacimientos de bajo peso y talla, y en algunos casos provocando abortos (Clegg y cols., 1995; Huang y cols., 2007).

La nicotina interactúa con los Receptores nAChRs, los cuales regulan aspectos críticos en la maduración del cerebro durante los periodos prenatal, postnatal temprano y de adolescencia, teniendo efectos de largo plazo y más profundos en la exposición en edades más tempranas, ya que la maduración el circuito central no ha sido completada y por su inherente plasticidad en el desarrollo del cerebro, haciéndolos especialmente vulnerables. También se ha demostrado que durante el desarrollo embrionario del cerebro, existe una modulación temporal del cerebro, especialmente en los periodos críticos del desarrollo, cuando es más sensible a la perturbación, además de desensibilizar los canales nAChR alterando las conexiones fisiológicas mediada por neurotransmisores (Dwyer y cols., 2009). Por todo lo anterior, es fundamental el estudio, en todos los niveles de organización, de los efectos de la administración perinatal de nicotina sobre el desarrollo del Sistema Nervioso Central así como sus consecuencias conductuales, anatomo-funcionales y biomoleculares en los individuos que han sufrido este insulto en el sistema nervioso central (SNC) en desarrollo.

### **3.-Antecedentes**

#### Ritmos circadianos

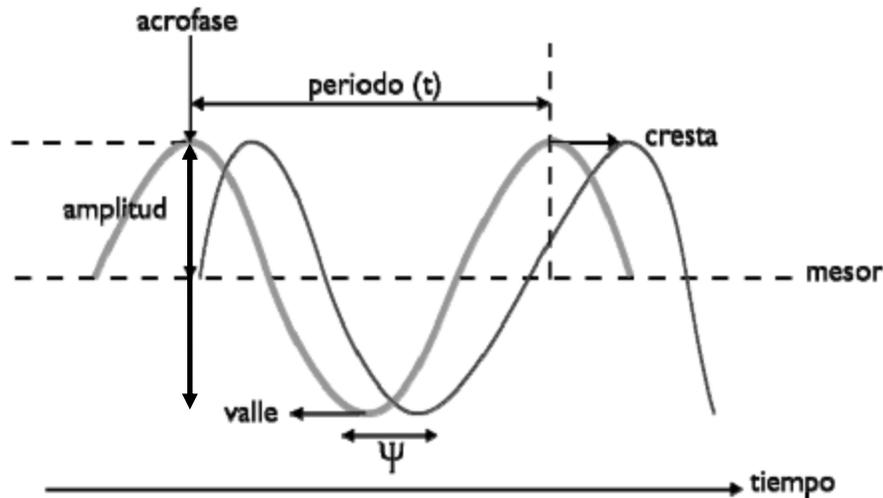
En la naturaleza, desde los organismos más simples hasta los más complejos, se presentan variaciones periódicas con duración aproximada de un día ( $\approx 24$  horas) en la mayoría de los procesos fisiológicos, bioquímicos y conductuales, estas variaciones combinadas con ciclos naturales de ocurrencia día-noche, permite a los organismos anticiparse a los momentos de estimulación ambiental, y dar una respuesta correctiva adecuada (Moore-Ede, 1986).

El reloj biológico tiene la labor de mantener la cronostasia, la cual se define como la regulación de funciones en ventanas temporales que son importantes, las cuales son los procesos de adaptación del individuo a su nicho temporal, un ejemplo es la estimación del fotoperiodo ambiental. El reloj biológico, como función principal, permite a los organismos prepararse para dar una respuesta anticipatoria a sus necesidades, así como determinar el mejor horario en que le puede satisfacerla en un contexto día y noche, permitiendo marcar el tiempo donde es mejor realizar o responder a tareas fisiológicas o conductuales en los ciclos diarios (Escobar, 2002; Perreau-Lenz y cols., 2004).

Los ritmos biológicos pueden estudiarse matemáticamente mediante funciones cosenoidales, ya que tienen cuatro propiedades básicas (Golombek, 1997) (ver Figura 1).

- Periodo ( $\tau$ ): intervalo de tiempo entre dos acontecimientos idénticos (ciclo completo)
- Mesor: valor medio de la variable estudiada durante un periodo completo.
- Amplitud: diferencia entre cresta y valle alcanzado por la variable en un periodo.

- Fase: valor instantáneo de una variable biológica en un momento dado. Caracterizado principalmente por la hora del día donde alcanza el valor máximo, conociendo al punto como “acrofase”.



**Figura 1. Esquema que muestra las propiedades básicas de los ritmos biológicos.**

En la naturaleza existen diversos ritmos biológicos, con periodos de duración diferentes, sin embargo los más estudiados por su frecuencia, duración y efectos en los seres vivos son los ritmos circadianos, con periodos cercanos a 24 horas. Estos ritmos presentan las cualidades, además de la antes mencionada, de ser endógenos, presentar compensación a la temperatura, y la capacidad de sincronización ante agentes ambientales externos con periodos cercanos a 24 horas; dando así las bases para el desarrollo de mecanismos adaptativos de anticipación a ambientes cíclicos, permitiendo la coordinación con el medio externo.

El cambio geofísico más evidente en la Tierra es su movimiento de rotación (movimiento sobre su propio eje), desde antes del inicio de la vida en el planeta esta condición ha permanecido muy constante, así como los periodos de luz y oscuridad; estos ciclos han

coordinado e influenciado los hábitos de actividad-reposo, ingesta de comida, de agua, etc., con la alternancia del día y de la noche, incluyendo otros niveles de organización, fisiológicos, bioquímicos y conductuales. Estos ritmos se han fijado de una forma endógena, y se presentan incluso en condiciones de aislamiento del estímulo luminoso, la ritmicidad se mantiene con periodos similares a la duración de un día, esta persistencia se conoce como ritmo en libre curso o “free running”.

Los ritmos endógenos son innatos, esto quiere decir que son adquiridos vía herencia y que están fuertemente ligados a bases genéticas, y no pueden ser adquiridos por aprendizaje; estos ritmos se presentan en condiciones de aislamiento, sin embargo en condiciones naturales, bajo los ciclos externos, éstos presentan un efecto sobre el ritmo, constituyendo la señal temporal a la que se sincronizan. En la naturaleza la luz es el sincronizador por excelencia ya que resulta ser el más potente. Las señales temporales más eficientes para la sincronización se denominan “*Zeitgebers*” o sincronizadores. El término *Zeitgeber* fue acuñado en Alemania por Halberg (1954), y significa “dador de tiempo” y se aplica a una señal externa que se presenta de manera periódica y que es capaz de regular la expresión de un ritmo endógeno; el zeitgeber o sincronizador más estudiado es el ciclo de luz y oscuridad. La sincronización sólo se puede dar si el estímulo ambiental tiene una oscilación similar a la frecuencia de oscilación del organismo, y que no salga de los rangos capaces de percibir el mismo. A los valores de los periodos de las oscilaciones de las condiciones ambientales se les denomina  $T$ , y cuando existe una sincronización entre la condición ambiental y el periodo del ritmo endógeno del organismo (denominado  $\tau$ ), se dice que está sincronizado o ajustado a  $T$ , y la característica está dada por el periodo del ritmo, donde el periodo de  $T$  conduce una respuesta del periodo de  $\tau$ , estableciendo una Relación de Fase ( $\Psi$ ) (Daan, 2002). En este contexto, en el estudio de los ritmos biológicos se utiliza el

término *Circadian time* (CT) y *Zeitgeber time* (ZT), los cuales determinan los espacios temporales a partir del inicio del estímulo, la diferencia radica en que CT es en condiciones constantes incluyendo la lumínica, mientras ZT utiliza un estímulo sincronizador (luz, alimento, etc.) y los demás en condiciones constantes.

Además del sincronizador por excelencia, la luz, existen otros sincronizadores no fóticos, como la temperatura, señales sociales, fármacos, actividad física y acceso de alimento. Existe un fenómeno en el cual hay estímulos que parecieran cambiar la respuesta de los organismos, pero que sin embargo no tiene efecto sobre el reloj biológico y sólo afectan la expresión de una cierta actividad, este fenómeno se llama “enmascaramiento” o “*masking*”, y puede influir sobre la conducta expresada mientras persisten los estímulos, pero al desaparecer estos estímulos se puede comprobar que no tuvieron efecto alguno sobre la sincronización del reloj circadiano del organismo (Aschoff, 1999).

La sincronización consta de tres elementos:

- El estímulo debe tener efecto sobre el periodo del ritmo ( $\tau=T$ ).
- Se debe dar una relación de fase estable.
- El estímulo debe controlar la fase.

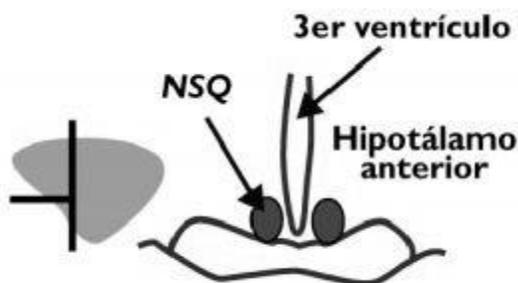
### *Reloj Circadiano en Mamíferos*

El reloj circadiano tiene la capacidad de generar 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 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.

En mamíferos se ha demostrado que el oscilador maestro se encuentra en el hipotálamo, específicamente en el NSQ (Golombek, 1997). 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), las 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 se localiza en la base del tercer ventrículo, y consta de dos cuerpos ovoides (Figura 2). Secreta varios neurotransmisores como Arginina Vasopresina, el Neuropeptido Y, el Péptido Vasoactivo Intestinal (VIP) y el ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) (Golombek, 1997).



**Figura. 2** 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).

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).

Se ha demostrado que a pesar de la destrucción del NSQ, algunos ritmos persisten, como son la mitosis en la córnea y en el intestino. Y se ha visto que en ratas lesionadas del NSQ se pueden presentar Actividad Anticipatoria al Alimento, lo que ha sugerido la presencia de osciladores marcapasos fuera del NSQ, desde células hasta tejidos con diferentes ritmos de oscilación, dando lugar a osciladores en otras regiones del cerebro y en tejidos periféricos, sin embargo hasta ahora el NSQ se ha considerado como el responsable de ser el Marcapasos Central (Yamazaki y Straume. 2002).

Existen ritmos diurnos de secreciones, como son el de melatonina, del neuropéptido-Y y de serotonina, los cuales tienen la función modular la función del reloj maestro, manteniéndolo ajustado a un ritmo constante. El NSQ está conectado a diversos núcleos del hipotálamo, el tálamo y la región pre-óptica por axones, estas salidas pueden generar 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).

### *Desarrollo del Sistema Nervioso Central en mamíferos*

La histogénesis general del Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos consta de tres estados:

- Organogénesis.

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

El desarrollo del cerebro está determinado por una serie de eventos sucesivos, en mamíferos las más importantes se presentan en etapas prenatal y postnatal temprana, en donde cada uno de los eventos permite el desarrollo del siguiente; por esto, si alguno no se desarrolla como debe o tiene algún retraso, provoca una cadena de reacciones capaces de amplificar errores funcionales, afectando el desarrollo y maduración del cerebro, así como la expresión de funciones cognitivas complejas (inteligencia, atención, aprendizaje) así como el desempeño correcto del organismo, entre las principales etapas se encuentran la neurogénesis, la migración y la diferenciación neuronal, la gliogénesis y la mielinización (Morgane *et al*, 1993; Rodier, 1994; Finlay y Darlington, 1995)

Durante el desarrollo estos periodos o procesos se pueden ver afectados por una gran cantidad de factores endógenos o exógenos, en donde la naturaleza y severidad de la perturbación depende de la sincronización del factor con el estado de desarrollo (Dobbing, 1990; Rodier, 1994).

Durante la organogénesis se presentan varios picos de replicación neuronal, los cuales se producen en la división celular, en donde se sabe que la matriz celular presenta patrones de proliferación y síntesis de DNA en la membrana celular, así como factores de inicio de la mitosis. Cuando se da la división de las células precursoras, las células hijas se mantienen unidas a la membrana y comienza de nuevo la proliferación, mientras que algunas otras migran fuera de la membrana y se diferencian en neuronas, estos periodos son críticos en el desarrollo.

Las células que se diferencian en neuronas pierden la capacidad de dividirse, por esto es importante la producción de estas células para el establecimiento de las diferentes partes del cerebro y sistema nervioso, ya que depende de este evento y de la producción la ejecución neuronal adecuada. Por esto, la correcta producción de estas células neuronales, determina el establecimiento del sistema nervioso central desde los primeros estados del desarrollo.

La regulación del número de neuronas generadas está dada de dos formas; 1) factores que alteran el número de células madres, con efecto en la neurogénesis; 2) factores que alteran el número de descendientes de cada célula madre; ambos factores podrían ser controlados por mecanismos intrínsecos (genéticos) y extrínsecos (influencias ajenas como ambiente o interacciones con otras células).

El desarrollo del sistema nervioso central se puede clasificar en tres fases de solapamiento (Morgane y cols., 1993):

- 1) Desarrollo del sistema nervioso genético, 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.

La regulación genética y la nutrición regulan el desarrollo cerebral, en donde los genes codifican para la expresión de enzimas y promotores en el control de sitios intracelulares,

tiempos de activación y desactivación de acción genética durante el desarrollo, mientras los factores exógenos como la malnutrición y el consumo de sustancias pueden alterar la actividad de las enzimas y la síntesis de proteínas, así como la estructura de las mismas. (Morgane y cols., 2002). En la última etapa, la formación de neurotransmisores tiene la finalidad de regular la formación de los circuitos neuronales, desempeñar un papel en la sinaptogénesis y la modificación adaptativa de las conexiones neuronales en el desarrollo a partir de la liberación de glutamato de los axones entorrinales (Mattson y Hauser, 1991).

El desarrollo de las células individuales está dividido en tres fases: proliferación, migración y diferenciación, en ésta última la célula adquiere su fenotipo neuronal o glial. La temporalidad de los movimientos y de la migración es de suma importancia, ya que la sincronización en los eventos del desarrollo determina la capacidad del funcionamiento final de las redes neuronales en desarrollo. Desde las etapas tempranas se forman las capas celulares para cada destino celular, éstas son ectodermo, mesodermo y endodermo, en donde el ectodermo se originan las células precursoras nerviosas, que tienen el destino de formar la placa neural y el tubo neural, fundamentales para la formación del sistema nervioso central y el periférico.

#### *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 actuales y a los subsecuentes, en las etapas de desarrollo temprano se encuentran los periodos donde son más susceptibles a daños irreversibles, mientras que en las etapas finales y en la madurez se encuentran los menos susceptibles.

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 de las redes neuronales antes y después del nacimiento. Los momentos en donde se presentan estos cambios se denominan “periodos 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 cuerpo entre otros) o endógenos (hormonas) (Dobbing, 1968), ya que después de cada periodo crítico la actividad de conexiones disminuye en número y son menos susceptibles a cambios. Los periodos críticos son fundamentales para la maduración del sistema nervioso, ya que representa una ventana de desarrollo único, y no se pueden presentar en otro momento. Los periodos críticos son fácilmente modificables o interrumpidos, por lo que una característica es que se realizan en periodos de tiempo cortos (Morgane y cols., 2002).

El crecimiento normal del feto, incluyendo al SNC, depende en gran parte del ambiente nutricional, sin embargo existen ambientes no nutricionales pertenecientes a un tipo de malnutrición social, por ejemplo el etanol interfiere en tres fases de la nutrición fetal, el soporte maternal, la transferencia placentaria y la utilización fetal.

El ejemplo más claro y de mayores consecuencias en la actualidad por todo el contexto social que lo mantiene e impulsa, es el del tabaco, específicamente se ha demostrado que es la nicotina el factor de mayor influencia, ya que es uno de los más poderosos determinantes en el retraso del crecimiento intrauterino, con resultados en deficiencia en el peso cerebral (Morgane y cols., 1993).

#### Alteraciones durante el desarrollo

En los estudios que se han relacionado en una línea de tiempo del desarrollo de los mamíferos altriciales durante el desarrollo cerebral, se ha demostrado que si un insulto se

presenta en estas etapas tiene efectos en el desarrollo del SNC, un ejemplo claro de estos efectos está documentado por Morgane y colaboradores que a partir de un modelo de malnutrición, determinaron los posibles efectos en estos periodos críticos del desarrollo (Morgane y cols., 1993). También pudieron correlacionar los eventos del desarrollo del SNC de ratas con el desarrollo del SNC de los humanos, demostrando que tienen una maduración y formación de estructuras muy similares, dando como resultado un buen modelo para el estudio de estos periodos de desarrollo; análogamente, el ratón tiene un desarrollo del SNC similar a la rata y al humano (Morgane y cols., 2002). De manera similar Darlington y colaboradores en las últimas décadas se han dado a la tarea de simular y correlacionar eventos en diferentes modelos animales de mamíferos para el estudio del desarrollo neuronal con respecto al desarrollo humano. Dentro de los diferentes modelos se encuentra el ratón como uno de los más completos empíricamente y por lo tanto uno de los mejor simulados y correlacionado con el desarrollo humano (Clancy y cols., 2007; Darlington y Anaud, 2007; Finley, 1995) (Ver Figura 3).

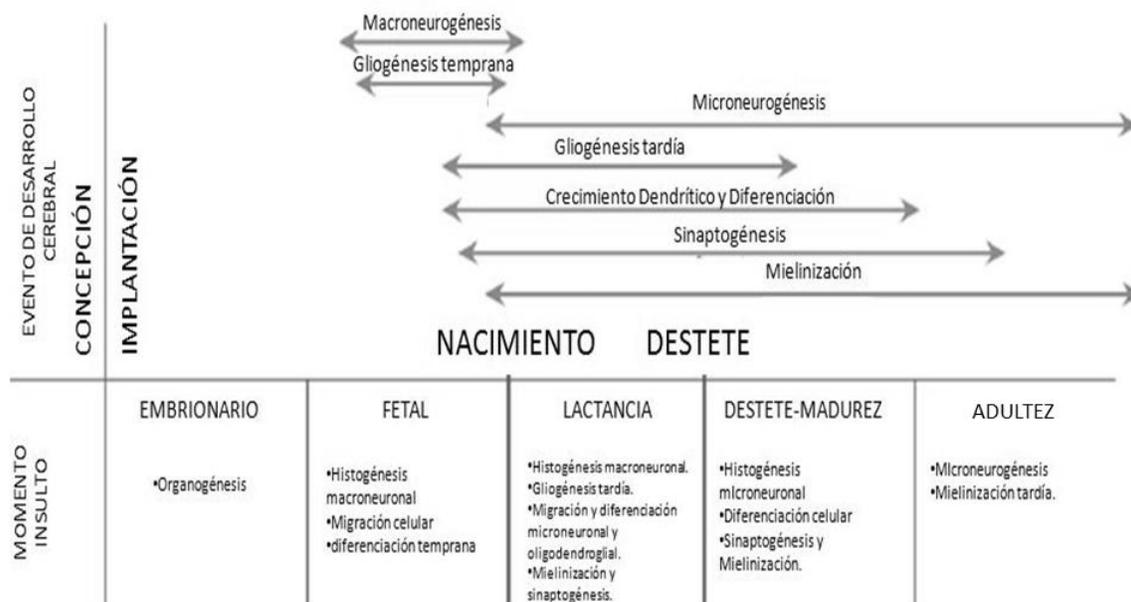


Figura 3. Periodos críticos del desarrollo en el SNC con sus posibles procesos a afectar dependiendo del momento en donde se administre el insulto (modificado de Morgane y cols. 1993).

### Proceso de atención y memoria

La atención es el proceso cognoscitivo más básico que poseen los mamíferos, involucra el procesamiento de información de las vías de entradas de los estímulos ambientales, y es fundamental para el aprendizaje, memoria, lenguaje y orientación. Una característica del proceso de atención es la discriminación de estímulos, ya que el medio que nos rodea es un bombardeo de estímulos sensoriales en donde se le puede asignar más interés a estímulos novedosos o que representen algún peligro a eventos relevantes para el organismo. Los procesos de atención están estrechamente ligados a procesos sensoriales, motores, cognoscitivos y emocionales que permiten proponer estrategias de supervivencia y aprendizaje de las experiencias en el largo plazo, así como la memoria a corto y largo plazo. Siendo la atención el primer proceso para las funciones cognoscitiva superiores, la coordinación de los subprocesos implicados resulta importante para la conducta apropiada, en donde la relación debe de estar organizada de forma espacial y temporal, al mismo tiempo que se integre con el complejo emoción cognición, para resultar una experiencia coherente y unificada. En la interacción de los organismos con el medio en el que viven se presentan de manera progresiva por medio de atención y aprendizaje, por el cual el organismo adquiere conciencia de sí y de los estímulos, dando una mayor preferencia a los estímulos que han ganado importancia para el organismo (González-Garrido y Ramos-Loyo, 2006).

La memoria, por otro lado, es “un almacenamiento de información codificada gracias a procesos de asimilación perceptiva y conceptual” que implica una dimensión temporal (Covarrubias, 1994). El proceso de memorización principia por la entrada de un estímulo que aporta el medio ambiente y que afecta o impacta a los órganos receptores, esto permite que se efectuó una representación conceptual, por la cual, cuando se repite el estímulo, la

concepción del individuo permite una reacción más adecuada para el mismo estímulo en ocasiones futuras. Se puede distinguir dos tipos de memoria, la reciente y la remota. La memoria reciente se refiere a información que requiere un breve periodo de retención, en donde las respuestas son inmediatas al estímulo y es el puente entre el exterior del sujeto y el sistema cognitivo profundo, en ella se realiza la codificación y la elaboración de la información, para su posterior integración a la que el organismo ya posee. Por otro lado la memoria remota es la que mantiene información por largos periodos de tiempo, incluso de manera permanente, esta memoria se presenta inactiva en el organismo hasta que se presenta la demanda de una tarea determinada que hace necesaria su activación, retornando información a la memoria reciente y así dar lugar a su ejecución (Covarrubias, 1994).

*Estructuras cerebrales involucradas en el proceso de aprendizaje y memoria espacial*

En los mamíferos la formación y almacenamiento de la memoria depende de un sistema anatómico relacionado con estructuras dentro del lóbulo medial temporal, el sistema límbico y su interacción con la neocorteza. La formación de la memoria depende del funcionamiento del hipocampo y las estructuras antes mencionadas, la integridad funcional ha demostrado ser un prerequisite para la adquisición normal de información proveniente de los estímulos del medio ambiente. El hipocampo es la estructura del almacenamiento temporal de la información que va a ser consolidada (Riedel y Micheau, 2001).

*a) Sistema límbico*

Integrado por el hipotálamo, partes del tálamo, la amígdala y el hipocampo entre otros, representa el papel de producción de emociones y conductas motivadas. Es el sitio del primer procesamiento de información proveniente de los estímulos y determina los

siguientes pasos en su procesamiento, ejemplos de esta dirección de las respuestas a partir de los estímulos son: la amígdala, que procesa estímulos de miedo y supervivencia, mientras que el hipocampo tiene la función de dar lugar al proceso de memoria, estímulos relevantes para el organismo en un futuro. Otra función importante del sistema límbico es la que ejecuta la Formación Reticular (FR), la cual es una red neuronal en la médula y el tronco cerebral que se ha asociado con la atención, alerta y algunos reflejos, dentro de la FR hay una parte llamada Sistema de Activación Reticular que activa la corteza cerebral. El tálamo por otro parte se encarga de enlazar la información sensorial hacia la corteza cerebral (Coon y Mitterer, 2008).

#### *b) Hipocampo*

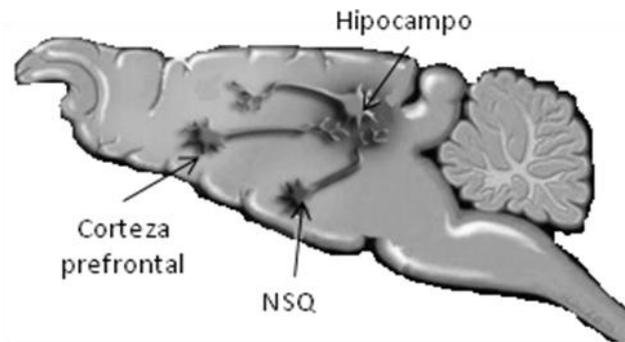
El hipocampo es la llave de la memoria y el aprendizaje, esta unidad funcional capta la información consciente que ha sido semánticamente interpretada, teniendo el papel de una memoria temporal, que se utiliza únicamente hasta que se completa el proceso de consolidación de memoria en alguna otra estructura cerebral, dando lugar a la memoria remota. Una acción importante del hipocampo es la formación de nuevos recuerdos (memoria) acerca de eventos experimentados, siendo nuevos eventos, lugares o estímulos. Parte de la evidencia que hay para sostener esta hipótesis, se basa en el estudio del daño a esta estructura, que se manifiesta por una gran dificultad aprender nuevas actividades, sugiriendo una incapacidad de memorizar y ejecutar en el futuro. Ya se ha demostrado que el hipocampo desempeña un papel importante en la memoria espacial y en la navegación, ya que *in vivo* se han registrado “campos de lugar”, es decir poblaciones de neuronas que se activan en determinados lugares espaciales, marcando una referencia de ubicación al individuo con un “mapa cognitivo”, es por esto que animales con lesiones en el hipocampo

tienen problemas en aprendizaje, retención a largo plazo y memoria espacial en actividades de encontrar metas espaciales (laberintos) (Bird y Burgess, 2008; Clark y cols., 2005; Morris y cols., 1982).

*c) Corteza prefrontal (CPF)*

Situada en el lóbulo frontal en la región anterior proximal, en los humanos está implicado en la respuesta del control motor de movimientos específicos como el movimiento de ojos, lenguaje y conducta. La CPF tiene conexiones prácticamente con todas las partes de cerebro, incluyendo el sistema límbico, estas intrincadas conexiones pueden activar o inhibir interacciones entre las diferentes redes del cerebro. Su funcionamiento se ha relacionado con la memoria reciente o memoria de trabajo, así como las conductas que requieren de atención, teniendo actividad específicamente en la zona dorsolateral. La región media de la CPF anterolateral es la parte más importante involucrada en los procesos cognoscitivos relacionados con la memoria, también es responsable de escoger y comparar estímulos, los procesos de toma de decisiones, mantener el estímulo en la memoria reciente y en la memoria remota, y de transferir información a la memoria episódica. Estudios recientes sugieren que la CPF juega un papel importante en las estrategias de codificación y recuperación de la memoria remota. Con esto, la interacción que existe entre la CPF y el lóbulo medio temporal (especialmente con el hipocampo), permite la transmisión de información que da como resultado la memoria remota, iniciando con la el almacenamiento de memoria reciente en el hipocampo, y que con las repeticiones o dependiendo de la intensidad del estímulo, la CPF codifica de tal manera que pueda establecerse la memoria remota, almacenando esa información que si es requerida en un futuro, pueda llevarse de

vuelta al hipocampo y así ejecutar la acción con información previamente almacenada (Erberk y Rezaki, 2007). (Ver Figura 4).

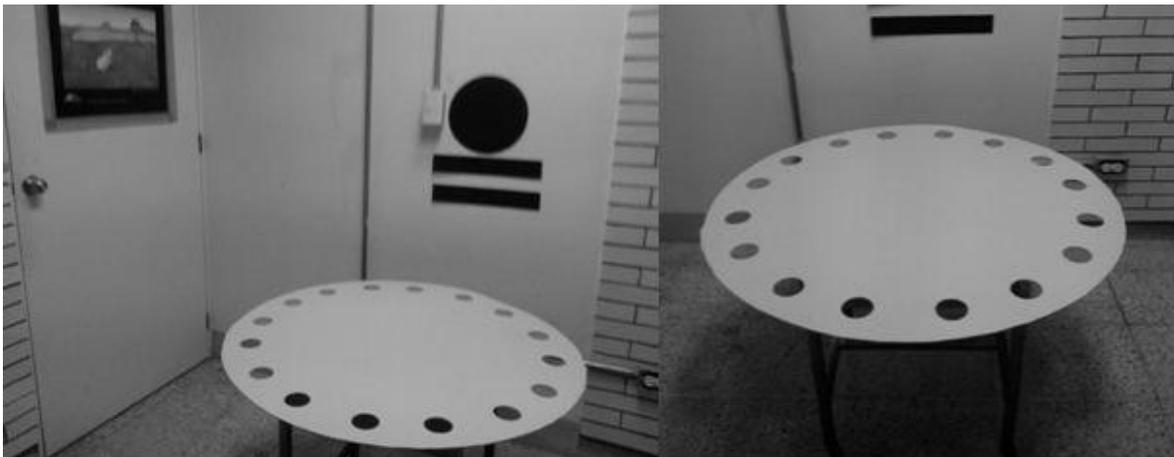


**Figura. 4. Relación de las estructuras importantes para la memoria y aprendizaje así como su vinculación a los ritmos diarios.**

4) Técnicas conductuales para el análisis del aprendizaje y la memoria espacial en el roedor (Laberintos)

Las primeras técnicas utilizadas en roedores para evaluar el aprendizaje y memoria se realizaron en 1948 por Edward Tolman, al observar que en ratas con restricción de alimento en un laberinto de caminos verdaderos y callejones sin salida, la tasa de error disminuía con el número de intentos, observando que cada vez que se ejecutaba la prueba por el individuo la información espacial le daba pistas de cómo resolver el laberinto cada vez más rápido. Desde entonces se han diseñado gran cantidad de laberintos para evaluar la memoria y el aprendizaje en roedores, y su aplicación depende de las características que uno quiere observar en el comportamiento de los individuos. Uno de los más usados en ratones es el Laberinto de Barnes (*Barnes maze*) diseñado por Carol Barnes en 1979, que consiste en una plataforma circular elevada con un número de agujeros en la periferia que permite a los sujetos de experimentación la exploración, en uno de los agujeros se presenta una caja de escape en donde por naturaleza los roedores encuentran un lugar seguro al ser cerrado y

oscuro, a comparación del campo abierto en el que se colocan (Figura 5). Se asume que los sujetos aprenden el lugar en donde se encuentra el orificio de salida (u orificio en donde está la caja escape) usando señales de referencia espacial que se colocan en el cuarto de experimentación, que son las claves espaciales externas al laberinto. El laberinto es utilizado para evaluar la memoria espacial en ratones y es una alternativa al laberinto de agua de Morris, el laberinto más común utilizado en memoria espacial en roedores, sin embargo el de Barnes es menos ansiogénico al no tener contacto el animal con el agua. Este laberinto se utiliza especialmente para observar daños en el hipocampo y en las estructuras referentes a la memoria reciente y memoria remota, partiendo del rendimiento en la ejecución de los ensayos (reforzamiento) y las pruebas finales (Harrison y cols., 2006; Barnes, 1979).



**Figura. 5. Laberinto de Barnes en el laboratorio de Biología Animal Experimental de la Facultad de Ciencias.**

### *Nicotina y el desarrollo del sistema nervioso central*

Al igual que los humanos, los roedores son animales altriciales, teniendo como característica que el desarrollo de su SNC se completa después del nacimiento y requieren de los cuidados maternos en el periodo postnatal temprano (Davis, 1992). 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.

Es bien sabido que durante el desarrollo del SNC, se lleva a cabo una cascada de señalizaciones a partir de neurotransmisores, que actúan a nivel celular y de la arquitectura del SNC. Es por esto que el consumo de sustancias que tienen efecto en estos eventos críticos, tienen repercusiones a largo plazo. La exposición prenatal de nicotina en el desarrollo, produce cambios a largo plazo en el desarrollo del cerebro y comportamiento en los individuos. El principal efecto directo de la nicotina en el desarrollo del cerebro en el feto se produce en los receptores de nicotin-acetilcolina (nAChRs) o nicotínicos (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 (Crandall y cols., 2007). La exposición a la nicotina provoca que las consecuencias vayan más allá de la disfunción colinérgica, hay estudios que han demostrado que la exposición a la nicotina altera la señalización dopaminérgica en el cerebro fetal, y esta señalización dopaminérgica desempeña un papel clave en la regulación del desarrollo del cerebro fetal (Bhide, 2009).

En particular los receptores nAChRs 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).

En los nAChRs 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. Los receptores nAChRs regulan los aspectos críticos de la maduración del cerebro durante los periodos prenatales, postnatales tempranos y adolescencia, y durante estas ventanas de desarrollo, regulan o permiten el cambio de subunidades de composición en las estructuras neuronales, especialmente en la diferenciación y sinaptogénesis, que son las sensibles a estímulos ambientales (Dwyer y cols., 2009). Durante el desarrollo tardío, la acetilcolina promueve el cambio de la replicación a la diferenciación y modula la sinaptogénesis, en esto se ha observado que la nicotina tiene un efecto en el cerebro fetal, específicamente en la inducción 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.

Todos los eventos antes mencionados del respuesta a través de los nAChRs 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 nAChRs (Wickstrom, 2007).

### *Nicotina y la formación del hipocampo*

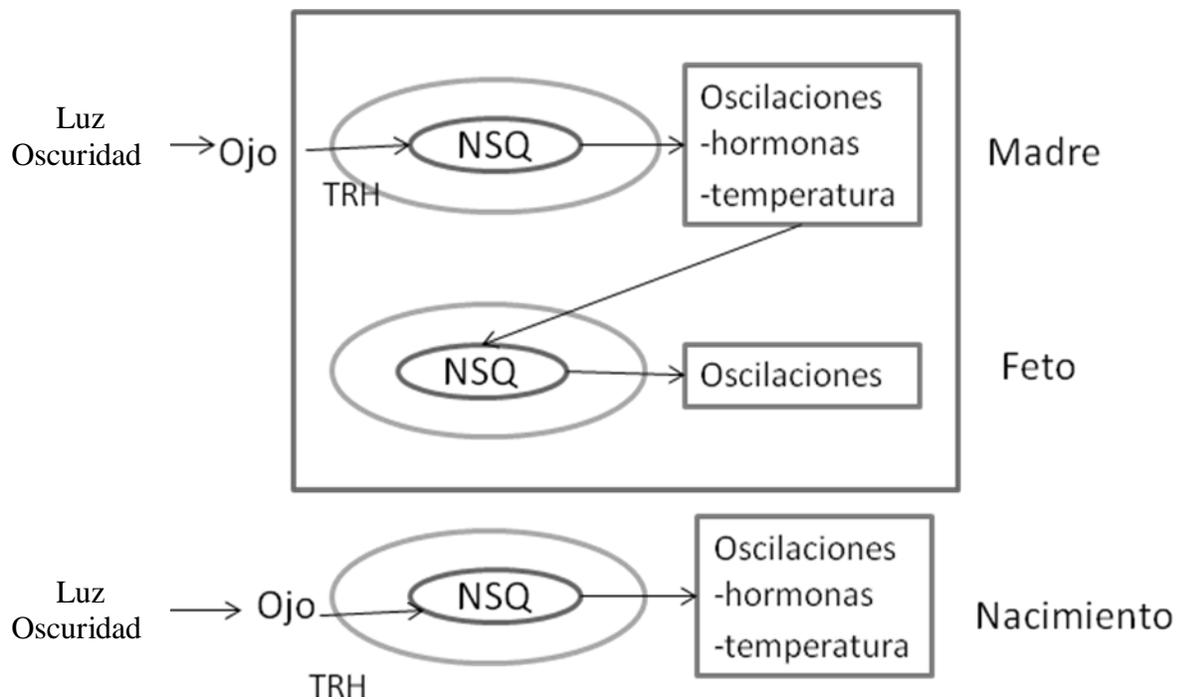
El hipocampo es una estructura clave en los procesos de memoria, atención y aprendizaje (Jarrad, 1995) y tiene una gran cantidad de inervaciones colinérgicas además y de nAChRs. Muchos estudios han demostrado que la exposición perinatal a la nicotina en roedores y humanos afecta las funciones cognitivas, sugiriendo que una activación excesiva de nAChRs por nicotina durante la maduración del cerebro, interfiere en el desarrollo de las áreas del cerebro que involucran los procesos de memoria y aprendizaje (Le Magueresse y cols., 2006). La formación del hipocampo empieza a establecerse durante el tercer trimestre de gestación en humanos (primeros 20 días en ratas), este periodo está caracterizado por el rápido crecimiento del cerebro, y se desarrolla hasta la segunda semana postnatal en humanos, en donde se dan cambios en los neurotransmisores excitadores; en este momento los niveles de plasticidad del cerebro en desarrollo están determinados por los factores ambientales (vgr. estrés, la desnutrición y las drogas) teniendo efecto profundo en el crecimiento del cerebro y en sus conexiones. La función principal de los nAChRs en el hipocampo es la formación y combinación de las poblaciones celulares, así como el desarrollo de las neuronas piramidales e interneuronas, que forman complejas conexiones en capas piramidales, así mismo contribuyen indirectamente (a través de GABA como molécula señal secundaria de interacción con los nAChRs) a la formación de los circuitos hipocámpicos ya que permite un control negativo de expresión, que en etapas tardías del desarrollo del hipocampo permite la maduración que es fundamental en el circuito hipocámpico en la adultez (Dwyer y cols., 2009). Los nAChRs tienen efectos diferentes dependiendo del tiempo de perturbación en los periodos críticos para las diferentes estructuras neuronales, la nicotina por su parte es un activador de estos receptores, la administración de nicotina prenatal tiene efecto en la estructura de la corteza y del

hipocampo, mientras que la administración durante las etapas tempranas postnatales incrementa las uniones de alta afinidad en el hipocampo, tálamo y corteza (Dwyer y cols., 2009).

#### *Nicotina y el desarrollo del sistema circadiano*

El sistema circadiano puede resumirse en un sistema formado por un reloj biológico (ubicado en el NSQ en mamíferos) que recibe señales externas del ambiente y que manda señales que comandan los ritmos circadianos a los órganos o estructuras blanco del cuerpo, formado por un sistema neuronal que permite una adaptación predictiva de los individuos a las alteraciones reproducibles de 24 hrs día/noche del planeta, generando los ritmos circadianos que se presentan en todas las funciones fisiológicas. Las complejas interacciones del reloj biológico con otros núcleos del cerebro, sistemas nerviosos autónomos y efectores periféricos que son gobernados por ritmos circadianos, formando un ritmo temporal interno de funciones en segmentos de 24 horas.. El daño en este reloj biológico resulta en perturbaciones cognitivas y de comportamiento, y estas perturbaciones se pueden dar desde su desarrollo neuronal en etapas tempranas del desarrollo. La evidencia sugiere que durante el desarrollo fetal el sistema circadiano es inmaduro, y no presenta las oscilaciones de expresión como en la vida adulta o postnatales, en particular en los mamíferos altriciales.

Está bien establecido que durante el desarrollo del feto, las señales externas provienen de las señales maternas que van al NSQ fetal, siendo principalmente ritmos de actividad sueño-vigilia, temperatura, frecuencia cardiaca, y ciclos de melatonina, dopamina, cortisol, estradiol y progesterona, los que tienen efecto directo (Serón-Ferré y cols., 2001) (Figura 6).



**Figura. 6. Resumen de las interacciones de sincronización madre y feto en desarrollo, en donde las señales de la madre sirven para sincronizar los ritmos del feto en desarrollo, una vez pasado en nacimiento las señales ambientales permitan la independencia de las señales provenientes de la madre. TRH: tracto retino hipotalámico.**

La administración de nicotina en adultos, ha demostrado tener efecto directo sobre parámetros fisiológicos como frecuencia cardiaca, temperatura corporal, la actividad locomotriz, y más aún, que en dosis repetidas diarias, los parámetros de estos ritmos se ven alterados por periodos que dependen del tiempo de administración (Pelissier y cols., 1998). También existe evidencia en roedores de que la suministración de estimuladores colinérgicos en el NSQ, como la nicotina, inducen grandes cambios de fase en el comportamiento en el ritmo circadiano 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, decrece el sueño y la eficiencia del sueño, somnolencia diurna y somnolencia nocturna, sugiriendo una importante influencia en el sistema circadiano y otros sistemas como el endocrino y el inmune (O'Hara y cols., 1998). Por esta evidencia, se puede concluir que la administración de nicotina durante el periodo de gestación, y básicamente en todo el periodo perinatal, tiene efecto en las señales de entrada del NSQ fetal en desarrollo, y puede resultar afectado en su capacidad de respuesta a señales ambientales una vez que se enfrenta a ellas inmediatamente después del parto y en la vida adulta.

#### *Nicotina y el núcleo supraquiasmático*

Durante el desarrollo del NSQ la cascada de señalización génica es de suma importancia, así como el establecimiento de las variaciones cíclicas de expresiones génicas, dentro de los mRNA más importantes de expresión génica para la generación y mantenimiento de los ritmos está c-fos, que es un gen controlado por el reloj biológico, su labor fundamental es la de la comunicación entre neuronas y que si tiene una sobre expresión puede generar desfase en la expresión de los ritmos. 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 c-fos y otros genes están estrechamente asociados al cambio de fase del reloj circadiano, ya sea por estimulación lumínica o con señalizadores colinérgicos como la nicotina. Otra consecuencia en el desarrollo del NSQ es producida por la señalización de los receptores nAChR, por ser un señalizador de maduración de los sistemas colinérgicos en el cerebro y el sistema circadiano, teniendo efecto desde la migración de neuronas,

provocando la nicotina una maduración prematura del sistema colinérgico, posiblemente provocando cambios a largo plazo en el NSQ fetal (O'Hara y cols., 1999).

#### **4. Planteamiento del problema**

Los organismos interactúan con su medio ambiente de manera directa, manifestando ritmos biológicos como un resultado de mecanismos adaptativos internos que ayudan a responder de manera adecuada y anticipada al ambiente externo cíclico. Sin embargo, para poder responder de forma adecuada al ambiente cíclico y cubrir sus necesidades vitales, es necesario un óptimo desarrollo morfológico, fisiológico y conductual. Es por esto que la ontogenia de un organismo se lleve a cabo un desarrollo óptimo, ya que presentar a factores nocivos que tengan efecto sobre el desarrollo, provocaría daños en el SNC con alteraciones en la forma de respuesta a los estímulos externos.

La exposición a la nicotina en mujeres gestantes en la actualidad está en aumento, esto tiene consecuencias a nivel desarrollo del embrión, ya que la naturaleza de la nicotina le permite traspasar la capa placentaria perjudicando la maduración de cada una de las partes que integran el SNC en el feto en desarrollo, afectando funciones cognoscitivas superiores y de control circadiano.

Socialmente, el consumo del cigarro ha sido fomentado en las últimas décadas, con éste el aumento del consumo de nicotina en consumidores activos y pasivos, teniendo un efecto sobre mujeres en gestación, especialmente en el feto en desarrollo, siendo un factor no genético que afecta al desarrollo y maduración del SNC, comprometiendo estructuras involucradas en las funciones de memoria y aprendizaje en etapas posteriores de vida. Por

lo que es necesario conocer los efectos que producen la nicotina sobre el SNC en desarrollo y el control circadiano.

### **5. Hipótesis**

Si la administración perinatal de nicotina produce alteraciones sobre el desarrollo de estructuras del SNC y el control circadiano como la formación del hipocampo, el NSQ y la CPF, las cuales son importantes para algunos procesos conductuales y fisiológicos, entonces los daños ocasionados por la nicotina sobre las estructuras mencionadas afectarán el desempeño y la distribución temporal de los ritmos diarios de aprendizaje y memoria espacial, en términos de duración y eficiencia de ejecución.

### **6. Objetivo Generales**

- Determinar los efectos que produce la administración perinatal de nicotina en la comparación diaria de los procesos circadianos de aprendizaje y memoria espacial de ratones albinos juveniles (BALB/c) en términos temporales y de eficiencia de ejecución.

### **7. Objetivos Particulares**

- Obtener las curva de eficiencia de memoria reciente espacial y memoria remota espacial en la descendencia de ratones con administración perinatal de nicotina.
- Determinar con el laberinto de Barnes si hay alteraciones en la eficiencia de aprendizaje del grupo con administración perinatal nicotina.
- Determinar el ritmo diario de la eficiencia de memoria reciente espacial debido a la condición de administración perinatal de nicotina y compararlo con el grupo control.

- Determinar el ritmo diario de la eficiencia de memoria remota espacial debido a la condición de administración perinatal de nicotina y compararlo con el grupo control.
- Comparar y analizar los resultados de los 2 grupos en sus dos espacios temporales de ejecución.

## **8. Material y Método**

### a) Animales

Para obtener los grupos experimentales se emplearon 20 hembras de ratón albino BALB/C), las cuales fueron divididas en dos grupos de 10 organismos cada uno: 1) el Co se le mantuvo en condiciones de bioterio con agua y alimento *ad libitum* durante todo el periodo de pre-, gestación y lactancia, y 2) administración de nicotina en agua 10 días antes de, durante la crusa, la gestación y la lactancia, con alimento *ad libitum*. Al nacimiento las camadas fueron estandarizadas a 8 crías y al destete, en el día 21 postnatal, se separaron por género y condición de tratamiento y se les administró agua y alimento *ad libitum* hasta el momento del experimento o sacrificio.

Para el protocolo experimental únicamente se utilizaron machos, con el fin de evitar influencias de los ciclos hormonales de las hembras. Se utilizaron 64 machos juveniles (30 días de nacidos) de ratón albino (cepa BALB/C) tomadas del bioterio de la Facultad de Ciencias que se separaron en dos grupos: 32 Control (Co) y 32 expuestos a administración perinatal de nicotina (Ntp), con 32 machos cada uno (ver Esquema 1). Los ratones mantuvieron en un fotoperiodo de 12:12 LD (6:00 hrs encendido de luz y 18:00 hrs apagado de luz) con una temperatura entre 20 y 24 °C durante todo el desarrollo de los grupos y en las pruebas conductuales. Las manipulaciones en la fase de oscuridad se

realizaron con una luz roja tenue con el fin de evitar influencia lumínica en su comportamiento.



**Esquema 1. Resumen de la obtención de grupos Co y Ntp desde antes de la concepción hasta el destete el día de comienzo de los entrenamientos.**

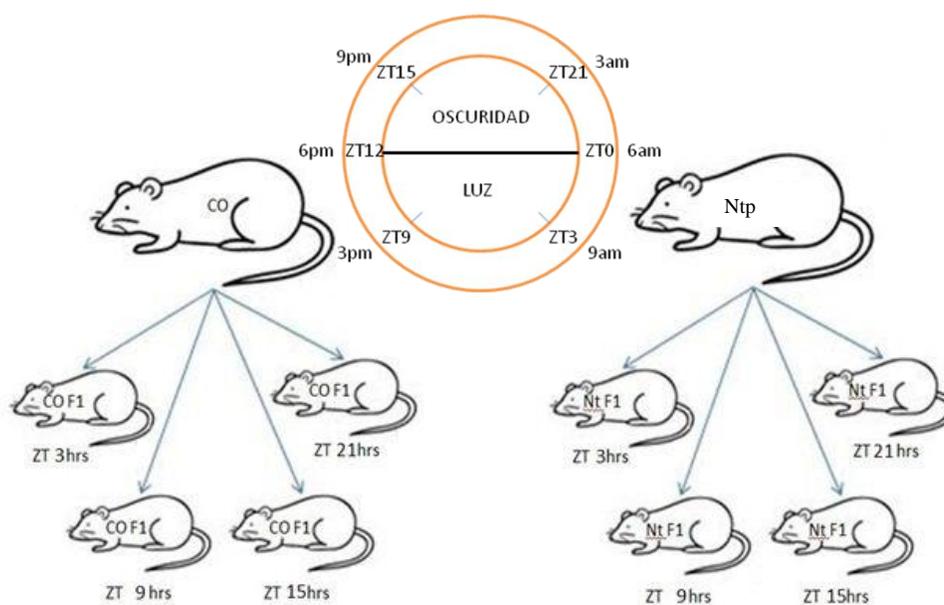
b) Método de administración de Nicotina y obtención de grupos

La dosis para la administración de nicotina fue basada en trabajos anteriores (Slotkin y cols.1995; Huang y cols., 2006), la cual fue de 6mg/kg/día de nicotina, y se proporcionó en el agua según Pietila (2000). La administración se llevó a cabo en todo el periodo perinatal, es decir, desde 10 días antes de la cruce y se mantuvo hasta el destete de los machos para la experimentación (30 días de nacidos). Se obtuvieron resultados similares en talla, peso, aparición de pelo y apertura de ojos al comparar estas características con las de otros experimentos de administración perinatal de nicotina crónica (Ajarem y Ahmad, 1998).

De forma paralela el grupo Co se mantuvo en condiciones normales de bioterio hasta el destete a los 30 días de nacidos.

Después del nacimiento, se formaron 4 subgrupos Co y Ntp con n=8 cada uno, los cuales ejecutaron la prueba en diferentes horarios en relación el encendido y apagado de las luces (Figura 7).

- ZT3 (09:00 hrs) horario en el cual el encendido de las luces lleva 3 hrs.
- ZT9 (15:00 hrs) horario en el cual el encendido de las luces lleva 9 hrs.
- ZT15 (21:00 hrs) horario en el cual el apagado de las luces lleva 3 hrs.
- ZT21 (3:00 hrs) horario en el cual el apagado de las luces lleva 9 hrs.



**Figura 7. Representación de la obtención de los grupos y la asignación de los diferentes horarios del día a partir de la activación y desactivación del sincronizador (luz).**

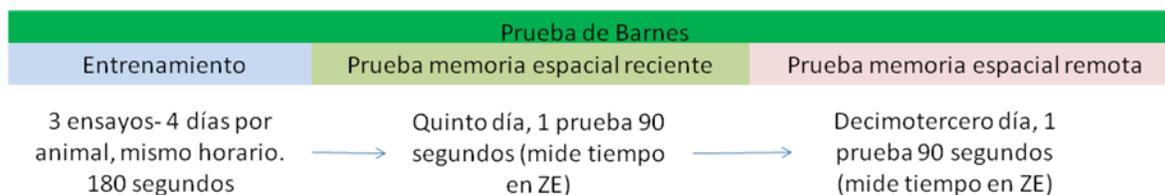
## 9. Procedimiento de registro

### a) *El laberinto de Barnes*

Cada grupo llevó a cabo la prueba en el laberinto de Barnes, modificado para ratones su horario establecido. El laberinto de Barnes consiste en una plataforma circular blanca con agujeros en la periferia interior, en el cual sólo hay una salida para el roedor en un habitáculo oscuro en alguno de los agujeros (zona de escape). La tarea radica en la preferencia innata de los roedores a la oscuridad, ya que presentan fobia a las zonas abiertas, mientras se introduce un factor estresante, el cual en nuestro caso fue un ruido de 60 decibeles de intensidad. Los sujetos de estudio deben aprender la ubicación de una zona de escape (ZE) al campo abierto usando señales visuales presentes en el cuarto de prueba. Con estas características es posible evaluar la memoria espacial en los roedores. Una característica importante de este laberinto, que evalúa el desempeño de los sujetos en una tarea de memoria espacial, es la posibilidad de correlacionar el desempeño con daños en el hipocampo (Harrison y cols., 2006).

La tarea consistió en 3 ensayos de entrenamiento por animal por día durante 4 días, con una duración de 3 minutos por ensayo en donde se esperó que el animal encontrara la ZE, una vez que esto sucedió, se le mantuvo en el habitáculo por un minuto, manteniendo un periodo de 15 minutos entre ensayos de los animales. Al quinto día se realizó una prueba final de memoria reciente espacial con una duración de 90 segundos, para determinar eficiencia de aprendizaje y memoria espacial, en donde se quita el habitáculo respuesta y se toma el tiempo (latencia) que el individuo está en ZE, con esto se pueden obtener datos de la certeza de los individuos al realizar la prueba. Ocho días después de la prueba de memoria espacial reciente se realizó otra vez la prueba final con el fin de evaluar la

memoria remota espacial. Las pruebas se llevaron a cabo durante un día en cuatro horarios (ZT= 3; ZT=9; ZT=15; ZT=21) a lo largo del día para poder registrar posibles momentos de variación y poder comparar los resultados de los dos grupos, esto es, para poder determinar cómo es su eficiencia y hacer una curva de eficiencia con duración de un día, para esto se formaron cuatro grupos por tratamiento de N=8. (ver Esquema 2).



**Esquema 2. Resumen de la aplicación de la prueba de memoria espacial en el laberinto de Barnes.**

*b) Registro de datos en ZE*

Se utilizó el sistema de registro en video ANY-maze (Stoelting CO, USA) para tomar el tiempo en cada una de las zonas del laberinto de Barnes y posteriormente comparar las eficiencias en la realización de la prueba entre el grupo experimental y el control.

**10. Análisis de datos**

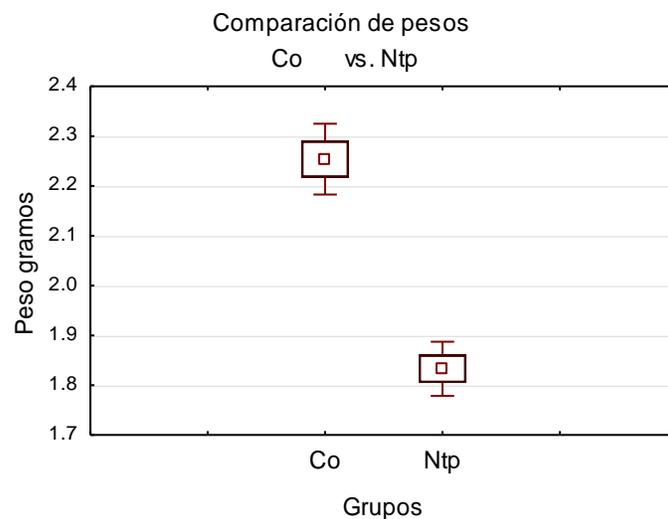
Los resultados se analizaron con la prueba estadística de COSINOR, utilizando el programa COSANA (Benedito-Silva, 1996) y Chronos-Fit (Zuther y Lemmer, 2004) los cuales se utilizan para analizar ritmos que no presentan una frecuencia marcada. Estos programas utilizan ajustes mediante senos y cosenos para determinar una señal sinusoidal y así calcular acrofase, mesor, y amplitud. La ritmicidad en términos estadísticos está dada por el valor P; si  $P < 0.05$ , entonces significa que hay ritmicidad. Las curvas de ritmicidad se obtuvieron para cada animal y posteriormente en grupo de las pruebas finales de memoria reciente y memoria remota. Las diferencias significativas fueron determinadas por la

prueba de ANOVA para comparar grupos en el paquete estadístico de STATGRAPHICS Centurion XVI.

## 11. Resultados

### Pesos de las camadas

Se obtuvieron pesos al nacimiento y al día del destete, en diferentes sujetos y al azar para determinar la certeza del modelo experimental, obteniendo una diferencia significativa en las crías al nacimiento y a los 30 días de edad postnatal. Se uso una *t de Student*, la cual determinó que el grupo Ntp registró pesos más bajos en ambas edades, con respecto al Co ( $P=0.0001$ ) (Figura 8).



**Figura 8. Comparación de pesos al nacer en ambos grupos, comprobando el bajo peso al nacer del grupo Ntp**

### Aprendizaje y Memoria reciente espacial

Los resultados de las pruebas realizadas con el laberinto de Barnes en la prueba de memoria reciente espacial en cada uno de los horarios ZT se presentan en la Figura 9.

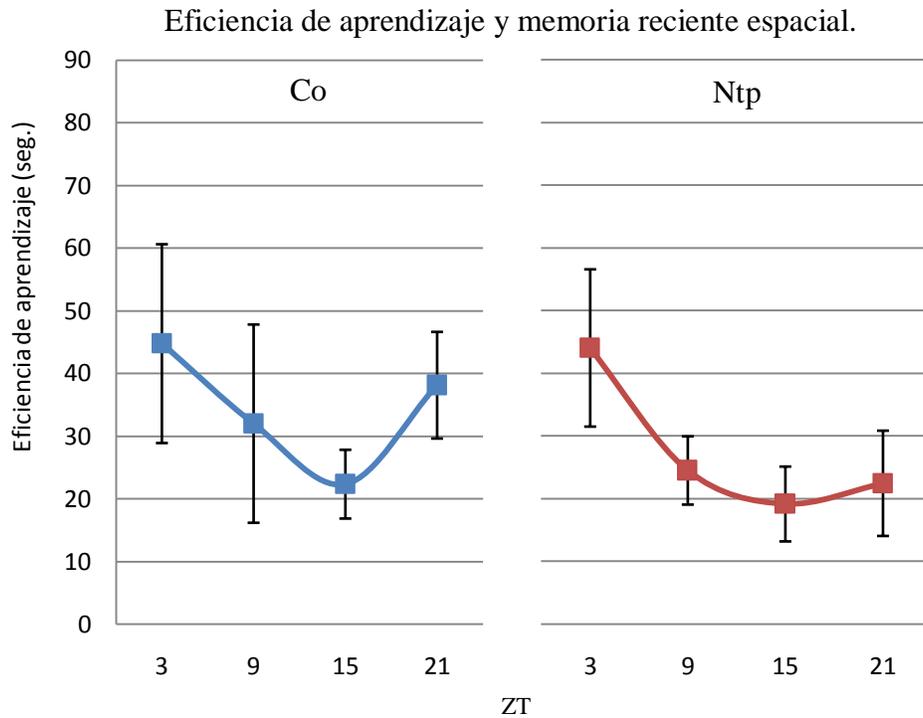


Figura 9. Distribución temporal de la eficiencia de aprendizaje y memoria reciente espacial en los grupos Co (izquierda) y Ntp (derecha).

Se observa en los resultados que los dos grupos presentan distintas eficiencias de aprendizaje y memoria reciente espacial dependiendo de la hora de ejecución de la prueba, esto se corroboró con la prueba estadística de ANOVA.

El análisis ANOVA realizado en el grupo de **Control (Co)** en los diferentes horarios indica que hay una diferencia entre las *medias* de los horarios de las pruebas (valor de P: 0.0082), así mismo la diferencia se comprobó con la prueba de LSD (Least Significant Difference) de Fisher (Tabla 1).

\* indica una diferencia significativa.

Método: 95.0 porcentaje LSD

Co	Casos	Media	Grupos Homogéneos
ZT15	8	22.325	X
ZT9	8	27.7984	XX
ZT21	8	38.125	X
ZT3	8	44.7625	X

Contraste Co	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ZT3 - ZT9		6.9641	13.3648
ZT3 - ZT15	*	22.4375	13.3648
ZT3 - ZT21		6.6375	13.3648
ZT9 - ZT15		5.47344	13.3648
ZT9 - ZT21		-10.3266	13.3648
ZT15 - ZT21	*	-15.8	13.3648

Tabla 1. Resumen estadístico realizado para determinar la diferencia entre los horarios de las pruebas en el grupo Co

También se realizó estadística para las medianas (Kruskal-Wallis) de los diferentes horarios por dos métodos estadísticos diferentes, obteniendo en los dos casos valores de P menores a 0.05, considerando que las medianas de los grupos son diferentes entre sí (valor de P = 0.0100645).

Con estos análisis se puede constatar que la eficiencia de memoria reciente espacial presenta un ritmo de diario en los grupos Co en donde el pico de eficiencia diaria de memoria reciente espacial se presenta entre ZT21 y ZT3 en el periodo de oscuridad de los animales (coincidiendo con sus hábitos nocturnos), mientras que el mínimo de eficiencia diaria de memoria reciente espacial se encuentra en el ZT15.

El análisis ANOVA realizado en el grupo de administración perinatal de **Nicotina (Ntp)** en los diferentes horarios indica que hay una diferencia entre las *medias* de los horarios de las pruebas (valor de P = 0.00001), así mismo la diferencia se comprobó con la prueba de LSD (Least Significant Difference) de Fisher (Tabla 2).

Método: 95.0 porcentaje LSD

\* indica una diferencia significativa.

Ntp	Casos	Media	Grupos Homogéneos
ZT15	8	19.15	X
ZT21	8	22.45	X
ZT9	8	24.5	X
ZT3	8	44.05	X

Contraste Ntp	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ZT3 - ZT9	*	19.55	9.41243
ZT3 - ZT15	*	24.9	9.41243
ZT3 - ZT21	*	21.6	9.41243
ZT9 - ZT15		5.35	9.41243
ZT9 - ZT21		2.05	9.41243
ZT15 - ZT21		-3.3	9.41243

Tabla 2. Resumen estadístico realizado para determinar la diferencia entre los horarios de las pruebas en el grupo Ntp

También se realizó estadística para las medianas (Prueba de Kruskal-Wallis) de los diferentes horarios por dos métodos estadísticos diferentes, obteniendo en los dos casos valores de P menores a 0.05, considerando que las medianas de los grupos son diferentes entre sí (valor de P = 0.0060012).

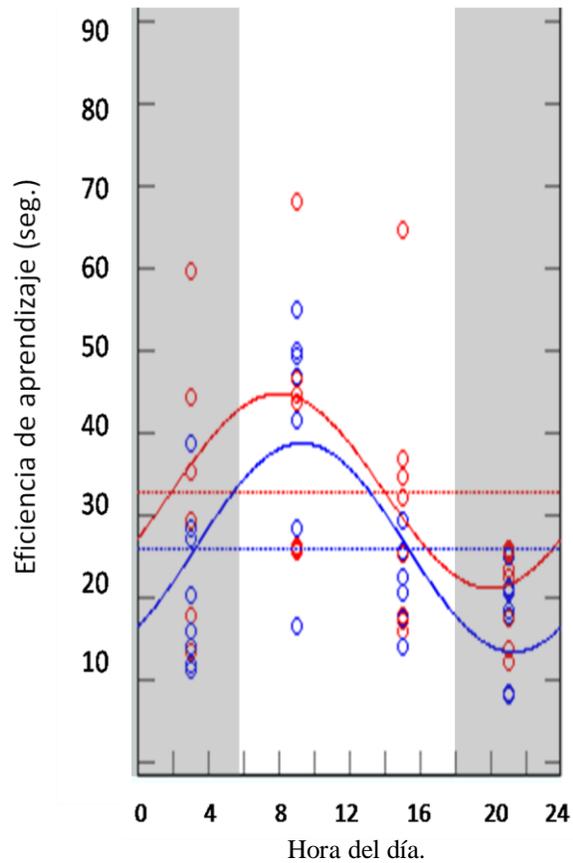
Con estos análisis se puede constatar que la eficiencia de memoria reciente espacial presenta un ritmo de diario en el grupo Ntp en donde el pico de eficiencia diaria de memoria reciente espacial se presenta entre ZT21 y ZT3 en el periodo de oscuridad de los animales (coincidiendo con sus hábitos nocturnos y extendiéndose al principio de la lumínica), mientras que el mínimo de eficiencia diaria de memoria reciente espacial se encuentra en el ZT15 en el inicio de la fase oscura del fotoperiodo, sin embargo a diferencia del grupo Co, este mínimo de eficiencia se prolonga hasta ZT21 en los ratones Ntp.

En lo que a homogeneidad se refiere en los grupos Co y Ntp, se puede observar con la desviación estándar que la variabilidad en los grupos Co es mucho mayor que en los grupos de Ntp.

En el análisis con el estadístico de COSINOR se demuestra la presencia de un ritmo diario de aproximadamente 24 horas en ambos grupos (Figura. 10), en donde se puede apreciar un desfase en la acrofase del ritmo de ambos grupos, en donde el grupo Ntp tiene un atraso de 1.33 hrs con respecto al grupo Co.

Figura 10. Abajo: características de los ritmos presentados en las pruebas por el grupo Co y Ntp. Derecha: grafica del ritmo obtenida a partir del análisis de COSINOR en los grupos Co (rojo) y Ntp (azul).

	Co	Ntp
Mesor	34.3	27.5
Amplitud	11.631	12.492
Acrofase	7.98	9.31
Valor- p	0.0119	0.0001
% ritmo	26.35	46.33



También se observan en los resultados una eficiencia de memoria reciente espacial casi similar en el aprendizaje espacial de ambos grupos, tanto en Co como en Ntp. Presentan diferencias de aprendizaje en los diferentes horarios, esto indica que hay horarios en los que el aprendizaje es mejor en comparación con otros; sin embargo, al momento de comparar los datos en el mismo horario, estadísticamente los grupos Co y los grupos Ntp no presentan diferencias significativas, esto nos dice que en memoria reciente espacial el insulto de la administración perinatal de nicotina no tiene un efecto significativo en comparación con los grupos Co, a pesar de que la media de los grupos Ntp haya sido menor en algunos horarios.

### Aprendizaje y Memoria remota espacial

Los resultados de las pruebas realizadas con el laberinto de Barnes en la prueba de memoria remota espacial en cada uno de los horarios ZT se presentan en la Figura 11.

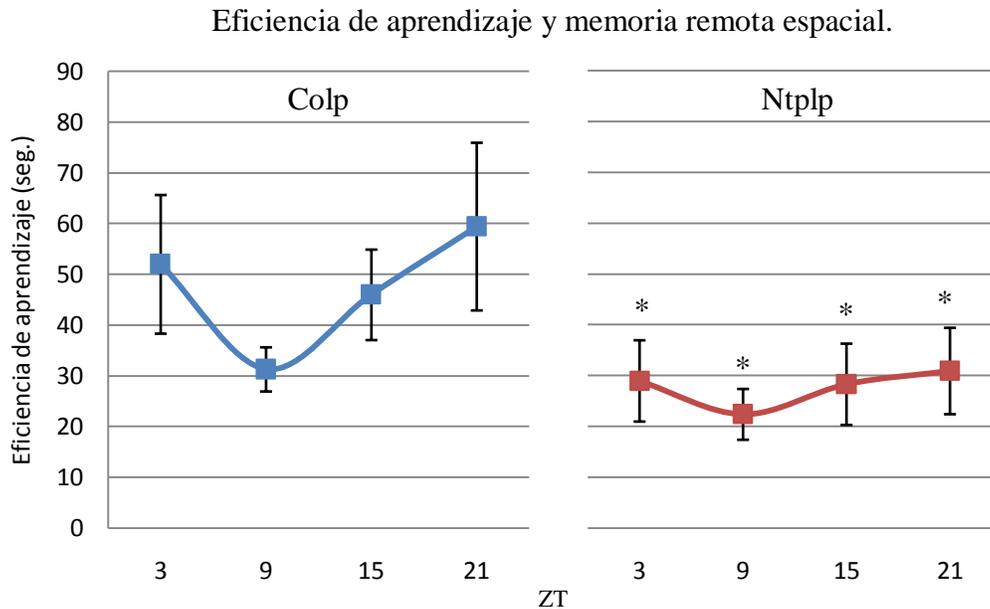


Figura 11. Distribución temporal de la eficiencia de aprendizaje y memoria remota espacial en el grupo Colp (izquierda) y Ntplp (derecha),

Se observa en los resultados que los dos grupos presentan distintas eficiencias de aprendizaje y memoria remota espacial dependiendo de la hora de ejecución de la prueba, esto se corrobora con la prueba estadística de ANOVA.

El ANOVA realizado en el grupo de **Control de memoria remota espacial (Colp)** en los diferentes horarios en la prueba de memoria remota espacial indica que hay una diferencia entre las *medias* de los horarios de las pruebas (valor- $P=0.006$ ), así mismo la diferencia se comprobó con la prueba de LSD (Least Significant Difference) de Fisher (Tabla 3).

\* indica una diferencia significativa.

Método: 95.0 porcentaje LSD

Colp	Casos	Media	Grupos Homogéneos
ZT9	8	31.4425	X
ZT15	8	47.74	X
ZT3	8	51.975	X
ZT21	8	59.4	X

Contraste Colp	Sig.	Diferencia	+/- Límites
ZT3 - ZT9	*	20.5325	15.1543
ZT3 - ZT15		4.235	15.1543
ZT3 - ZT21		-7.425	15.1543
ZT9 - ZT15	*	-16.2975	15.1543
ZT9 - ZT21	*	-27.9575	15.1543
ZT15 - ZT21		-11.66	15.1543

Tabla 3. Resumen estadístico realizado para determinar la diferencia entre los horarios de las pruebas en el grupo Colp

También se realizó estadística para las medianas (Prueba de Kruskal-Wallis) de los diferentes horarios por dos métodos estadísticos diferentes, obteniendo en los dos casos valores de P menores a 0.05, considerando que las medianas de los grupos son diferentes entre sí (valor de P = 0.00494952).

Con estos análisis se puede constatar que la eficiencia de memoria remota espacial presenta un ritmo de diario en el grupo control (Colp) en donde el pico de eficiencia diaria de memoria reciente espacial se presenta entre ZT21 y ZT3 en el periodo de oscuridad de los animales (coincidiendo con sus hábitos nocturnos), mientras que el mínimo de eficiencia diaria de memoria remota espacial se encuentra en el ZT9.

En la eficiencia de memoria remota espacial el grupo control presentó de igual forma que en la memoria reciente un ritmo diario, sin embargo en estas pruebas la eficiencia mínima de memoria espacial se presentó en ZT9 (a diferencia de la memoria reciente que fue en ZT15), mientras que el máximo se presenta entre ZT21 y ZT3 de igual forma, pero más hacia al final de la fase oscura.

El ANOVA realizado en el grupo de administración perinatal de **Nicotina en memoria remota espacial (Ntplp)** en los diferentes horarios indica que no hay una diferencia entre

las *medias* de los horarios de las pruebas (valor de  $P = 0.4603$ ), dando como resultado una homogeneidad entre los horarios de ejecución de la prueba.

La comparación entre grupos de Colp y Ntplp en cada horario de la prueba, muestran una diferencia estadísticamente significativa utilizando la prueba estadística de *t de Student* (Tabla 4).

Horario	ZT3	ZT9	ZT15	ZT21
Valor de P	0.0140979	0.01781	0.0148465	0.000686102

Tabla 4. Resumen estadístico realizado para determinar la diferencia entre los grupos Colp y Ntplp en cada uno de los horarios.

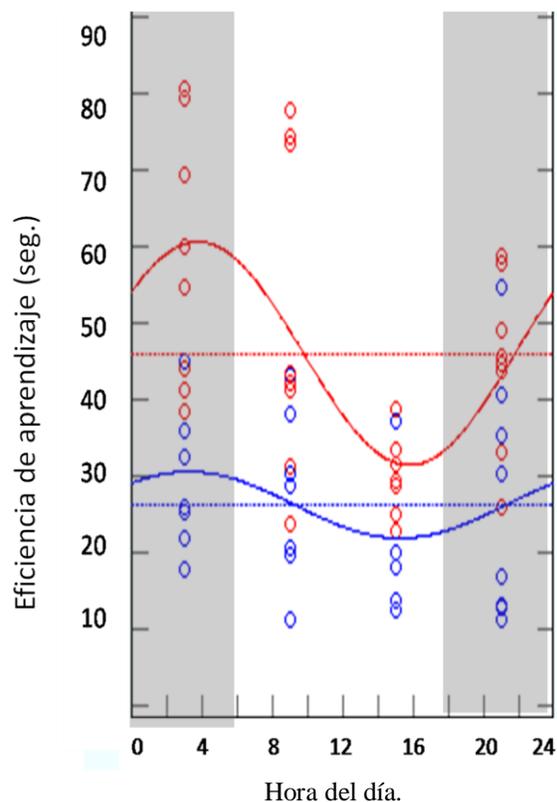
Indicando que en todos los horarios, el insulto de la administración perinatal de nicotina tiene un efecto negativo en la eficiencia de memoria espacial, ya que disminuye la capacidad de consolidación de la memoria remota.

En lo que a homogeneidad refiere en el grupo Colp y Ntplp, se puede observar que la variabilidad en los grupos Colp es mucho mayor que en los grupos de Ntplp.

En el análisis con el estadístico de COSINOR se demuestra la presencia de un ritmo diario de aproximadamente 24 horas en el grupo Colp, mientras que en el grupo Ntplp se atenúa el ritmo, dando como resultado que el análisis no describa un ritmo diario (Figura. 12).

Figura 12. Abajo: características de los ritmos presentados en las pruebas por el grupo Colp y Ntplp. Derecha: grafica del ritmo obtenida a partir del análisis de COSINOR en los grupos Colp (rojo) y Ntplp (azul).

	Colp	Ntplp
Mesor	47.2	27.7
Amplitud	14.374	4.275
Acrofase	3.8	3.3
Valor-p	0.0018	0.3066
% ritmo	35.24	---



En la comparación del grupo Colp y el de Ntplp se pueden observar cambios considerables en la eficiencia en memoria remota espacial, ya que se presenta una disminución en todos los horarios en el grupo de nicotina a comparación del grupo control.

La comparación entre los grupos nos indica una limitante en la consolidación de memoria en el grupo de nicotina perinatal, atenuando el ritmo diario del grupo Ntplp, sin embargo, el momento de acrofase resulta ser similar, con atraso de 0.5 horas con respecto al grupo Colp.

## 12. Discusión

En la actualidad, por la forma de vida de los humanos, el estudio de las sustancias de consumo y abuso diario ha tomado un papel importante en la investigación, esto se debe a que muchas veces la adicción puede más que la salud física y mental. Especialmente existen grupos vulnerables en la población que están expuestos a estas sustancias que, por otro lado, se ha demostrado que tienen efectos negativos durante el desarrollo, entre los grupos más susceptibles se encuentran las mujeres gestantes, los recién nacidos, niños y adolescentes (WHO, 2011; Wickstrom, 2007). La nicotina es la sustancia cuyo consumo ha aumentado en las últimas décadas de manera exponencial en todas las clases sociales y en todo el mundo, tiene efectos sobre las personas, ya sean consumidores activos o pasivos. Los estudios sobre nicotina en el desarrollo perinatal han sido muchos, demostrando efectos negativos en el desarrollo del SNC hasta una muerte prematura (Wickstrom, 2007).

En este trabajo se realizó un estudio en un campo inexplorado, el ritmo diario en memoria espacial, mediante un paradigma de memoria espacial, en el cual la formación hipocámpica y la corteza prefrontal son necesarias, con el objetivo de determinar si la administración perinatal de nicotina tiene algún efecto en la eficiencia de aprendizaje y memoria espacial en los ratones. Los efectos sobre la eficiencia en memoria reciente espacial en los ratones juveniles no muestra una diferencia significativa al comparar los grupos Co y Ntp, esto sugiere que el proceso homeostático de eficiencia de aprendizaje y memoria reciente espacial no se ve afectado por la interacción con la nicotina durante el desarrollo del SNC, este resultado puede deberse a la naturaleza de la prueba en el laberinto de Barnes, ya que las repeticiones del ejercicio pueden permitir que los ratones que sufrieron el insulto de la administración perinatal de nicotina alcancen eficiencias similares a la de los ratones Co.

Sin embargo, el análisis de homogeneidad de los grupos (las diferencias en la desviación estándar) indica que el grupo Co presenta una mayor plasticidad funcional, que le permitiría ajustarse a los cambios horarios y a la prueba conductual a la que fue sometido, en tanto que el grupo Ntp pudiera ser menos plástico a estos cambios, impidiendo una mejor ejecución de la tarea de memoria espacial. Estas diferencias entre grupos se puede deber al impacto de la nicotina sobre el desarrollo de las diferentes estructuras del SNC involucradas en la resolución de esta tarea (hipocampo, corteza prefrontal y NSQ), modificando las conexiones y la capacidad de respuesta de las poblaciones y circuitos neuronales entre ellas (Dwyer y cols., 2009).

Por otro lado, la memoria remota espacial presenta una diferencia significativa entre los grupos control memoria remota espacial (Colp) y Nicotina prenatal memoria remota espacial (Ntplp). En los horarios analizados de Colp, aquéllos que registraron la eficiencia de memoria remota espacial menor son significativamente superiores a cualquier punto de eficiencia de memoria remota espacial en Ntplp. En estos grupos se observan los resultados del análisis de homogeneidad de grupos, muy similares a los registrados en la memoria reciente, lo cual refuerza la idea de que la plasticidad funcional le permite a los animales controles resolver un estímulo y adaptarse a nuevas condiciones para su ejecución más adecuada; mientras que el grupo Ntplp se presenta limitado en su adaptabilidad a nuevos estímulos o tareas a resolver, en este caso en particular, presentan una disminución en la eficiencia de la prueba, sugiriendo una deficiencia en la capacidad de evocar recuerdos o en su consolidación (Levin y cols., 1996).

En lo que respecta al ritmo diario de memoria espacial, se comprobó su existencia con la prueba de COSINOR, en ambos grupos en la prueba de memoria reciente; se observó un

ritmo con duración cercana a 24 horas; sin embargo, los ratones Ntp en comparación con el grupo Co, presentaron un retraso en el ritmo diario de aproximadamente 1.5 horas, esto puede deberse a una deficiencia en la sincronización con los estímulos ambientales. Es interesante notar que, las acrofases de ambos grupos se encuentran en el principio de la fase lumínica, esto puede deberse a una adaptación evolutiva de aumentar la atención en los momentos donde son más visibles a los depredadores, ya que estos ratones son nocturnos.

El análisis de ritmo en la memoria remota presenta una oscilación bien marcada en el grupo Colp, mientras que en los ratones Ntplp se atenúa demasiado de manera que es difícil que se considere un ritmo. Esto puede ser efecto de la deficiencia de consolidación por el insulto de la administración de nicotina perinatal, o por una falla de conexión entre el centro regulador de los ritmos y las vías de evocación de recuerdos (Dwyer y cols., 2009).

Una diferencia interesante entre los grupos controles en las memoria reciente y memoria remota, es que el momento en dónde se obtuvo mayor eficiencia de memoria reciente no coincide con el momento de mayor consolidación, si no que hay una diferencia de 4.1 horas, esto sugiere que los mecanismos de atención y consolidación se modifican dependiendo de las necesidades de los individuos, dando como resultado mejores momentos para aprender y otros para tener una supervivencia “más activa”. Estos ritmos diarios de eficiencia de memoria concuerdan con lo sugerido por Durán y cols. (2011), de que si se presenta un insulto durante el desarrollo, éste provocara anomalías en la expresión de los ritmos de diarios de las funciones cognoscitivas.

Los resultados obtenidos hacen indispensable el estudio de los efecto de las sustancia de consumo diario actuales, como ejemplo esta la nicotina, que tiene efectos desde la concepción hasta el destete en los ratones, involucrándose en todas las etapas de neurodesarrollo, desde señalización hasta maduración del sistema nervioso central. En este

contexto, los periodos críticos del desarrollo que afecta son varios, a pesar de que las dosis que se utilizaron fueron bajas (simulando a un fumador pasivo), la interacción con estos receptores nicotínicos tiene repercusiones a largo plazo en el desarrollo del SNC, esta interacción puede ser la responsable de falta de consolidación de memoria recurrente al haber una maduración diferencial, recordando que tanto la serotonina como la acetilcolina son dos de los neurotransmisores involucrados en la señalización y la maduración del sistema nervioso central en desarrollo (Bhide, 2009).

El estudio sobre los efectos de uso y abuso de sustancias es un campo emergente debido a las tendencias poblacionales de incrementar estas actividades. Este estudio aborda el consumo no regulado de una de las sustancias más consumidas a nivel mundial y que ha incrementado los vehículos de ingesta, la nicotina es una sustancia que se consigue de manera fácil y económica, con la característica de ocasionar adicción. Este trabajo presenta una evidencia clara de los efectos de la exposición perinatal a la nicotina sobre la memoria y su ritmo diario de eficiencia, proporcionado mayor información a los expertos en el desarrollo embrionario y pediátrico sobre las consecuencias y los efectos que la nicotina suministrada en las etapas de mayor riesgo del desarrollo del SNC en particular y el organismo en general producen sobre los sistemas de atención, aprendizaje y memoria y aquellas estructuras que los controlan. Finalmente, sin ser consumidores directos el riesgo que posee la progeñie en deficiencias cognoscitivas en el corto, mediano y largo plazo de su ciclo vital, provocado por un insulto durante la gestación y desarrollo temprano.

### 13. Conclusiones

- Existe un ritmo diario de aprendizaje y memoria espacial en ratones juveniles controles (normales), cuya acrofase se presenta al principio de la fase lumínica.
- Existe un ritmo diario de aprendizaje y memoria espacial en ratones juveniles sometidos a administración perinatal de nicotina (Ntp), con su acrofase al principio de la fase lumínica.
- La acrofase de la eficiencia de evocación en la memoria reciente en ratones Ntp presenta un retraso de 1.5 hrs al compararlo con el grupo control.
- La memoria reciente espacial en ratones Ntp puede alcanzar misma eficiencia que el grupo control, en base a repeticiones.
- La eficiencia de ejecución de la prueba de memoria remota espacial mantiene una distribución temporal diaria en los ratones controles presentando su acrofase al final de la fase oscura.
- En los ratones Ntp el ritmo diario de ejecución de la prueba de memoria remota espacial se atenúa, sugiriendo deficiencias en el funcionamiento cognoscitivo, especialmente en conexiones entre hipocampo y corteza pre frontal, las cuales expresan receptores colinérgicos de tipo nicotínico.

Por lo tanto, con este trabajo se concluye que la administración perinatal de nicotina, en particular durante el desarrollo del sistema nervioso central, produce un retraso de fase en la distribución temporal diaria de eficiencia de aprendizaje, así como una atenuación de ésta en la ejecución de la memoria remota o a largo plazo, en una prueba espacial hipocampo dependiente en el laberinto de Barnes, sugiriendo que el NSQ, la corteza prefrontal y el hipocampo fueron comprometidos *in utero* ante la exposición de nicotina materna, y las alteraciones en este circuito se mantienen al menos en el mediano plazo.

#### 14. Bibliografía

- Ajarem, J. S., y Ahmad, M. *Prenatal nicotine exposure modifies behavior of mice through early development*. Pharmacology Biochemistry & Behavior 1998 Vol. 59(2): 313–318.
- Aschoff J. *Masking and parametric effects of high-frequency Light-Dark Cycles*. Review of Japanese Journal of Physiology 1999 Vol. 49(1), 11-18.
- Barnes, C.A. *Memory deficits associated with senescence a neurophysiological and behavioral study in the rat*. Journal of Comparative Physiology & Psychology 1979 Vol. 93 (1), 74–104
- Benedito-Silva A. Programa para análisis temporal en microcomputadora COSANA versión 3.1. Grupo multidisciplinario de desarrollo de ritmos biológicos. Departamento de fisiología y biofísica 1996. Ciudad universitaria. San Paulo, Brasil.
- Bhide, P.G. *Dopamine, cocaine and the development of cerebral cortical cytoarchitecture: a review of current concepts*. Seminars in Cell and Developmental Biology 2009 Vol. 20(4):395– 402
- Bird, C.M., y Burgess, N. *The hippocampus and memory: insights from spatial processing*. Nature Reviews Neuroscience 2008 Vol. 9(3)182-194
- Clancy, B., Kersh, B., Hyde, J., Darlington R.B., Anand, K.J. y Finlay, B.L. *Web-Based method for translating neurodevelopment from laboratory species to human*. Neuroinformatics 2007 Vol. 5(1): 79-94
- Clark, R.E., Broadbent, N.J. y Squire L.R. *"Hippocampus and remote spatial memory in rats"*. Hippocampus 2005 Vol. 15 (2): 260–72.

- Clegg, D.A., O'Hara B.F., Heller, H.C. y Kilduff, T.S. *Nicotine administration differentially affects gene expression in the maternal and fetal circadian clock*. Developmental Brain Research 1995 Vol. 84(1): 46-54.
- Coon, D. y Mitterer, J.O. *Introduction to psychology: gateways to mind and behavior*. Twelfth edition. Cengage Learning inc. 2008 USA pp 622
- Covarrubias, S. *La memoria y su relación con el aprendizaje*. Sinéctica 4, 1994, ene-jun. Guadalajara.
- Crandall J.E., McCarthy D.M., Araki K.Y., Sims J.R., Ren J.Q. y Bhide P.G. *Dopamine receptor activation modulates GABA neuron migration from the basal forebrain to the cerebral cortex*. Journal of Neuroscience 2007 Vol. 27(14):3813–3822.
- Daan S. y Beersma D. *Biological Rhythms: Circadian Frequency and its variability*. Narusa Publishing House 2002. Nueva Delhi, India.
- Darlington R.B., Clancy B., Finlay B.L. y Anaud K.J. *Extrapolating brain development from experimental species to humans*. Neurotoxicology 2007 Vol. 28(5). 931-937.
- Dobbing, J. *Effects of experimental undernutrition on development of the nervous system*. Malnutrition, Learning and Behaviour- Boston: M.I.T. Press 1968: 181-202.
- Dobbing. J. . *Early nutrition and later achievement*. Proceedings of the Nutrition Society 1990 Vol. 49(2): 103-118.
- Dunlap J.C., Loros, J.J. y DeCoursey P.J., y. 2004. *Chronobiology, Biological Timekeeping*. Sinauer Associates 2004: pp 382.

- Durán P., Miranda –Anaya M., Romero M.J., Mondragon-Soto K. y Cintra L. *Time-place learning is altered by perinatal low-protein malnutrition in adult rat.* Nutritional Neuroscience 2011 Vol. 14 (4): 145-150.
- Dwyer J.B., McQuown S.C. y Leslie F.M. *The Dynamic Effects of Nicotine on the Developing Brain.* Pharmacology Therapy 2009 Vol. 122(2): 125-139.
- Erberk N. y Rezaki M. *Prefrontal Cortex: Implications for Memory Functions and Dementia.* Turkish Journal of Psychiatry 2007. Vol 18(3): 262-269..
- Escobar C. *Motivación y conducta; sus bases biológicas.* Revista Mexicana de Neurociencia 2002 Vol. 3(1):63
- Finlay B.L. y Darlington R.B. *Linked regularities in the development and evolution of mammalian brains.* Science 1995 Vol 268 (5217): 1578-1584.
- Golombek D. A. *Cronobiología Humana: en busca del tiempo perdido.* Fisiología de los Ritmos Biológicos. En II Curso Latinoamericano de Cronobiología (Memorias). Facultad de Ciencias. UNAM, 1997. pp 273-285
- González-Garrido A.A. y Ramos-Loyo J. *La atención y sus alteraciones: del cerebro a la conducta.* México: Manual Moderno 2006. - UdeG - UNAM.
- Harrison F.E., Reiser R., Tomarken A y McDonald M. *Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze.* Learning-Memory 2006 Vol 13(6):809-819
- Huang, L., Hsiao S.H., Trzeciakowski J., Frye G.D. y Winzer-Serhan U.H. *Chronic nicotine induces growth retardation in neonatal rat pups.* Life science 2006 Vol. 78(13): 1483-1493.

- Huang, LZ, Abbott L.C., Winzer-Serhan U.H. *Effects of chronic neonatal nicotine exposure on nicotinic acetylcholine receptor binding, cell death and morphology in hippocampus and cerebellum*. Neuroscience 2007 Vol. 146(4); 1854-1868.
- INSP (2010). *El Instituto Nacional de Salud Pública (INSP), presenta los resultados de la Encuesta Global de Tabaquismo en Adultos (GATS) México 2009*. Revisado el 6 de mayo de 2011, de: <http://www.insp.mx/noticias/boletines-de-prensa/207--resultados-encuesta-global-de-tabaquismo-en-adultos-2009.html>
- Jarrard L.E. *What does the hippocampus really do?* Behavioural Brain Research 1995 Vol. 71(1-2):1–10.
- Le Magueresse C., Safiulina V., Changeux J.P. y Cherubini E. *Nicotinic modulation of network and synaptic transmission in the immature hippocampus investigated with genetically modified mice*. Journal of Physiology 2006 Vol 576.2(Pt2): 533-546.
- Levin, E.D., Wilkerson, A. y Briggs S.J. *Prenatal nicotine effects on memory in rats: pharmacological and behavioral challenges*. Developmental brain research 1996. Vol. 97(2): 207-215.
- Martin J. A, *et al.* 2007. *Births: Final Data for 2005*. National Vital Statistics Reports 2007 Vol. 56 (6): 1-103.
- Mattson M. y Hauser K. *Spatial and temporal interaction of neurotransmitter signals in the development of neuronal circuitry*. Neurochemistry. 1991 Vol. 19(2); 17-24.

- Moore-Ede M.C. *Physiology of the circadian timing system: predictive versus reactive homeostasis*. American Journal of Physiology 1986 Vol. 250 (19); R735-R752.
- Morgane P.J., Austin-LaFrance R., Bronzino J., Tonkiss J., Díaz-Cintra S., Cintra L. *Prenatal Malnutrition and Development of the Brain*. Neuroscience and biobehavioral 1993 Vol. 17(1): 91-128.
- Morgane P.J., Mokier D.J. y Galler J.R. *Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation*. Neuroscience and Biobehavioral 2002 Vol. 26(4): 471-483, 2002.
- Morris R.G.M., Garrud P., Rawlins J.N.P. y O'keefe J. *"Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions"*. Nature 1982 Vol. 297 (5868): 681–83.
- O'Hara B., Edgar D.M., Cao V.H., Wiler S.W. *Nicotine and nicotinic receptors in the circadian system*. Psychoneuroendocrinology 1998 Vol 23 (2) :161-173.
- O'Hara B., Macdonald E., Clegg D., Wiler S.W., Andretic R. *Developmental changes in nicotinic receptor mRNAs and responses to nicotine in the suprachiasmatic nucleus and other brain regions*. Molecular brain Research 1999 Vol. 66(1-2):71-82.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). *Informe OMS sobre la epidemia mundial de tabaquismo; consecución de ambientes libres de humo de tabaco*. Publicaciones Propias OMS 2010. Ginebra, Suiza.
- Paramshwaran K., Buabeid M.A., Karuppagounder S.S., Uthayathas S., Thiruchelvam K., Shonesy B., Dityatev A., Escobar M.C., Dhanasekaran M. y Suppiramaniam V. *Developmental nicotine exposure induced alterations in*

*behavior and glutamate receptor function in hippocampus.* Cellular and Molecular Life Sciences 2012 Vol. 69(5):829-41

- Pelissier A.L *Chronopharmacological effects of nicotina repeated administration on the heart rate, body temperature and locomotor activity circadian rhythms in rats.* Life Science 1998. Vol. 63 (24):2189-2197.
- Pelissier A.L., Gantenbein M. y Bruquerolle B. *Nicotine-induces perturbations on heart rate, body temperature and locomotor activity daily rhythms in rats.* Journal of Pharmacy and Pharmacology 1998, Vol. 50(8): 929-934.
- Perreau-Lenz S., Pever P., Buijs R.M. y Kalsbeek A. *The Biological Clock: The Bodyguard of Temporal Homestasis.* Chronobiology International 2004 Vol. 21(1): pp 1-25.
- Pietilä K, Ahtee L. *Chronic nicotine administration in the drinking water affects the striatal dopamine in mice.* Pharmacology Biochemistry & Behavior. 2000 Vol. 66(1):95-103.
- Riedel G. y Micheau J. *Function of the hippocampus in memory formation: desperately seeking resolution.* Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 2001 Vol. 25(4):835-853.
- Rockville M.D. *How tobacco smoke causes disease: the biology and behavioral basis for smoking-attributable disease: a report of the Surgeon General.* Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, 2010: 704.
- Rodier P.M. *Vulnerable periods and processes during central nervous system development.* Environmental Health Perspectives 1994 Vol. 102(2): 121-124.

- Serón-Ferré M., Torres-Farfán C., Forcelledo M.L y Valenxuela G.J. *The development of Circadian Rhythms in the Fetus and Neonate*. Seminars in Perinatology 2001 Vol. 25 (6): pp 363-370.
- Slotkin T.A. *Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates*. Toxicology and Applied Pharmacology 2004 Vol.198(2):132–151.
- Slotkin T.A., Lappi S.E., McCook E.C., Lorber B.A. y Seidler F.J. *Loss of neonatal hipoxia tolerance after prenatal nicotine exposure: implications for sudden infant death syndrome*. Brain Research Bulletin 1995 Vol. 38(I): 69-75.
- Tong V. T., Jones J.R., Dietz P.M. y D'Angelo D. *Trends in Smoking Before, During, and After Pregnancy --- Pregnancy Risk Assessment Monitoring System (PRAMS)*. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). Center for Disease Control and Prevention 2009 United States.
- WHO (World Health Organization). *WHO report on the global tobacco epidemic, 2011: warning about the dangers of tobacco?* Publicaciones Propias WHO 2011. Ginebra, Suiza.
- Wickstrom, R. *Effects of Nicotine During Pregnancy: Human and Experimental Evidence*. Current Neuropharmacology 2007 Vol. 5(3):213-222.
- Yamazaki S. y Straume M. *Effect of aging on central and peripheral mammalian clock*. Neurobiology 2002 Vol. 99(16): 10801-10806.
- Zuther P. y Lemmer B., *Chronos-Fit 1.05* <http://www.ma.uni-heidelberg.de/inst/phar/lehre/chrono.html>, 2004.