



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN PRENATAL DE NICOTINA
SOBRE EL APRENDIZAJE ASOCIATIVO EN ETAPAS ADULTAS DE LA RATA:
IMPLICACIONES NEUROFUNCIONALES**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

AGUAYO DEL CASTILLO ALEJANDRA DE LA CONCEPCIÓN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Sánchez Castillo Hugo

Facultad de Ciencias, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Ayala Guerrero Fructuoso

Facultad de Ciencias, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Muñoz Delgado Jairo Ignacio

Facultad de Medicina, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. OCTUBRE, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN PRENATAL DE NICOTINA
SOBRE EL APRENDIZAJE ASOCIATIVO EN ETAPAS ADULTAS DE LA RATA:
IMPLICACIONES NEUROFUNCIONALES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

AGUAYO DEL CASTILLO ALEJANDRA DE LA CONCEPCIÓN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Sánchez Castillo Hugo

Facultad de Ciencias, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Ayala Guerrero Fructuoso

Facultad de Ciencias, UNAM

COMITÉ TUTOR: Dr. Muñoz Delgado Jairo Ignacio

Facultad de Medicina, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. OCTUBRE, 2016

OFICIO FCIE/DEP/633/2016

ASUNTO: Oficio de Jurado

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 22 de agosto de 2016 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biología Experimental** del (la) alumno (a) **AGUAYO DEL CASTILLO ALEJANDRA DE LA CONCEPCIÓN** con número de cuenta 303050151 con la tesis titulada "ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN PRENATAL DE NICOTINA SOBRE EL APRENDIZAJE ASOCIATIVO EN ETAPAS ADULTAS DE LA RATA: IMPLICACIONES NEUROFUNCIONALES", realizada bajo la dirección del (la) **DR. HUGO SÁNCHEZ CASTILLO**:

Presidente: DR. FEDERICO BERMUDEZ RATTONI
Vocal: DRA. PILAR DURÁN HERNÁNDEZ
Secretario: DR. FRUCTUOSO AYALA GUERRERO
Suplente: DR. ALFONSO BENITO ALFARO RODRÍGUEZ
Suplente: DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 10 de octubre de 2016



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



MCAA/MJFM/ASR/grf*

Agradecimientos

Agradezco el apoyo que permitió la realización de este trabajo y la continuación de mi formación académica:

Primeramente, al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A CONACYT, por la beca otorgada a los alumnos de Maestría que en apoyo a la realización del proyecto recibí con el número de CVU: 508903.

A los miembros del comité tutor:

Dr. Hugo Sánchez Castillo (tutor principal)

Dr. Fructuoso Ayala Guerrero

Dr. Jairo Ignacio Muñoz Delgado

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
1. Acetilcolina en aprendizaje y memoria	5
1.1. Receptores nicotínicos.....	10
2. Nicotina	21
3. Exposición prenatal a nicotina	27
4. Progesterona	32
4.1. Progesterona como neuroprotector.....	39
5. Justificación	40
6. Objetivos	41
7. Hipótesis	42
8. Método	43
8.1. Sujetos.....	43
8.2. Fármacos.....	43
8.3. Materiales e instrumentos.....	43
8.4. Diseño experimental.....	44
8.5. Procedimiento.....	44
8.5.1. Manipulaciones iniciales.....	44
8.5.2. Entrenamiento en discriminación visual.....	46
8.5.3. Pruebas con demoras variables.....	47
8.5.4. Evaluación de coordinación fina.....	47
8.5.5. Evaluaciones neuroanatómicas.....	47
8.6. Análisis de los datos.....	47
9. Resultados	50
9.1. Natalidad en el experimento y mortalidad de las crías por camada.....	50
9.2. Desarrollo.....	51
9.3. Adquisición de la discriminación visual.....	56
9.4. Pruebas con demoras variables.....	58
9.5. Coordinación fina.....	62
9.6. Características neuroanatómicas.....	63
10. Discusión	65
11. Conclusiones	75
12. Referencias	76

Resumen

La nicotina es un alcaloide derivado de las hojas de la *Nicotiana tabacum*, con acción agonista sobre los receptores nicotínicos colinérgicos y produce efectos estimulantes y depresores en el SNC, entre estos un incremento en los niveles de dopamina en el circuito neuronal del reforzamiento y en el sistema de opioides endógenos. Así mismo, la exposición fetal o neonatal al humo del tabaco y particularmente a nicotina, ha mostrado generar anomalías en el desarrollo y maduración del encéfalo en diferentes especies, afectando la sobrevivencia celular, sinaptogénesis y neurotransmisión. En modelos animales, la exposición prenatal a nicotina afecta negativamente la proliferación, diferenciación y especialización neuronal, presenta efectos neuroteratogénicos que resultan en deficiencias cognitivas y conductuales, así como un daño neuronal que se extiende hasta la adolescencia, particularmente en hipocampo, corteza cerebral y vías neuroquímicas, incluyendo el sistema colinérgico y las hormonas esteroides neuroactivas. En este sentido, se ha observado que el sistema colinérgico interactúa con el sistema endocrino en mamíferos y que la progesterona en el hipocampo dorsal de ratón, mejora la ejecución en una tarea de reconocimiento de objetos, pero la nicotina posnatal inhibe los efectos neuroprotectores de esta hormona en CA1 del hipocampo de ratas. Por ello, en el presente trabajo se analizó el efecto de la administración prenatal de nicotina sobre el aprendizaje asociativo y la memoria a corto plazo mediante una tarea de discriminación visual en ratas macho adultas, así como, el efecto de la administración de progesterona durante la adultez. Para lo cual, se entrenaron cuatro grupos: **1)** Control (n=11), **2)** Progesterona (n=8), al cual se le administró la hormona (1.0 mg/Kg, i.p.) durante tres semanas previas al entrenamiento en la tarea de discriminación, **3)** Nicotina pre- y perinatal (n=8), mediante infusión subcutánea en la madre (2.0 mg/Kg/día) durante la gestación (G7-PN7) y **4)** Nicotina prenatal con progesterona posnatal (Nic+Prog, n=8). Posteriormente, se evaluó la memoria mediante demoras variables (0, 2, 4, 8, 16 y 32 s), el volumen y peso del encéfalo, así como peso y talla de las crías. La exposición prenatal a nicotina no produjo diferencias sobre el aprendizaje, pero la progesterona disminuyó el número de sesiones requerido para la realización de la tarea ($p < 0.01$). En el grupo con Nicotina prenatal se observó deterioro en la pendiente para la curva de olvido ($F_{(3,31)} = 4.060$, $p < 0.05$) y en coordinación fina. Se encontró menor peso ($t_{(33)} = 6.537$, $p < 0.0001$) y talla ($t_{(33)} = 2.889$, $p < 0.01$) el día de nacimiento en el grupo con nicotina prenatal (n=16) respecto al grupo sin nicotina (n=19), pero el peso y el volumen del encéfalo adulto no presentaron diferencias entre los grupos. Estos resultados sugieren que la exposición prenatal a nicotina afecta el desarrollo, la memoria a corto plazo y la coordinación fina, pero no altera el aprendizaje de la tarea ni las dimensiones del encéfalo. Así mismo, la progesterona administrada durante la adultez, mejora el aprendizaje asociativo y revierte el efecto de la exposición prenatal a nicotina sobre la coordinación fina, sin embargo, la nicotina prenatal impide el efecto de la progesterona sobre aprendizaje.

Palabras clave: *Aprendizaje, memoria, nicotina pre- y perinatal, progesterona, ratas.*

Abstract

Nicotine is an alkaloid extracted from the *Nicotina tabacum* leaves, with an agonistic action on cholinergic nicotinic receptors and produces stimulating effects and depressants effects in the CNS, among these effects there are increases in dopamine levels in the reinforcement neuronal circuit and in the endogenous opioid system. Likewise, the fetal or neonatal exposure to the smoking snuff and particularly to nicotine has been shown to generate abnormalities in the development and maturation of the brain in different species, affecting cell survival, synaptogenesis and neurotransmission. In animal models of prenatal exposure to nicotine, has adversely affects been shown in the proliferation, differentiation and neuronal specialization as neurotheratogenics effects resulting in cognitive and behavioral deficits and neuronal damage, extending through adolescence and adulthood, particularly in the hippocampus, cerebral cortex and neurochemical pathways, including the cholinergic system and neuroactive steroid hormones. In this context, it has been observed that the cholinergic system interacts with the endocrine system in mammals and that progesterone in the dorsal hippocampus, improves performance in a task of object recognition in mice, but postnatal nicotine inhibits the neuroprotective effects of this hormone in rat hippocampus CA1. Therefore, in this study the effect of prenatal nicotine administration on associative learning and the short-term memory by a visual discrimination task in male adult rats was analyzed, as well as the effect of progesterone administration during adulthood. For this purpose four groups of rats were trained: **1)** Control (n=11), **2)** Progesterone (n=8), with the hormone (1.0 mg/Kg, i.p.) for three weeks before the training in the discrimination task, **3)** pre-and perinatal nicotine (n=8) administration (2.0 mg/Kg/day) by an infusion subcutaneous way in the mother during pregnancy (G7-PN7) and **4)** pre- and perinatal nicotine with progesterone postnatal (Nic+Prog, n=8). Subsequently, memory was assessed though variable delays (0, 2, 4, 8, 16 and 32 s), also assess the brain volume and weight, and offspring height and weight was determined. Prenatal exposure to nicotine did not produce differences on learning, but progesterone decreased the number of sessions required to acquisition of the task ($p<0.01$). In the nicotine group it was observed deterioration in the slope of the forgetting curve ($F_{(3,31)} = 4.060$, $p<0.05$) and fine coordination. Differences were observed in body weight ($t_{(33)} = 6.537$, $p<0.0001$) and height ($t_{(33)} = 2.889$, $p<0.01$) at today birth between groups without (n=19) and with prenatal nicotine (n=16), but not in weight and volume of the adult brain. These results suggest that prenatal exposure to nicotine affects the development, short-term memory and fine motor coordination, but does not alter task learning or the dimensions of the brain. Also, progesterone administered during adulthood, improves associative learning and reverses the effect of prenatal exposure to nicotine on fine coordination; however, prenatal nicotine impedes the effect of progesterone on learning.

Keywords: *Learning, memory, pre- and perinatal nicotine, progesterone, rats.*

Introducción

Los seres vivos se enfrentan constantemente a diversos cambios en el medio ambiente y han desarrollado habilidades que les permiten responder adecuadamente ante ello; estas características adaptativas involucran desde la organización molecular y celular hasta los procesos neurocognoscitivos o procesos superiores. El óptimo funcionamiento de estas características, puede alterarse gravemente como resultado de la interacción con moléculas exógenas como drogas de abuso, entre las cuales, se destaca a la nicotina por la diversidad de sus efectos y la alta tasa de su consumo a nivel mundial.

Se ha observado que la descendencia de madres fumadoras presenta diversas alteraciones fisiológicas, entre estas, cambios cardiorrespiratorios (Boychuk y Hayward, 2011), alteraciones en el patrón y organización del sueño (Stephan-Blanchard y cols., 2008), mayor incidencia de trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) (Biederman y cols., 2009) y deficiencias en dominios cognoscitivos (Cornelius y Day, 2009; Key y cols., 2007), incluyendo el aprendizaje y la memoria (Levin y cols., 1996), el procesamiento y la percepción de estímulos (Fried y Makin, 1987), así como en el proceso de discriminación de estímulos (Horst y cols., 2012). En modelos animales, especialmente en roedores, se ha observado que la exposición fetal o neonatal a nicotina genera anomalías en el desarrollo y maduración del cerebro, afectando la sobrevivencia celular, sinaptogénesis y neurotransmisión (Dwyer y cols., 2008; Ernst y cols., 2001), proliferación y diferenciación neuronal (Nasrat y cols., 1986), produce alteraciones neuroteratogénicas que resultan en deficiencias cognoscitivas y conductuales y daño neuronal que se extiende hasta etapas tardías en el desarrollo, particularmente en el hipocampo, la corteza cerebral y las vías neuroquímicas como colinérgicas, glutamatérgicas y dopaminérgicas (Roy y cols., 2002; Abreu-Villaça y cols., 2003).

Por otra parte, se ha observado que el sistema colinérgico interactúa con el sistema endocrino en mamíferos (Main y cols., 2010). La administración conjunta de estradiol y progesterona, dos hormonas esteroideas neuroactivas, revierten los

efectos amnésicos de antagonistas colinérgicos en un laberinto radial (Tanabe y cols., 2004). La infusión de progesterona en el hipocampo dorsal del ratón, mejora la ejecución en una tarea de reconocimiento de objetos (Orr y cols., 2009). Sumado a lo anterior, diversos estudios refieren que la progesterona tiene un efecto neuroprotector en humanos, modelos animales y celulares ante el daño por excitotoxicidad (Vanoye-Carlo y cols., 2008) e isquemia (Canal-Castro y cols., 2012). Sin embargo la nicotina inhibe los efectos neuroprotectores en CA1 del hipocampo de ratas, tras un episodio isquémico (Raval y cols., 2009).

A partir de estos antecedentes, la exposición prenatal a nicotina en mamíferos es capaz de producir alteraciones neurofisiológicas, conductuales y cognoscitivas durante etapas adultas, pero no se conoce si los efectos negativos de nicotina involucran y afectan significativamente a los procesos de aprendizaje y memoria involucrados en la discriminación de estímulos visuales, tampoco se ha evaluado si la progesterona es capaz de revertir el posible efecto negativo de la nicotina sobre la misma tarea, ni los correlatos neuroanatómicos asociados a ambas interacciones.

1. Acetilcolina en aprendizaje y memoria

Los procesos de percepción, cognición, emoción y control motor, requieren de la interacción de las experiencias del organismo en el ambiente y la maduración del sistema nervioso. Dicha interacción debe ser precisa y obedece a una serie de acontecimientos organizados y regulados, así la necesidad de interactuar con las fluctuaciones y variaciones ambientales exige que el organismo sea capaz de adquirir y almacenar nueva información, con el fin de utilizarla posteriormente para modificar y reorganizar su conducta de acuerdo a las demandas ambientales, en este contexto se destacan los procesos de aprendizaje y memoria. El aprendizaje, es el proceso para adquirir nueva información del medio y se puede definir como la modificación relativamente permanente de la conducta, dependiente de la experiencia, mientras que la memoria es el proceso necesario para almacenar y posteriormente, evocar dicha información (Squire y Zola, 1996).

Se ha descrito la relación entre diferentes sistemas cerebrales y procesos cognoscitivos, por ejemplo la formación del hipocampo participa de manera fundamental en el aprendizaje asociativo y la memoria explícita (Hasselmo, 1999, 2006), los ganglios basales con la memoria de procedimiento; el cerebelo y la amígdala con el condicionamiento clásico (aprendizaje asociativo) y las vías reflejas con el aprendizaje no asociativo (Squire y Zola, 1996), así mismo, la corteza frontal en su porción dorsolateral en primates y en el área medial en roedores, con la memoria de trabajo (Hasselmo y Stern, 2006). Existe abundante evidencia de la participación del sistema colinérgico sobre diferentes procesos fisiológicos y cognoscitivos como el neurodesarrollo, aprendizaje y memoria (Abreu-Villaça y cols., 2011; Albuquerque y cols., 1995, 2009; Attaway y cols., 1999; Givens y Olton, 1994; Hasselmo, 1999, 2006; Hasselmo y McGaughy, 2004; Klinkenberg y Blokland, 2010; Levin, 1992; Levin y cols., 1999, 2006; Squire y Zola, 1996; Stiver y cols., 2015; Terry y Buccafusco, 2003).

La ACh es una molécula pequeña, clasificada como amina cuaternaria constituida por un grupo amino y un átomo de nitrógeno con enlaces a cuatro grupos metilo

(Fig.1) (Feldman y cols., 1997). El sistema colinérgico es crítico en diversos aspectos morfológicos, fisiológicos y conductuales en vertebrados, como regulación de expresión génica, migración, diferenciación y proliferación celular, neurogénesis, gliogénesis, maduración neuronal, plasticidad sináptica, apoptosis, atención, aprendizaje y memoria, entre otros (Azam y cols., 2007; Abreu-Villaça y cols., 2011; Blood-Siegfried y Rende, 2010). Y está ampliamente distribuido en el sistema nervioso central, periférico, autónomo y entérico (Mesulam y cols., 1983; Woolf, 1991).

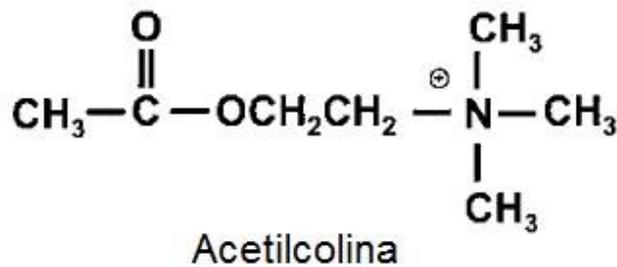


Fig. 1. Formula desarrollada de la molécula de la acetilcolina.

Es sintetizada en el citoplasma por la colina acetiltransferasa (ChAT) toma como sustrato a la acetil coenzima A (un producto de la mitocondria) y a la colina (un aminoácido), posteriormente es ingresada a las vesículas sinápticas por el transportador vesicular para acetilcolina (VAChT). Tras la liberación sináptica por exocitosis, la ACh es hidrolizada principalmente por la acetilcolinesterasa (AChE) resultando acetato y colina. Esta colina es recapturada a través del transportador con alta afinidad para colina (CHT) y reutilizada para la producción de más moléculas de ACh (Fig. 2) (Abreu-Villaça y cols., 2011; Feldman y cols., 1997).

Se distinguen dos tipos principales de receptores colinérgicos: ionotrópicos, llamados nicotínicos y metabotrópicos, conocidos como muscarínicos; se distinguen funcionalmente y son denominados según los alcaloides exógenos que interactúan de forma agonista con ellos: la nicotina y la muscarina, respectivamente. Ambos tipos de receptores presentan una distribución diferencial o expresión conjunta dependiendo del subtipo de receptor y el tipo celular en el que se encuentren, se pueden localizar tanto en la membrana presináptica como postsináptica y se encuentran, ampliamente distribuidos en el sistema nervioso

central (SNC) y periférico (SNP). Del receptor muscarínico se ha descrito 5 subtipos (M_1 a M_5), organizados según su perfil farmacológico e interacción con el metabolismo celular; mientras que el receptor nicotínico se clasifica según las subunidades que lo conforman y modifica la permeabilidad de la membrana para cationes (Feldman y cols., 1997; von Bohlen und Halbach y Dermietzel, 2006).

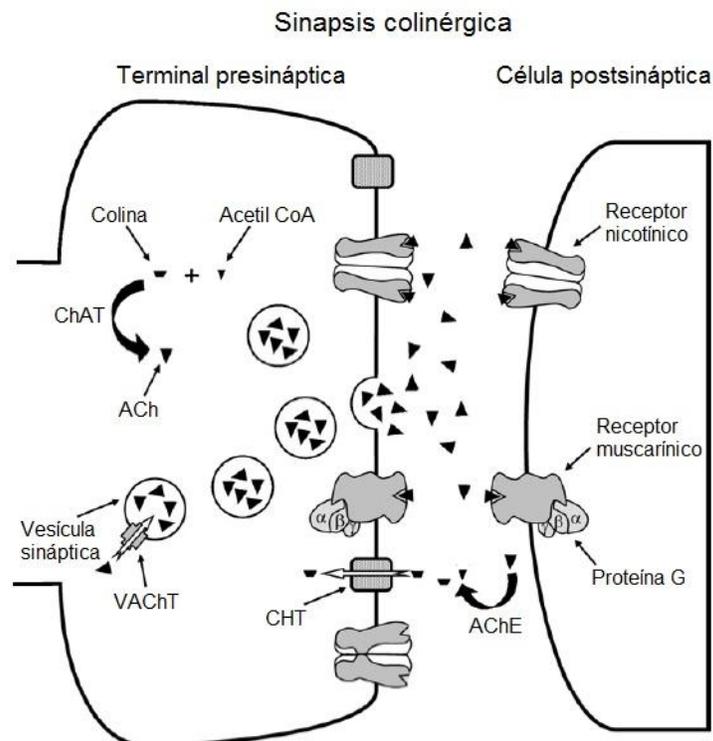


Fig. 2. Representación esquemática de una sinapsis colinérgica. Muestra los principales componentes a nivel molecular de este sistema de neurotransmisión. Modificado de Abreu-Villaça y cols., 2011.

El sistema colinérgico está constituido por dos tipos celulares: interneuronas y neuronas de proyección colinérgica. Las interneuronas colinérgicas se encuentran, principalmente en el estriado, hipocampo y la corteza cerebral y mantienen niveles tónicos de acetilcolina. Por otra parte, los núcleos de células de proyección colinérgica (Fig. 3) incluyen el *septum* medial y la banda diagonal de Broca, que proveen la más importante inervación colinérgica hacia el hipocampo, así como el núcleo basal magnocelular, en la rata (o núcleo basal de Meynert, en el humano) que proyecta hacia la corteza cerebral, la amígdala, núcleo *accumbens*, formación hipocámpal y corteza del cíngulo (von Bohlen und Halbach y Dermietzel, 2006; Mesulam y cols., 1983; Meeter y cols., 2004; Woolf, 1991).

Vías de proyecciones colinérgicas

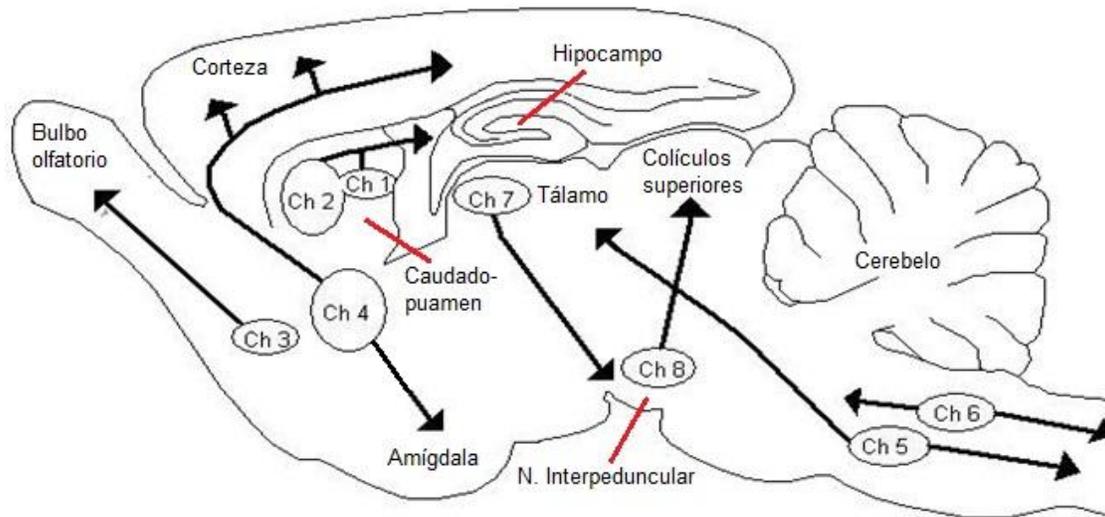


Fig. 3. Esquema de los núcleos colinérgicos y sus proyecciones en una vista sagital del encéfalo de rata. Ch 1: Núcleo del septum medial; Ch 2: Banda diagonal de Broca; Ch 3: Banda horizontal de Broca; Ch 4: Núcleo basal magnocelular; Ch 5 y Ch 6: Núcleos Tegmentales; Ch 7: Habénula y Ch 8 Núcleo Parabigeminal. Adaptado de von Bohlen und Halbach y Dermietzel, 2006; Mesulam y cols., 1983 y Woolf, 1991.

Para que los procesos de aprendizaje y memoria se lleven a cabo con éxito, el organismo debe ser capaz de: 1) detectar los estímulos, esto requiere sistemas, órganos, células, proteínas y cadenas de señalización intracelulares especializados para codificar un tipo particular de estímulo como longitud o frecuencia de ondas, moléculas solubles, etc., 2) percibir dicho estímulo, es decir, integrar e interpretar la información como rojo, tono agudo, sabor dulce, etc.; 3) asociar dos o más eventos (estímulos, respuestas, consecuencias, etc.), es decir identificar la relación entre ellos con el fin de seleccionar y 4) generar la conducta adecuada, ya sea orientación, evitación o no responder, lo que implica un mecanismo motor (flagelos o músculos y un sistema para la regulación de éstos a través de nervios, flujo de iones, etc.).

En mamíferos, la neurotransmisión colinérgica está implicada en diversos procesos cognoscitivos como el procesamiento sensorial, atención, aprendizaje y memoria (Abreu-Villaça y cols., 2011; Giocomo y Hasselmo, 2005; Hasselmo y McGaughy, 2004; Hasselmo, 1999, 2006; Meeter y cols., 2004; Schneider y cols., 2011). La evidencia obtenida mediante casos clínicos por ejemplo los pacientes con demencia tipo Alzheimer que presentan una importante deficiencia en

memoria y se relaciona con una lenta, gradual y progresiva degeneración del sistema colinérgico en núcleos del mesencéfalo basal y disfunción colinérgica en la corteza (Lendvai y cols., 2013; Terry y Buccafusco, 2003) y el uso de modelos animales en los cuales se realizan lesiones electrolíticas (Decker y cols., 1992), por aspiración, inyección de excitotoxinas (Hasselmo, 2006), inmunotoxinas (Dougherty y cols., 1998), entre otras, así como el uso de herramientas electrofisiológicas y farmacológicas, por ejemplo, la administración de escopolamina, un antagonista muscarínico no selectivo, impide la consolidación del aprendizaje asociativo, perjudica la conducta de exploración y deteriora los procesos de memoria explícita, espacial, de trabajo y de referencia (Givens y Olton, 1994; Hasselmo y Stern, 2006; Klinkenberg y Blokland, 2010). De manera complementaria, las estrategias encaminadas a mejorar la neurotransmisión colinérgica incluyen la administración de agonistas directos como colina, arecolina y nicotina (Impey y cols., 2013; Knott y cols., 2015; Stiver y cols., 2015).

Se ha demostrado que la vía emergente del núcleo basal magnocelular y sus proyecciones hacia el sistema límbico y corteza cerebral, así como el sistema emergente del complejo formado por la banda diagonal de Broca y el núcleo del *septum* medial que inervan hacia la formación hipocampal, están involucradas tanto en procesos de aprendizaje como de memoria (Givens y Olton, 1994; Hasselmo, 1999, 2006; Meeter y cols., 2004). La ACh en la formación hipocampal participa de manera fundamental para la consolidación y recuperación de la información explícita, específicamente en la corteza entorrinal, el giro dentado, CA1, CA3 y el *septum* medial (Meeter y cols., 2004). Distintos estudios indican que niveles altos de ACh permiten la adquisición de nueva información, en tanto que niveles bajos permiten la filtración de los recuerdos previamente almacenados (Hasselmo, 2006; Hasselmo y Stern, 2006). Por lo tanto, la disrupción en el sistema colinérgico a nivel central, repercute directamente en el deterioro de la memoria (Hasselmo, 1999), así, la codificación se ve afectada por la disminución de la acetilcolina, en cambio la consolidación y la recuperación pueden ser perjudicadas por el aumento de ACh (Hasselmo y Stern, 2006; Klinkenberg y Blokland, 2010).

1.1. Receptores nicotínicos

El receptor nicotínico es una proteína cuaternaria, pentámera, constitutiva de la membrana celular que funcionalmente, se define como un canal iónico activado por ligando con un peso entre 280 y 290 KDa (Fig. 4), fue el primer receptor para neurotransmisores en ser aislado (1970), purificado y caracterizado químicamente (1973); descrito por primera vez en el órgano eléctrico del *Torpedo marmorata* una anguila eléctrica y es estimulado por la nicotina (Albuquerque y cols., 2009; Colombo y cols., 2013; Feldman y cols., 1997; Gotti y cols., 2007; Lendvai y Vizi, 2008; von Bohlen und Halbach y Dermietzel, 2006).

El receptor está conformado por cinco subunidades (alfa (α), beta (β), gamma (γ), delta (δ) y épsilon (ϵ)), las cuales presentan cuatro segmentos transmembranales y se clasifican de acuerdo a los genes a partir de los cuales se expresan, la secuencia de aminoácidos que las conforman y a sus propiedades farmacológicas y electrofisiológicas, así mismo se han descrito subtipos de algunas subunidades (Tabla 1), por ejemplo de la subunidad alfa se encuentran de la 1 a la 10 y de la subunidad beta, de 1 a 4. La combinación de subunidades permite una amplia gama de subtipos funcionales del receptor nicotínico, para ello deben tener al menos dos subunidades α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 7$ o $\alpha 9$), debido a que en éstas se encuentra el sitio sensible (secuencia de aminoácidos en posiciones específicas) al neurotransmisor, presentando cooperación positiva, mientras que en las subunidades $\alpha 5$ y $\alpha 10$ no se conservan los residuos necesarios para la interacción con el agonista endógeno. Según la combinación estructural del receptor se pueden clasificar en dos grandes grupos: heteropentaméricos (del gr. *eteros*: diferente, *penta*: cinco y *meros*: miembro) y homopentaméricos (del gr. *Omo*: igual) (Albuquerque y cols., 2009; Colombo y cols., 2013; Feldman y cols., 1997; Gotti y cols., 2007; Lendvai y Vizi, 2008; von Bohlen und Halbach y Dermietzel, 2006).

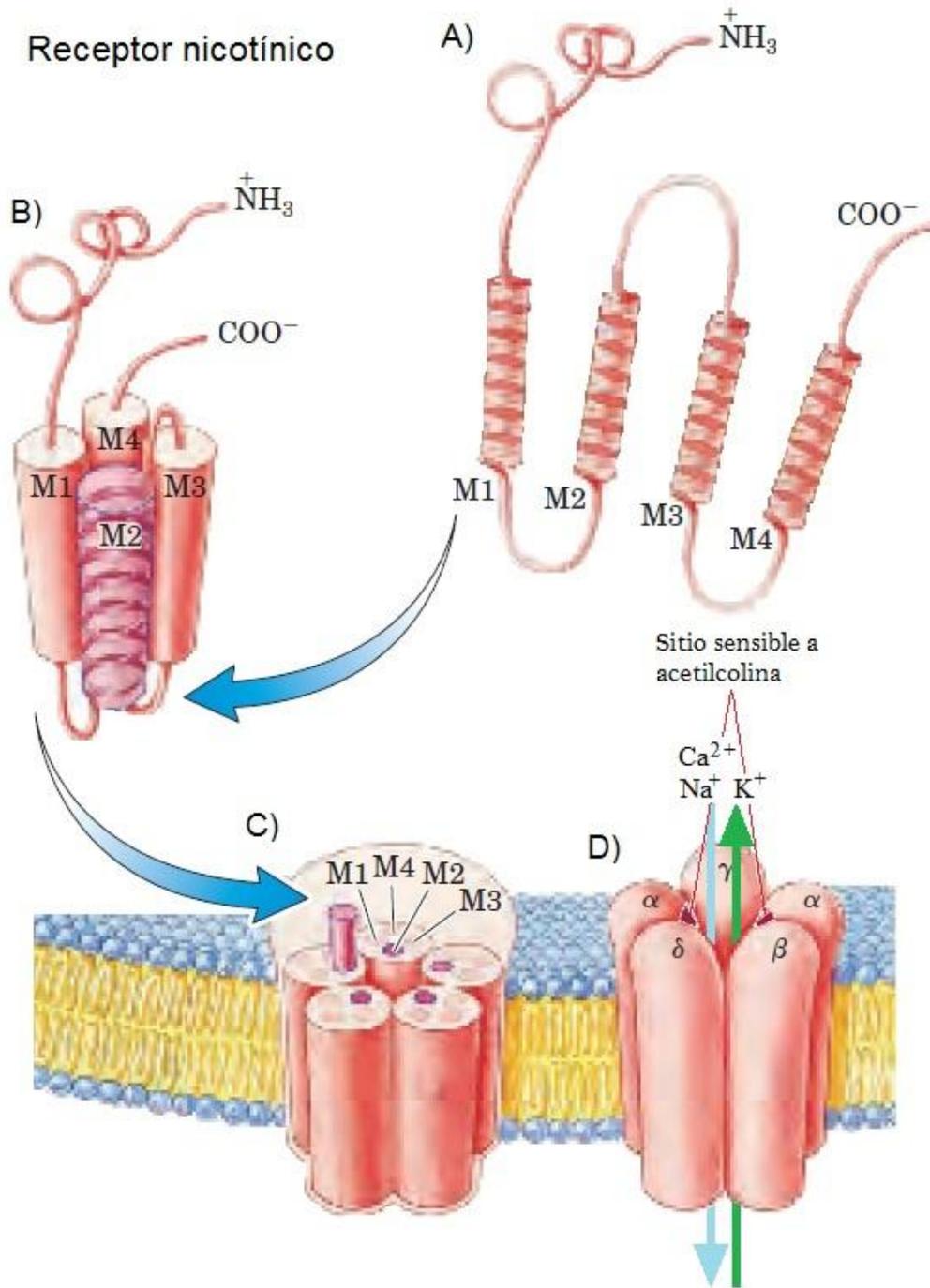


Fig. 4. Representación esquemática del receptor nicotínico. A) Cada una de las cinco subunidades con cuatro segmentos transmembranales en α hélice (M1 a M4), con el extremo carboxilo y la terminal amino en el espacio extracelular. B) La estructura proteica se pliega, dejando la hélice anfipática (M2) orientada hacia el canal, las hélices M1, M3 y M4 están formadas principalmente por residuos hidrófobos y se orientan hacia la membrana y otras subunidades. C) La estructura cuaternaria se forma con la interacción de las 5 subunidades, formando un poro central que se alinea con los lados polares de las hélices M2. Las partes superior e inferior en los anillos de residuos de aminoácidos en reposo tienen carga negativa. D) El sitio sensible a acetilcolina se encuentra en dos subunidades α y se genera una corriente catiónica por la activación del receptor. Modificada de Nelson y Cox, 2005.

Por su localización en el organismo se distinguen dos subtipos de receptores: muscular ($\alpha 1$, $\beta 1$, γ , δ y ϵ) y neuronal ($\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$; $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 4$), aclarando que la subunidad $\alpha 8$ no se ha descrito en mamíferos. Los subtipos del receptor nicotínico predominantes en el encéfalo son el heterómero $\alpha 4\beta 2$ y el homómero $\alpha 7$ (Albuquerque y cols., 1995, 2009; Chen y Patrick, 1997; Dani y De Biasi, 2001; Toyohara y Hashimoto, 2010). Los receptores que contienen las subunidades $\alpha 9$ y/o $\alpha 10$, comúnmente son clasificados como $\alpha 7$ (Abreu-Villaça y cols., 2011; Rahman y cols., 2008).

Tabla 1. Clasificación y localización cromosómica en humano y rata de las subunidades del receptor nicotínico.

Subunidad	Tipo	Gen ^{''}	Especie				Id (%)
			Humano		Rata		
			Cromosoma*	aa	Cromosoma	aa	
α (alfa)	1	CHRNA1	2q31.1	482	3q23	457	93.9
	2	CHRNA2	8p21	529	15p12	511	81.4
	3	CHRNA3	15q24	505	8q24	499	95.1
	4	CHRNA4	20q13.2-q13.3	627	3q43	630	87.9
	5	CHRNA5	15q24	468	8q24	467	89.5
	6	CHRNA6	8p11.21	494	16q12.3	493	85.2
	7	CHRNA7	15q14	502	1q22	502	94.0
	8	<i>CHRNA8</i>	Descrito en encéfalo de <i>Gallus gallus</i> (pollo)				
	9	CHRNA9	4p14	479	14p11	479	91.2
	10	CHRNA10	11p15.5	450	1q32	447	90.0
β (beta)	1	CHRN B1	17p13.1	501	10q24	501	89.6
	2	CHRN B2	1q21.3	502	2q34	500	95.5
	3	CHRN B3	8p11.2	458	16q12.3	464	85.8
	4	CHRN B4	15q24	498	8q24	495	83.2
γ (gamma)		CHRN G	2q33-q34	517	9q35	519	89.8
δ (delta)		CHRN D	2q33-q34	517	9q35	517	88.8
ϵ (épsilon)		CHRN E	17p13-p12	493	10q24	494	87.6

''CHRN: *Cholinergic receptor, nicotinic*; A: alfa; B: beta; G: gamma; D: delta; E: épsilon.

*q: brazo largo del cromosoma; p: brazo corto del cromosoma.

Id (%): porcentaje de homología entre las proteínas.

aa: número de aminoácidos que forman la proteína.

La subunidad $\alpha 4$ está formada por 627 aminoácidos (aa) en humanos y en ratas por 630 aa; es expresada a partir del gen para el receptor nicotínico colinérgico alfa 4 (CHRNA4) en humanos se localiza en el cromosoma 20 en q13.2-q13.3 y en ratas se encuentra en 3q43 (Goldman y cols., 1987; Monteggia y cols., 1995), investigaciones con hibridación *in situ* en monos Rhesus (*Macaca mulatta*), indican que la distribución de $\alpha 4$ es similar a la observada en roedores; con expresión en

tálamo, sustancia *nigra pars compacta*, el área ventral tegmental, corteza cerebral (capa VI), hipocampo y núcleo caudado (Albuquerque y cols., 1995; Han y cols., 2000). En cuanto a la subunidad $\alpha 5$, ésta cuenta con 468 aa en el humano y en la rata presenta 467 aa; se localiza predominantemente en las capas II, III y VI de la neocorteza, en la formación hipocampal (capas IV y VI de la corteza entorrinal, en el *stratum radiatum*, CA1 y CA3, la capa polimórfica del giro dentado), la amígdala, la sustancia *nigra pars compacta* y el área ventral tegmental. Interesantemente, en el SNC la subunidad $\alpha 5$ puede ensamblarse con los heterómeros $\alpha 4\beta 2$ y $\alpha 3\beta 4$ y así, modificar las propiedades funcionales de ambos receptores, incrementando su permeabilidad al Ca^{2+} y alterando la sensibilidad para algunos agonistas (Brown y cols., 2007; Flora y cols., 2000; Wang y cols., 1996).

Por otra parte, la subunidad $\beta 2$ está conformada por 502 y 500 aminoácidos, en el humano y la rata, respectivamente; expresada en corteza, tálamo, sustancia *nigra pars compacta*, área ventral tegmental, colículos superiores e inferiores, hipotálamo, amígdala e hipocampo (Albuquerque y cols., 1995; Anand y Lindstrom, 1990; Hidaka y cols., 2013). Finalmente, la subunidad $\alpha 7$ consta de 502 aa, tanto en el humano como en la rata; se distribuyen en las capas inferiores de la corteza y en hipocampo (giro dentado, *stratum oriens*, CA2 y CA3), así mismo se han identificado en núcleos hipotalámicos, colículos inferiores, *septum* medial, núcleo *accumbens* y en el caudado-*putamen* (Jiang y cols., 2015; Seguéla y cols., 1993; Sinkus y cols., 2015).

El ensamble de las subunidades forma un poro central de 0.65 nm de diámetro que sirve como canal para cationes pequeños. Los receptores nicotínicos son altamente permeables al sodio (Na^+), potasio (K^+) y calcio (Ca^{2+}). El flujo de Na^+ es insaturable, es decir mantiene una tasa lineal en función de la concentración extracelular de Na^+ y en condiciones fisiológicas es de 2×10^7 iones/s. En general los receptores nicotínicos del sistema nervioso central son altamente permeables al Ca^{2+} (Feldman y cols., 1997). Dicha permeabilidad radica en la secuencia de aminoácidos que conforman a las subunidades constituyentes del subtipo de receptor, por ejemplo el homómero $\alpha 7$ presenta una permeabilidad al Ca^{2+} ,

aproximadamente 10 veces mayor que al Na^+ , mientras que en promedio para todos los receptores nicotínicos es de 1 (Seguella y cols., 1993). Esto genera una actividad biológica distinta entre los subtipos del receptor, siguiendo con el ejemplo del receptor $\alpha 7$, su activación en interneuronas del *stratum radiatum* del hipocampo, causa despolarización en la célula postsináptica y la generación del potencial de acción, pero no en las neuronas piramidales de CA1 (Frazier y cols., 1998). Adicionalmente, la activación de los receptores $\alpha 7$ en interneuronas del hipocampo y en células granulares en el cerebelo inducen importantes corrientes transitorias de Ca^{2+} (Didier y cols., 1995; Khirouq y cols., 2003).

La presencia prolongada de un agonista produce una desensibilización del receptor que no permite el flujo de iones a través del canal, éste fenómeno concluye cuando se elimina el agonista. Los receptores nicotínicos presentan una rápida desensibilización, sin embargo la acumulación de Ca^{2+} permite una evaluación indirecta de la actividad de estos receptores. Durante la continua perfusión de un agonista (ej. nicotina), el número de canales iónicos abiertos (asociados a receptores nicotínicos) disminuye exponencialmente por la desensibilización del receptor. Ésta pérdida del número de canales en función del tiempo se conoce como corriente descendiente (“*rundown*”) y depende de la corriente entrante de Ca^{2+} ; además de la rápida desensibilización se presenta una inactivación persistente o de larga duración (>60 min). Por otra parte, la tasa de recuperación está en función de la concentración y el tiempo de exposición al agonista y de las subunidades que conformen al receptor, por ejemplo cuando la subunidad $\alpha 5$ está acoplada a un receptor $\alpha 3\beta 2$ o $\alpha 3\beta 4$ se incrementa la tasa de desensibilización del receptor (Rowell y Duggan, 1998; Wang y cols., 1996).

Los receptores nicotínicos también se pueden clasificar según su localización celular, identificando cinco zonas primarias: cuerpo celular o soma, dendritas, regiones axónicas preterminales, terminales axónicas y axones mielinizados; esto también se relaciona con la conformación del receptor, tipo celular y la estructura neuroanatómica, por ejemplo en el hipocampo se ha encontrado la presencia de $\alpha 7$ en el soma de interneuronas GABAérgicas del *stratum radiatum* y de neuronas

piramidales (GABA y glutamatérgicas) de CA1 del hipocampo, mientras que el receptor $\alpha 4\beta 2$ se ha localizado en dendritas de interneuronas GABAérgicas en el *stratum oriens* y regiones axónicas preterminales de neuronas GABAérgicas de CA1 del hipocampo, a su vez se ha encontrado que interneuronas GABAérgicas tanto del *stratum radiatum* como *stratum oriens* expresan el receptor $\alpha 3\beta 4$ en la terminal presináptica (Albuquerque y cols., 2009).

Enfocándose en la posición sináptica, se pueden clasificar como pre o postsinápticos. Los receptores presinápticos comúnmente localizados en las varicosidades axónicas, pero relativamente alejados del sitio de liberación para el neurotransmisor, han sido ampliamente descritos en diferentes regiones del encéfalo (Wonnacott, 1997). La activación de estos receptores procede o coincide con el arribo de un potencial de acción a la terminal axónica, indicando que pueden aumentar la probabilidad de liberación a través de un sistema de retroalimentación mediado por Ca^{2+} , porque los niveles intracelulares de las terminales presinápticas de éste ión aumentan en presencia de receptores con la subunidad $\alpha 7$ y finalmente, modulan la liberación de otros neurotransmisores como dopamina, GABA y glutamato (Köfalvi y cols., 2000; Sershen y cols., 1997; Vizi y cols., 1995).

Abundante evidencia experimental indica que los receptores nicotínicos con las subunidades $\alpha 7$ y $\beta 2$, se encuentran tanto en la presinapsis como en la postsinapsis, así como en posiciones no activas (Fabian-Fine y cols., 2001; Frazier y cols., 1998). Muchas sinapsis contienen receptores nicotínicos presinápticos, sin ser terminales colinérgicas, tales como glutamatérgicas o GABAérgicas; lo que indica la participación en la modulación, pero no en la comunicación sináptica directa de estas células (Albuquerque y cols., 2009; Fabian-Fine y cols., 2001; Marchi y cols., 2015). Neuronas inhibitoria GABAérgicas en el hipocampo, pueden ser excitadas por la actividad de receptores somatodendríticos (Frazier y cols., 1998; McQuiston y Madison, 1999). Interesantemente, los receptores nicotínicos presinápticos, pueden cambiar la dirección del transportador de colina, con un efecto sobre la recaptura, lo que resulta en un mecanismo compuesto para la

regulación de la liberación (Szász y cols., 2005). Esto puede deberse a la razón entre los gradientes de concentración de Ca^{2+} y Na^+ , así, la relativamente alta concentración intracelular de Ca^{2+} desplaza el intercambio de $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ para sacar al Ca^{2+} ; provocando un incremento de Na^+ adyacente al transportador, si dicha concentración es suficientemente alta, la proteína puede cambiar la dirección de transporte para liberar la molécula de colina en lugar de recapturarla (Abreu-Villaça y cols., 2011; Lendvai y Vizi, 2008).

Los receptores nicotínicos participan de manera crítica en diversos procesos incluyendo el neurodesarrollo y procesos superiores como aprendizaje, memoria. En este sentido, diversos estudios han demostrado que ocurren cambios en la expresión de receptores nicotínicos durante periodos críticos pre y postnatales del desarrollo neuronal y mantienen un papel imprescindible en muchos aspectos del neurodesarrollo dependiendo de la región y el momento de su expresión incluyendo mecanismos asociados con la neurogénesis, sinaptogénesis, migración y diferenciación celular, por ejemplo, el papel del receptor $\alpha 7$ sobre el crecimiento y diferenciación neuronal y la formación sináptica durante el neurodesarrollo está relacionado con el incremento de concentraciones intracelulares de Ca^{2+} , la activación indirecta de segundos mensajeros y a la inducción de la expresión de genes de expresión inmediata (Abreu-Villaça y cols., 2011; Albuquerque y cols., 1995). Así mismo, durante el neurodesarrollo, las diferentes subunidades del receptor nicotínico, se distribuyen de manera diferencial temporal y espacialmente y se encuentran entre las primeras proteínas presentes en la membrana durante el desarrollo del SNC. Los niveles de receptores nicotínicos se mantienen constantes, incrementan o disminuyen en etapas y regiones específicas durante el desarrollo y maduración del SNC dependiendo de la composición del receptor, por ejemplo, durante el desarrollo del hipocampo niveles bajos de activación del receptor $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 4$ y la subsecuente entrada de Ca^{2+} a la célula activa (fosforilación) el factor de transcripción CREB, que puede promover la expresión génica; por el contrario, si la estimulación es intensa se activan canales dependientes de voltaje para Ca^{2+} modificando la actividad de CREB y por lo tanto, la expresión génica (Albuquerque y cols., 2009).

En el cerebro fetal humano se identifican receptores nicotínicos en el primer trimestre de gestación e incrementan de manera gradual a lo largo de la gestación (Falk y cols., 2002; Gotti y cols., 1997; Hellström-Lindahl y cols., 1998). Mediante técnicas *in vitro* Atluri y sus colaboradores (2001) identificaron receptores nicotínicos funcionales en la corteza cerebral de ratones desde el décimo día de gestación (G10) (Atluri y cols., 2001). En la rata, las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\beta 2$ se encuentran desde G11 en el mesencéfalo y rombencéfalo, pero la subunidad $\beta 4$, solamente se expresa en el rombencéfalo. Durante G12 se observan $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\beta 2$ en el telencéfalo y en la unión meso-diencefálica, $\alpha 4$ y $\beta 2$ en el diencefalo. En G13 se identifican $\alpha 3$ y $\beta 2$ en el área externa de la corteza cerebral y en la formación hipocampal; $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\beta 2$ en el *septum* y en la unión meso-diencefálica, mientras que $\beta 2$ se expresa en los ganglios basales y el área preóptica; $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 2$ y $\beta 4$ en el diencefalo. En el metencéfalo se observan niveles semejantes a los observados el G12 para $\alpha 3$ y $\alpha 4$, pero incrementa la presencia de $\beta 2$ y disminuye la expresión de $\beta 4$. En las zonas medioventral, lateral y caudal, pero no en la parte mediodorsal del mielencéfalo se presenta alta expresión de $\alpha 3$, $\alpha 4$ y $\beta 2$ y baja de $\beta 4$ (Shacka y Robinson, 1998; Zoli y cols., 1995).

Interesantemente, a partir de G15 las diferentes subunidades presentan patrones de expresión específicos, por ejemplo en G15 no se observa expresión de la subunidad $\alpha 3$ en la mayor parte del telencéfalo a excepción del área preóptica, en la habénula del tálamo, en el hipotálamo, en la parte ventral del mesencéfalo y núcleos motores del metencéfalo y mielencéfalo. En G17, se localiza en la habénula medial del tálamo, núcleos hipotalámicos (arcuato y ventromedial) y en el neuroepitelio del cerebelo. Y en G19 se identifica un patrón similar. En el día de alumbramiento o postnatal cero (P0) se observa casi el mismo patrón que en G19, disminuyendo su expresión en la hipófisis. En cuanto a la subunidad $\alpha 4$ en G15, se expresa en la formación hipocampal, el *septum*, el área preóptica, la habénula, núcleos del tálamo; presenta mayores niveles que $\alpha 3$ en el hipotálamo y en el mesencéfalo. En G17 adicionalmente, se encuentra en la corteza cerebral, amígdala, núcleo geniculado, colículos superiores, *locus coeruleus* y en la capa de células de Purkinje en el cerebelo. Mientras que durante G19 incrementa su

expresión en la corteza cerebral, se localiza en las células piramidales del hipocampo y mantiene bajos niveles en el mesencéfalo basal y dorsomedial, el área preóptica y la amígdala, se encuentra en todos los núcleos talámicos e incrementa su expresión en la habénula y en el tálamo, mantiene su expresión en los colículos superiores, el *locus coeruleus* y en la capa de células de Purkinje en el cerebelo, pero disminuye en el núcleo arcuato y se observa en el núcleo rojo, la sustancia *nigra* y el área ventral tegmental. En P0 se incrementa la expresión de ésta subunidad en la corteza cerebral, en el núcleo ventromedial del hipotálamo y en el cerebelo, mantienen los niveles de expresión en los colículos superiores, la sustancia *nigra*, el área ventral tegmental, el núcleo rojo y el *locus coeruleus*, pero disminuyen en las células piramidales y granulares del hipocampo, en el *subiculum*, la corteza entorrinal, el *septum*, el mesencéfalo, el área preóptica, la amígdala y el tálamo, adicionalmente se identifica en el bulbo olfatorio y los núcleos de los 12 pares de nervios craneales. Mientras que durante PN1, se observa expresión en el hipocampo y el *septum*, que incrementa durante PN7; durante PN14, se observa alta concentración de ARNm en la corteza que desciende significativamente en PN28 (Shacka y Robinson, 1998; Zoli y cols., 1995).

En cuanto a la subunidad $\beta 2$, en G15 se encuentra ampliamente distribuida y expresada en la corteza cerebral, la formación hipocampal, el *septum*, ganglios basales, distintos núcleos del mesencéfalo basal, el área preóptica, el tálamo e hipotálamo. En G17 se aumenta la expresión en diversas áreas de la corteza y disminuye en la formación hipocampal, el *septum*, los ganglios basales, el mesencéfalo, el área preóptica, diversos núcleos del tálamo e hipotálamo y se encuentran niveles moderados en distintos núcleos de la amígdala, en los colículos superiores, el *locus coeruleus* y en la capa de células de Purkinje en el cerebelo. En G19 se expresan niveles bajos en la corteza cerebral y niveles medios en el bulbo olfatorio, las células piramidales del hipocampo, el *septum*, los ganglios basales, mesencéfalo, el área preóptica, la amígdala, en el tálamo, hipotálamo, el área ventral tegmental, la sustancia *nigra* y en las células de Purkinje del cerebelo, durante P0 la expresión se mantiene en niveles moderados

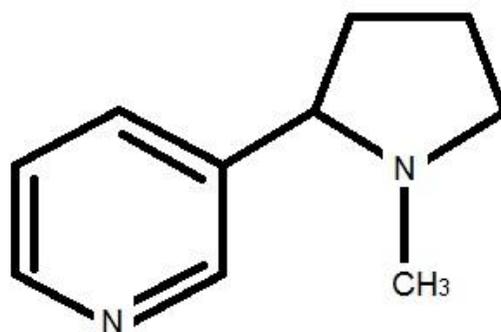
en la corteza, en las células piramidales y granulares del hipocampo, el *subiculum*, la corteza entorrinal, el *septum*, el núcleo estriado, el núcleo accumbens, la sustancia *nigra* y el área ventral tegmental, en el área preóptica, la amígdala, cerebelo, hipófisis, tálamo, hipotálamo y en los núcleos de los 12 pares de nervios craneales; adicionalmente en el séptimo día postnatal (PN7) se observa baja presencia de ARNm en la corteza cerebral e hipocampo que incrementa significativamente en PN14. Respecto a la subunidad $\beta 4$, en G15 no se observa en corteza ni en la mayoría de los núcleos talámicos, excepto en la habénula y el neuroepitelio cerebelar. En G17, se presentan niveles bajos en la glándula hipófisis y en el neuroepitelio cerebelar, pero niveles altos en la habénula medial; mientras que en G19 incrementa la expresión en la hipófisis. En P0 se encuentra una distribución casi idéntica en la mayoría de las áreas del encéfalo, menos en el cerebelo donde no se encontró expresión de esta subunidad (Shacka y Robinson, 1998; Zoli y cols., 1995). Por otra parte, la subunidad $\alpha 7$ se ha identificado a partir de G12 en hipocampo y área posterior del hipotálamo e incrementa significativamente en PN7. En PN29 se localiza en la corteza frontal, *septum*, amígdala e hipocampo (Doura y cols., 2008; Shacka y Robinson, 1998). Dichas variaciones en los patrones de expresión para las diferentes subunidades se extiende hasta la etapa adulta (Doura y cols., 2008).

Por otra parte, los receptores nicotínicos participan de manera fundamental en funciones cognitivas como aprendizaje, memoria de trabajo, memoria de referencia y atención, entre otros. Por ejemplo Lippiello y sus colaboradores describieron la participación del subtipo $\alpha 4\beta 2$ en procesos de memoria en ratones (Lippiello y cols., 1996). Administraron RJR-2403, un agonista selectivo a este receptor. Encontraron que el RJR-2403 fue eficiente, para contrarrestar los efectos amnésicos inducidos farmacológicamente (mediante escopolamina) en un paradigma de evitación pasiva y mejorar el rendimiento en un laberinto radial de sujetos con lesión excitotóxica (ácido iboténico) en las proyecciones colinérgicas del mesencéfalo. Así mismo, el SIB-1765F, otro agonista para el mismo receptor, mostró mejorar significativamente la atención de ratas en una tarea de tiempo de reacción serial con 5 opciones. Por otra parte el AR-R17779, un agonista selectivo

a los receptores $\alpha 7$, mejora el aprendizaje y la memoria de trabajo en ratas evaluadas mediante un laberinto radial. En 2004 el grupo de trabajo de Young, reportó que ratones *knockout* para el receptor $\alpha 7$, presentan deficiencia severa en el proceso atencional en la tarea de elección con 5 opciones (Levin y cols., 1999; Lippiello y cols., 1996; Young y cols., 2004). En una revisión realizada por Buccafusco en 2004, refiere que el receptor $\alpha 7$ es fundamental para el aprendizaje y participa en algunos tipos de memoria, mientras que el receptor $\alpha 2\beta 4$ está involucrado en el proceso de evocación (Buccafusco, 2004). Adicionalmente, Doura y sus colaboradores en 2008, reportaron que la administración crónica de nicotina (6 mg/Kg/día), consistentemente incrementa la expresión de estos receptores en distintas áreas neuroanatómicas, incluyendo corteza frontal, amígdala e hipocampo, especialmente en el giro dentado y CA1 (Doura y cols., 2008).

2. Nicotina

La nicotina (1-metil-2-[3-piridil]pirrolidina) es una amina terciaria compuesta por una piridina y un anillo de pirrolidina (Fig. 5), es un alcaloide encontrado en las hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), una planta de la familia de las solanáceas. Fue aislada por Posselt y Reiman en 1828, quienes describieron que constituye aproximadamente el 5 % del peso total de las hojas secas de la planta. Es incolora y volátil, se vuelve color pardo y adquiere un olor característico al oxidarse, es hidrosoluble y liposoluble. Cerca del 30 % de la nicotina no se ioniza y cruza fácilmente la membrana celular debido a su acidez (pH = 5.5-6.0) (Benowitz, 1990; Benowitz y cols., 2009; Feldman y cols., 1997).



Nicotina

Fig. 5. Molécula de la nicotina.

Cuando el humo del tabaco es inhalado, ingresa a los pulmones desde donde se absorbe por los bronquios y alveolos pulmonares y llega a los diferentes tejidos del organismo con una biodisponibilidad de entre 80 y 90 %; una vez inhalada, tarda en promedio 15 segundos en llegar al SNC y tras la absorción tarda entre 7 y 9 segundos, así mismo cruza fácilmente la barrera placentaria encontrando altas concentraciones en el líquido amniótico. Su vida media es de 2 horas y presenta un pico de concentración en plasma de 15 ng/ml. Es metabolizada en el hígado por la enzima CYP2A5 en ratones, CYP2A6 en humanos y por la familia enzimática CYP2B en ratas. Finalmente, se oxida para su degradación, produciendo cotinina, la molécula activa más usada como biomarcador del consumo de nicotina. Cerca del 75 % de la nicotina es biotrasformada en cotinina

esta presenta una vida media de 16 a 18 h, interesantemente, en mujeres es de entre 17 y 21 h, pero en mujeres embarazadas (con 16 a 40 semanas de gestación) la vida media de la cotinina se acorta hasta 9 h. Y posteriormente, es eliminada a través de la orina, saliva, sudor, cabello y leche materna, en este último fluido la nicotina se almacena en una razón con respecto al plasma de 2:9 después de fumar. Los componentes genéticos que metabolizan la nicotina, son influenciados por factores como la dieta, raza, edad, sexo, embarazo, padecimientos como disfunción renal; uso de otras drogas (de abuso como alcohol, cocaína, etc. y medicamentos), uso de hormonas esteroides e incluso el mismo consumo de nicotina (Alsharari y cols., 2014; Benowitz, 1990; Benowitz y cols., 2009; Blood-Siegfried y Rende, 2010; Dahlström y cols., 1990; Feldman y cols., 1997; Yildiz, 2004).

La nicotina es un agonista colinérgico directo para los receptores nicotínicos, se une principalmente, a un sitio activo de alta afinidad que no se encuentra en la subunidad α (Buccafusco, 2004). Cuando la nicotina interactúa con el receptor mimetiza la acción de la acetilcolina sobre éste y presenta una constante de afinidad (K_i) variable, según el subtipo de receptor (Tabla 2).

Tabla 2. Afinidad de la nicotina por los subtipos de receptor. Media \pm error estándar. Basada en Cohen y cols., 2003; Decker y cols., 1995; Hauser y cols., 2009; Lendvai y cols., 2013; Stauderman y cols., 1998; Wang y cols., 1996.

Subtipo de receptor	K_i en nM
$\alpha 2\beta 4$	9900
$\alpha 7$	2800-5000
$\alpha 4\beta 2$	4.6 ± 0.7
$\alpha 3\beta 2$	5.4 ± 0.6 - 14 ± 2
$\alpha 3\beta 4$	187 ± 4
$\alpha 3\beta 4\gamma\delta$	>6000
$\alpha 1\beta 1\delta\gamma$	>20000

K_i : constante de afinidad
nM: Nanomolar

Esto genera heterogeneidad en la sensibilidad a la nicotina entre distintos tipos de células, por ejemplo, en el hipocampo las interneuronas del *stratum radiatum* pueden ser excitadas por el ligando, pero las interneuronas en la capa de células piramidales no responden a la nicotina. Se ha identificado una alta sensibilidad a nicotina en las interneuronas del hipocampo y en diferentes tipos de interneuronas

en la corteza cerebral, especialmente en la capa 5 (Cohen y cols., 2003; Feldman y cols., 1997; Hauser y cols., 2009; Lendvai y cols., 2013; McQuiston y Madison, 1999; Stauderman y cols., 1998).

La nicotina puede generar efectos similares a los observados por los antagonistas nicotínicos, lo que indica un papel fisiológico para la desensibilización en los receptores nicotínicos y no necesariamente, por la regulación a la baja de los receptores (Sharma y Vijayaraghavan, 2003; Zhou y cols., 2001). La desensibilización generada por nicotina presenta un rápido inicio y recuperación con duración de entre 10 y 30 segundos, modificando la amplitud de la corriente entrante de Ca^{2+} y hay una inactivación de larga duración o persistente de los receptores, que se produce inmediatamente después de la aplicación del fármaco y permanece hasta 60 minutos o más. Las tasas de recuperación dependen del tiempo de exposición y de la concentración del agonista, así como del tipo de receptor, por ejemplo el $\alpha 7$ presenta una muy rápida desensibilización como respuesta ante la nicotina (Albuquerque y cols., 2009; Rowell y Duggan, 1998).

La nicotina presenta un amplio espectro de efectos dependientes de la dosis, por ejemplo concentraciones bajas activan a los receptores nicotínicos generando efectos estimulantes como alerta y excitación, mientras que altas concentraciones bloquean a estos receptores generando efectos depresores en el SNC o ansiolíticos. Sus efectos también pueden variar como resultado de la interacción con diferentes condiciones fisiológicas como ansiedad; o bien, según etapas de desarrollo y niveles de maduración del SNC por ejemplo los efectos reforzantes o aversivos de la nicotina, mismos que se han estudiado mediante autoadministración y condicionamiento de aversión al sabor. Así mismo, la nicotina genera signos de abstinencia y genera efectos como estímulo discriminativos y altera de manera bifásica diversos procesos cognoscitivos como atención, motivación, aprendizaje y memoria (Alsharari y cols., 2014; Cohen y cols., 2003; Impey y cols., 2013; Leite y cols., 2013; Levin y Simon, 1998; Pidoplichko y cols., 2004; Shoaib y cols., 2002; Shram y cols., 2006; Stauderman y cols., 1998). Estudios con humanos (fumadores y no fumadores) y animales de

experimentación, proveen clara evidencia de los efectos de la nicotina sobre los procesos cognoscitivos tales como atención, procesamiento y discriminación de estímulos, aprendizaje y memoria, en diversas especies (Impey y cols., 2013; Leite y cols., 2013; Levin y Simon, 1998). En la tabla 3 se presenta un resumen de la revisión realizada por Levin y sus colaboradores en 2006, sobre los efectos de la nicotina en el desempeño de roedores, así como las tareas con las que se evaluaron los procesos de aprendizaje y memoria.

Tabla 3. Efectos de la nicotina sobre el desempeño de roedores en distintas tareas para evaluar los procesos de aprendizaje y memoria (basada en Levin y cols., 2006).

Especie	Tarea	Efecto	Referencia
Rata	Adquisición de patrones seriales	S.E.	Attaway y cols., 1999
Rata	Laberinto acuático de Morris	Mejora	Attaway y cols., 1999
Ratón	Evitación pasiva	Mejora	Ciamei y cols., 2001
Rata	Laberinto radial	Mejora	Levin, 1992
Rata	Laberinto radial	Mejora	Levin y Chen, 2004
Rata	Laberinto radial	S.E.	Levin y Torry, 1996
Ratón	Laberinto acuático	Deterioro	Moragrega y cols., 2003
Rata	Reconocimiento de objetos	Mejora	Puma y cols., 1999
Rata	Laberinto acuático de Morris	Mejora	Socci y cols., 1995
Ratón	Laberinto acuático	S.E.	Vicens y cols., 2003
Conejo	Parpadeo condicionado	Mejora	Woodruff-Pak y cols., 2000
Ratón	Elección de 5 opciones	Mejora	Young y cols., 2004

S.E.: Sin efecto significativo.

Aunque el papel de la nicotina como potenciador cognitivo es controversial debido a que dosis agudas presentan efectos perjudiciales sobre múltiples funciones cognoscitivas, como lo sugiere un meta-análisis realizado por Heishman, Kleykamp y Singleton, en 2010; referente a estudios con humanos, por ejemplo en adolescentes, la nicotina reduce significativamente la actividad de la enzima que sintetiza la acetilcolina e infusión crónica, causa periodos de isquemia e hipoxia (Heishman y cols., 2010). No obstante, existe abundante evidencia de los efectos benéficos sobre atención (estado de alerta y orientación) y funciones mnémicas (memoria episódica, memoria de trabajo y de referencia). En contraste, administración crónica de nicotina en fumadores habituales presenta efectos negativos en funciones cognoscitivas. Muchos estudios exploran estos efectos en pacientes y reportan relación entre fumar cotidianamente y el déficit cognitivo, el

cual puede estar asociado a la modificación en la expresión de receptores GABA_B en el hipocampo (Li y cols., 2002).

En 2004 Levin y Chen, reportaron que diferentes concentraciones de nicotina disuelta en el tanque de agua de peces cebra (*Danio rerio*), producían mayor porcentaje de ensayos correctos en una tarea de alternancia espacial ante bajas concentraciones, pero deterioro de la respuesta ante concentraciones altas, lo cual se interpreta como un efecto bifásico (mejora-deficiencia) sobre la memoria de trabajo (Levin y Chen, 2004). Se ha demostrado que una dosis aguda de 0.2 mg/Kg de nicotina administrada de manera periférica antes de una sesión de prueba en un laberinto radial, mejora significativamente la memoria de trabajo en ratas adultas; la administración crónica de nicotina también mejora la memoria de ratas en tareas de evitación pasiva y laberintos (Levin y cols., 2006).

En cuanto al proceso de atención, específicamente en el módulo de orientación, evaluado mediante una tarea operante de detección de señales, se demostró que bajas dosis de nicotina (0.00123 - 0.005 mg/Kg) causa un incremento en el porcentaje de respuestas correctas (Rezvani y cols., 2002). No obstante la mejora en atención, inducida por la nicotina es dependiente de la cepa; Mirza y Bright (2001) mostraron que el tratamiento con nicotina mejora el rendimiento de ratas Sprague-Dawley, en la tarea de tiempo de reacción serial con 5 opciones, pero no en ratas Lister (Mirza y Bright, 2001). Por otra parte, el grupo de investigación de Shoaib, reportó en 2002, que ratones *knockout* para la subunidad $\beta 2$, son incapaces de discriminar las dosis bajas de nicotina (0.4 y 0.8 mg/Kg), pero si pueden discriminar dosis altas (1.6 mg/Kg). Estos datos son evidencia de la participación de los receptores nicotínicos en los procesos de discriminación, aprendizaje asociativo y memoria (Murray y cols., 2011; Shoaib y cols., 2002). La capacidad de la nicotina para mejorar algunos procesos cognoscitivos, pueden ser resultado del incremento en la eficiencia de la comunicación a nivel cortical (Hasselmo, 2006). Por ejemplo, el incremento sobre la liberación de neurotransmisores como ACh, dopamina, serotonina, glutamato y GABA, entre otros y la modificación en el metabolismo de hormonas tales como leptina, cortisol,

estrógenos y progesterona, entre otras (Albuquerque y cols., 2009; Grassi y cols., 1994). Se reporta mejora de la transmisión excitadora de la corteza entorrinal hacia CA3 (Giocomo y Hasselmo, 2005) y del giro dentado (Radcliffe y cols., 1999) y en las proyecciones desde el tálamo dorsal-medial hacia la corteza prefrontal (Gioanni y cols., 1999).

Ahondando en los efectos de la nicotina, se ha demostrado que atenúa déficits en atención y memoria asociados con la esquizofrenia, Alzheimer y Parkinson, así como el deterioro cognoscitivo asociado a la edad (Evans y Drobos 2009; Levin y cols., 2006). Este tipo de investigaciones pueden dividirse según su objetivo de estudio en dos grupos principales: 1) el conocimiento de las bases neuroquímicas de los sistemas cognitivos y las funciones en las que está implicado el receptor nicotínico y 2) las condiciones psiquiátricas en las que se considera probable una alteración en el sistema colinérgico como parte de la etiología (Levin y cols., 2006). No obstante, los efectos de la administración de nicotina en un organismo desarrollado o adulto, dista de lo observado cuando la exposición ocurre de manera prenatal, por ejemplo en adultos la nicotina acentúa o mejora algunas funciones de diversos neurotransmisores, pero cuando la exposición a la nicotina ocurre de manera prenatal dichas funciones son desensibilizadas durante la infancia, niñez, adolescencia y adultez (Blood-Siegfried y Rende, 2010; Slotkin y Seidler, 2015).

3. Exposición prenatal a nicotina

El tabaquismo materno está asociado con una variedad de efectos patológicos en la descendencia en humanos, así como la administración prenatal de nicotina en modelos animales, incluyendo aumento de la mortalidad y probabilidad de aborto, parto prematuro, retraso en el crecimiento del feto, bajo peso al nacer, malformaciones en el sistema cardiovascular, menor maduración pulmonar, deficiencias motoras y sensoriales, alteraciones en la organización del sueño, alta incidencia del síndrome de muerte súbita, trastorno de déficit de atención con hiperactividad, ansiedad, agresividad, anormalidades sobre el neurodesarrollo, efectos neuroteratogénicos, desorganización en el procesamiento de estímulos, procesos de discriminación visual, atención, aprendizaje y memoria; que persisten hasta la adolescencia y edad adulta (Abreu-Villaça y cols., 2003, 2004; Biederman y cols., 2009; Blood-Siegfried y Rende, 2010; Boychuk y Hayward, 2011; Cornelius y Day, 2009; Dwyer y cols., 2008, 2009; Ernst y cols., 2001; Falk y cols., 2005; Han y cols., 2000; Horst y cols., 2012; Key y cols., 2007; Levin y cols., 1996; Mao y cols., 2008; Nasrat y cols., 1986; Oliveira y cols., 2010; Phelan, 2014; Roy y cols., 2002; Slotkin, 2004; Stephan-Blanchard y cols., 2008). Durante la gestación, la nicotina cruza fácilmente la barrera placentaria y durante el periodo de lactancia, la nicotina es transferida al infante, a través de la leche materna; la cantidad de nicotina transferida al recién nacido oscila entre 0.09 y 1.03 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en función del peso corporal del infante, así la dosis diaria recibida por el infante es aproximadamente de 6 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ a través de la leche materna (Dahlström y cols., 1990).

La mayoría de los estudios enfocados en la evaluación de los efectos de la exposición prenatal a nicotina se realizan en roedores, debido a la similitud que se mantiene entre el desarrollo gestacional de estas especies y el humano, sin embargo, existen algunas diferencias fundamentales. El periodo de gestación en la rata dura 21 a 22 días y las crías nacen con un nivel de maduración equivalente al segundo trimestre de gestación en el humano; durante este periodo ocurren eventos críticos para el neurodesarrollo incluyendo la expresión de los receptores

nicotínicos (Dwyer y cols., 2008). Durante el segundo y tercer trimestre de gestación en el humano y 22 días de gestación en la rata, el desarrollo neurológico progresa desde la medula espinal hasta el tallo cerebral, mesencéfalo y la corteza cerebral. Las estructuras y sus funciones continúan desarrollándose durante los primeros años de vida postnatal en el humano y semanas en la rata, por ejemplo el proceso de mielinización en la rata alcanza su pico máximo entre los días PN30 y PN40, este evento indica la adultez en la rata (Blood-Siegfried y Rende, 2010; Dwyer y cols., 2008).

Dentro del contexto del desarrollo apropiado del SNC, la activación de un conjunto determinado de receptores puede promover la replicación neuronal, iniciar el cambio de la replicación a la diferenciación, aumentar o retardar la formación de la conectividad (axogénesis y sinaptogénesis), promover o prevenir la apoptosis o bien, permitir la migración y localización celular en las poblaciones específicas dentro de cada región cerebral (Slotkin, 2004). Cada uno de estos elementos depende de la apropiada función de diferentes sistemas de señalización como factores tróficos y neurotransmisores y es vulnerable a la interacción con moléculas exógenas como la nicotina.

La acción directa de la nicotina sobre los receptores colinérgicos, que están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso fetal, puede apropiarse de la sincronización e intensidad de las señales tróficas naturalmente mediadas por acetilcolina, dando lugar a alteraciones sobre la replicación y diferenciación neuronal, así como sobre la conectividad sináptica (Dwyer y cols., 2008; Slotkin y Seidler, 2015). Los distintos elementos del sistema colinérgico participan importantemente en el neurodesarrollo de mamíferos; la interacción de la nicotina con el sistema nervioso central durante el desarrollo, disminuye significativamente la presencia de las moléculas de ARNm que codifican a la ChAT, VACHT y CHT y modifica el patrón de expresión de los receptores colinérgicos: muscarínicos y nicotínicos, por ejemplo, aumento del subtipo $\alpha 4\beta 2$, comprometiendo la función de la acetilcolina como factor neurotrófico (Abreu-Villaça y cols., 2004; Falk y cols., 2005; Mao y cols., 2008; Slotkin, 2004; Yanai y cols., 1992). Los receptores $\alpha 4\beta 2$ y

$\alpha 7$ están estrechamente relacionados con el crecimiento neuronal. En 2004 Slotkin y sus colaboradores evaluaron los efectos de un tratamiento con nicotina (5 mg/Kg) postnatal temprano (PN11-PN14) y tardío (PN21-PN24), encontrando una disminución significativa del receptor $\alpha 7$ en el tronco cerebral y cerebelo. Y que la exposición prenatal a nicotina (6 mg/Kg/día, a partir de G4) genera deficiencias en la formación axónica y sinaptogénesis, asociadas a cambios en la expresión del receptor $\alpha 7$ (Slotkin y cols., 2004).

El efecto de la nicotina, depende de la dosis y el estado de maduración durante la exposición; en modelos animales una dosis diaria de 1.5 mg/Kg, mantiene niveles plasmáticos similares a los observados en fumadores (un paquete de 20 cigarrillos al día). La exposición crónica durante el desarrollo embrionario afecta a muchas funciones, mientras que la exposición limitada a un momento específico afecta sólo a las funciones específicas en desarrollo durante ese intervalo preciso. Es por ello, que ante la exposición a la nicotina durante periodos críticos del desarrollo (prenatal y postnatal) los efectos varían en el grado de severidad sobre procesos de inducción neuronal, migración, diferenciación, sinaptogénesis, apoptosis y mielinización que se están llevando a cabo especialmente en el hipocampo, la corteza y el cerebelo (Blood-Siegrfried y Rende, 2010; Jernigan y cols., 2011; Levin y cols., 1996; Yanai y cols., 1992).

Múltiples biomarcadores de daño celular, indican que la exposición prenatal a nicotina, genera anomalías en el desarrollo del sistema nervioso central que persisten en etapas posteriores. En CA3 del hipocampo y giro dentado se presenta disminución significativa del tamaño celular que corresponde al menor espesor de la capa celular y un aumento en la densidad neuronal, evaluado en PN30. En la capa 5 de la corteza somatosensorial, se observa una reducción en la proporción media del tamaño de las neuronas piramidales y un aumento de células pequeñas (no piramidales). Aunado a un aumento en el conteo de células glía (Roy y cols., 2002; Slotkin, 2004).

En un estudio clásico se evaluó la exposición pre (G1-G21) y postnatal (PN2-PN21) a 6 mg/Kg/día de nicotina, los sujetos experimentales presentaron menor

eficiencia que los controles sobre tareas operantes con programas de reforzamiento de razón fija 10 e intervalo variable a 1 segundo; la evaluación conductual se realizó durante la edad adulta de los sujetos (PN98-PN187) (Martin y Becker, 1971). En otro trabajo se encontró deficiencia selectiva sobre evitación de ratas macho adultas (PN60) expuestas a 0.5 mg/Kg/día durante la gestación (G1-G20), pero no en hembras bajo las mismas condiciones (Genedani y cols., 1983). En un estudio realizado en 1982, con cobayos expuestos a 3 mg/Kg/día, durante todo el periodo de gestación, mismos que fueron evaluados (PN85-PN107) en una tarea de discriminación visual con un laberinto, mostrando deterioro en el aprendizaje de la tarea (Johns y cols., 1982). Se encuentran resultados semejantes sobre el aprendizaje y la memoria con laberinto radial (Sorenson y cols., 1991; Yanai y cols., 1992). Estos efectos presentan diferencias entre sexo, por ejemplo los machos son consistentemente más sensibles a los efectos de la exposición prenatal a nicotina sobre la expresión del receptor $\alpha 7$ y deficiencias neuroconductuales derivados de dicho tratamiento (Slotkin y cols., 2004; Slotkin y Seidler, 2015).

Algunas diferencias individuales en los efectos aversivos de la exposición prenatal a nicotina, radican en los efectos sobre el sistema noradrenérgico. En un estudio realizado por Levin y sus colaboradores (1996), evaluaron los efectos de la exposición prenatal a nicotina en ratas Sprague-Dawley, realizaron la infusión mediante minibombas osmóticas en una dosis de 2.0 mg/Kg/día, a partir del día G4 hasta G20; evaluaron el rendimiento de los sujetos en un laberinto T con alternancia espacial condicionada y demoras variables (0, 10, 20 y 40 s) entre los ensayos durante el día PN50. Encontraron un menor porcentaje de ensayos correctos con la demora 0 s en los sujetos expuestos a nicotina al compararlos con el grupo control y en la demora de 20 s, un incremento drástico en la variabilidad de la conducta. Adicionalmente evaluaron la conducta en un laberinto radial de 8 brazo y los efectos de agentes noradrenérgicos sobre el efecto de la nicotina administrada de manera prenatal. Encontrando que los agonistas noradrenérgicos, generan deterioro significativo en la conducta de los sujetos control, pero no en los expuestos prenatalmente a la nicotina (Levin y cols., 1996).

En mamíferos otro sistema de neurotransmisión implicado en el neurodesarrollo y procesos cognoscitivos relacionados con el sistema colinérgico, es el endocrino (Main y cols., 2010), especialmente las hormonas esteroides, por ejemplo, la administración de nicotina prenatal reduce los niveles de la aromatasa del citocromo P450 (P450arom) el paso enzimático en la biosíntesis del estradiol a partir de testosterona, en el encéfalo de ratas macho (Duffy y cols., 2010; von Ziegler y cols., 1991), dicha interacción se ha propuesto que afecta procesos cognoscitivos como el aprendizaje y la memoria (Flood y cols., 1992). En este sentido, resalta un hecho muy interesante respecto a la interacción de estas hormonas y la nicotina, ya que modifican la actividad de la enzima CYP2A6, que se encarga de metabolizar a la nicotina (Higashi y cols., 2007).

Adicionalmente, la administración conjunta de estradiol y progesterona, dos hormonas esteroides neuroactivas, revierten los efectos amnésicos de antagonistas colinérgicos en un laberinto radial (Tanabe y cols., 2004). La infusión de progesterona en el hipocampo dorsal de ratón, mejora la ejecución en una tarea de reconocimiento de objetos (Orr y cols., 2009). Adicionalmente, se ha reportado que el tratamiento hormonal (estrógenos y progesterona) en mujeres posmenopáusicas, mejora la memoria de trabajo, verbal y episódica (Grigороva y Sherwin, 2006; Yonker y cols., 2006). Sumado a lo anterior, el estradiol y la progesterona tienen un efecto neuroprotector en humanos, modelos animales y celulares, ante el daño por excitotoxicidad (Vanoye-Carlo y cols., 2008) e isquemia (Canal-Castro y cols., 2012). Sin embargo, la nicotina inhibe los efectos neuroprotectores en CA1 del hipocampo de ratas, tras un episodio isquémico (Raval y cols., 2009).

4. Progesterona

La progesterona (pregn-4-ene-3, 20-dione) es una hormona esteroide neuroactiva, sintetizada a partir del colesterol, un componente de la membrana celular animal, este, en primera instancia es transformado en pregnanolona, mediante la actividad de la cadena lateral del citocromo P450_{SCC} y posteriormente la enzima 3β-hidroxiesteroide dehidrogenasa-iso-merasa (3β-HSD, por sus siglas en inglés) toma como sustrato a la pregnanolona y sintetiza progesterona (P), con la estructura característica de 4 anillos de hidrocarburo en el esqueleto de la molécula (Fig. 6). A su vez, sirve como precursor para otras hormonas como testosterona y estrógeno (Baulieu y cols., 2001; Germán-Castelán y cols., 2014; Robertson y Saraswati, 2014).

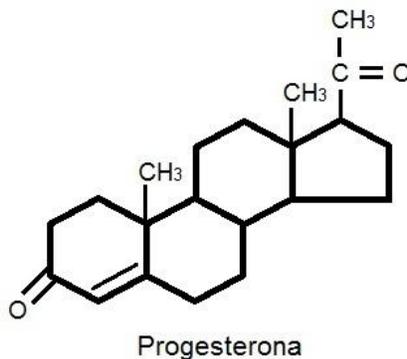


Fig. 6. Molécula de la progesterona.

La progesterona activa múltiples vías de señalización: la regulación de expresión génica después de unirse a su receptor intracelular clásico (RP), la interacción con componentes específicos en la membrana asociados a proteínas G (mPR, PGRMC1 y PGRMC2) y la modulación del receptor GABA_A y la subsecuente entrada de cloro a la célula (Baulieu y cols., 2001; Brinton y cols., 2008; Guennoun y cols., 2015; Melcangi y cols., 1999; von Bohlen und Halbach y Dermietzel, 2006). El receptor clásico de progesterona se define como factor de transcripción activado por ligando (Fig. 7, A) y fue descrito en la década de 1970. En ausencia de la hormona el receptor forma un complejo proteínico con moléculas chaperonas como las proteínas de choque térmico o de calor (hsp: *heat shock protein*); hsp90, hsp70 y hsp40. Este arreglo es una condición *sine qua non*, para la activación del receptor. Los receptores intracelulares activados funcionan como factores de

transcripción, se unan a sitios específicos en el promotor para la transcripción de un gen, esto permite que el complejo ligando-receptor induzca o reprima la transcripción de un gen uniéndose a secuencias específicas de ADN aumentando o disminuyendo la producción de ARNm del gen diana en un tejido particular. El receptor intracelular o factor de transcripción activado por progesterona tiene tres dominios: un dominio de unión al ligando, uno de unión al ADN y uno de transactivación, cada uno de los cuales desarrolla etapas específicas en la transducción de la señal. La unión de la progesterona al primer dominio permite el desacoplamiento de las moléculas chaperonas y posteriormente la dimerización del receptor, activándolo. El dominio de unión al ADN se une a secuencias específicas de éste, llamados elementos de respuesta a la progesterona (ERPs), adyacentes a los genes diana, posteriormente el dominio de transactivación interactúa con otros factores de transcripción para regular la transcripción de los genes diana. Estos dos últimos dominios juntos actúan como el transmisor en la vía de la transducción de la señal (Brinton y cols., 2008; Levine y cols., 2001).

En el estado activo el complejo RP-P se une a elementos de respuesta específicos para la progesterona en el promotor del gen (o genes) diana y con ello estimula o inhibe la transcripción. La unión al ADN y la regulación transcripcional, además implican proteínas de coactivación, que mejoran la actividad transcripcional sin alterar la actividad basal del promotor o que inhiben al RP, como el coactivador del receptor a esteroides 1 y 2, proteína de unión a CREB (*cAMP response element-binding protein*: proteína ligada a la respuesta de AMP cíclico), proteína de interacción con el receptor, específicamente la que tiene un peso molecular de 140 kDa, así como receptores a estrógenos (SRC-1 y SRC-2, CBP, RIP140, ER, por sus siglas en inglés respectivamente). Los ERPs clásicos no son indispensables para que la progesterona regule la expresión de algunos genes; dicha regulación puede estar mediada por mecanismos genómicos alternativos como el factor de transcripción SP1 o bien, por mecanismos no genómicos como la activación de cascadas de señalización mediadas por segundos mensajeros (Brinton y cols., 2008; Boonyaratankornkit y Edwards, 2004; Levine y cols., 2001; Masuyama y cols., 2001; Zhu y cols., 2003).

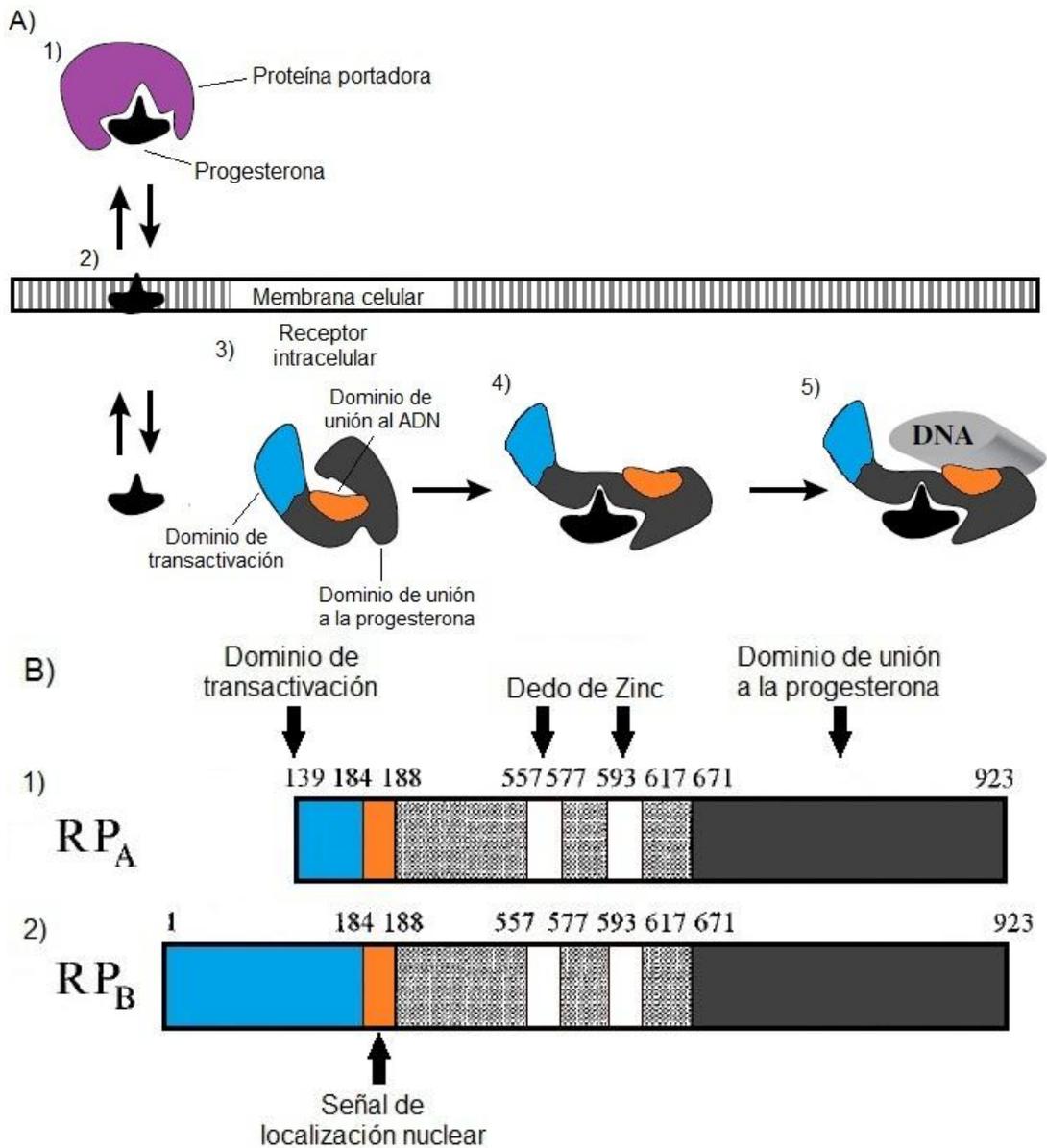


Fig. 7. Receptor para progesterona. A) Representación esquemática de la activación de la transcripción por la progesterona. 1) La hormona es llevada a su sitio de acción mediante una proteína portadora, 2) la progesterona atraviesa la membrana, 3) se une al receptor intracelular, 4) el cambio conformacional en el receptor expone el dominio de unión al ADN, 5) dicho dominio se une a una secuencia específica en el ADN y el dominio de transactivación se une a la ARN polimerasa, regulando la transcripción del gen. B) Representación esquemática del ARNm que codifica al RPmn. Muestra las regiones del receptor. Los números sobre los rectángulos indican los aminoácidos que flanquean las regiones funcionales. Traducido y adaptado de Brinton y cols., 2008; Gilbert, 2000; Levine y cols., 2001.

En el SNC la acción de la progesterona es mediada principalmente por una o dos isoformas del RP (Fig. 7, B), la proteína con la N-terminal corta (RP_A) y la proteína larga o completa (RP_B), determinadas por dos promotores diferentes en el mismo gen el PGR en humanos localizado en el cromosoma 11q22-q23 (con 8 exones) y

en ratas en el cromosoma 8q11 (con 9 exones). Así mismo, presentan actividad funcional diferencial, por ejemplo el RP_B activa la transcripción de ciertos genes de manera más intensa que el RP_A , mientras que RP_A puede actuar como receptor dominante bajo determinadas circunstancias; de esta manera algunos tejidos con mayor proporción de RP_A con respecto a RP_B pueden presentar una menor respuesta a la progesterona mediada por este tipo de receptores (Brinton y cols., 2008; Levine y cols., 2001; Vegeto y cols., 1993).

Numerosos estudios son consistentes en la descripción de la distribución de los $RP_{A/B}$ en el sistema nervioso central. La razón entre la expresión de las dos isoformas, puede variar dependiendo del tejido como en el hipocampo y la amígdala, las condiciones fisiológicas y el sexo por ejemplo, en el hipotálamo de ratas macho hay mayor densidad de RP_A que RP_B , pero en el cerebelo es mayor la expresión de RP_B . Es predecible que el hipotálamo exprese alta densidad de receptores para progesterona, considerando el sistema de retroalimentación negativa para la regulación hormonal involucrada en la conducta sexual, de hecho abundante evidencia indica que así es, en particular núcleos como el área preóptica, el núcleo ventromedial y el núcleo arcuato; en el hipotálamo, núcleos de la amígdala y CA1 del hipocampo se ha demostrado que el estrógeno estimula la expresión de RP, al menos de manera moderada, no obstante esta regulación no se observa en otras regiones del SNC como en la corteza (incluyendo corteza frontal), el giro dentado y CA3 del hipocampo, en el *septum*, *caudado-putamen*, núcleo supraóptico y el cerebelo (Brinton y cols., 2008; Guennoun y cols., 2015; Guerra-Araiza y cols., 2002, 2003; Kato y cols., 1994; Krebs y cols., 2000; Levine y cols., 2001; Mann y Babb, 2005).

Los esteroides puede promover efectos no genómicos, esta respuesta es mediada por receptores con propiedades diferentes a los receptores intracelulares, como resultado de la búsqueda de este tipo de proteínas se ha encontrado otro receptor a progesterona que está localizado en la membrana celular es llamado mRP, presenta siete segmentos transmembranales y tiene características de un receptor acoplado a proteína G (Fig. 8). Cuando la progesterona interacciona con este

receptor, se desacopla de una proteína G que modifica la actividad de la adenilato-ciclase, afectando los niveles intracelulares de AMPc, así mismo, media una rápida respuesta de Ca^{2+} produciendo una cascada de señalización no genómica. Se han descrito cinco subtipos del mRP: α , β , γ , δ y ϵ ; de los cuales, las formas α , β y γ activan a una proteína G_i disminuyendo los niveles de AMPc, mientras que las formas δ y ϵ activan una proteína G_s aumentando la concentración intracelular de AMPc. Se han detectado las cinco isoformas en el SNC de diversas especies como humanos, ratones y ratas (Fig. 9), pero con distribuciones diferenciadas; el mRP α se ha descrito en el bulbo olfatorio, corteza cerebral (particularmente el lóbulo temporal), hipocampo, *septum*, estriado, tálamo, hipotálamo, hipófisis, cerebelo y medula espinal; la forma β es altamente expresada en la corteza cerebral, hipocampo, núcleo caudado, sustancia *nigra*, tálamo, hipotálamo, cerebelo, cuerpo caloso y medula espinal. El mRP γ muestra los niveles más bajos de expresión y se localiza en la medula espinal, en el plexo coroideo y en la protuberancia, por otra parte la isoforma δ es mayormente expresada en el mesencéfalo, hipotálamo, amígdala, cuerpo caloso y medula espinal y finalmente, la isoforma ϵ se encuentra predominantemente en la hipófisis e hipotálamo (Brinton y cols., 2008; Boonyaratanakornkit y Edwards, 2004; Guennoun y cols., 2015; Meffre y cols., 2013; Pang y cols., 2013; Zhu y cols., 2003).

Adicionalmente, en los 90's el grupo de investigación de Meyer, purificó y realizó una secuenciación parcial de un componente proteico con alta afinidad en la membrana celular de porcino, candidato a receptor de membrana para progesterona. Selmin y sus colaboradores describieron un análogo de esta proteína en ratas Sprague-Dawley, llamado 25-Dx, posteriormente renombrado como componente 1 del receptor a progesterona acoplado a la membrana (PGRMC1: *progesterone receptor membrane component 1*). Este componente no funciona como un receptor tradicional, debido a que requiere estar unido a un elemento de ARNm de serpiente, conocido como Serbp1, adicionalmente el PGRMC1 no comparte homología con otros receptores para progesterona; activa cinasas y fosforila Akt. Así mismo se describió una isoforma del PGRMC1, conocida como PGRMC2 (*progesterone receptor membrane component 2*), la cual

presenta diferencias estructurales en la N-terminal y en su ubicación cromosómica, sin embargo su función aún no está clara (Brinton y cols., 2008; Guennon y cols., 2015; Intlekofer y Petersen, 2011; Krebs y cols., 2000; Meyer y cols., 1996; Selmin y cols., 1996).

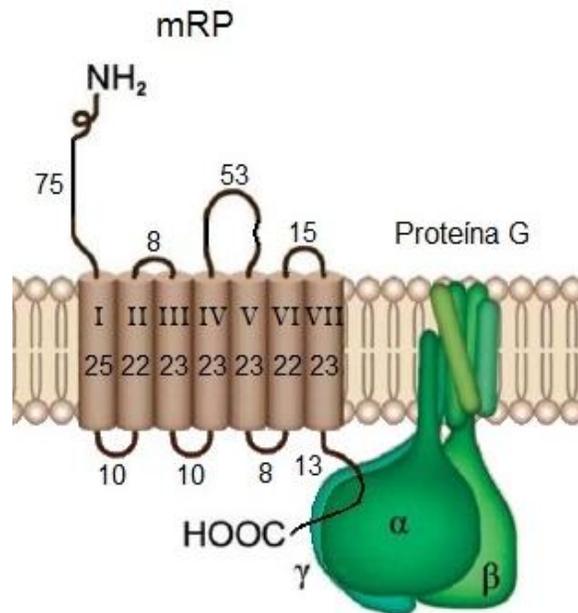


Fig. 8. Representación esquemática del receptor a progesterona con 7 segmentos transmembranales (I-VII); acoplado a una proteína G. Los números representan los residuos de aminoácidos que conforman cada segmento de la proteína receptora. Modificado de von Bohlen und Halbach y Dermietzel, 2006 y basado en Zhu y cols., 2003.

En humanos se encuentran ambos genes ortólogos: PGRMC1 localizado en el cromosoma Xq22-q24 y codifica a una proteína de 195 aa. Y PGRMC2 en el cromosoma 4q26 y codifica a una proteína de 223 aa. En ratas los genes homólogos se encuentran en el cromosoma Xq12 y 2q26 y codifican a una proteína con 223 y 217 aa, respectivamente. Y ambos componentes se han encontrado en diversas estructuras del SNC (Fig. 9), como en el bulbo olfatorio especialmente en la corteza periforme; la formación hipocampal particularmente en giro dentado y las capas piramidales de CA1, CA2 y CA3; en la amígdala, el *septum*, núcleos interpedunculares, colículos superiores, sustancia *nigra*, el área ventral tegmental, en la sustancia gris periacueductal, tálamo y principalmente, en el hipotálamo, no obstante la población del componente 1 en todos los casos es mayor que la del componente 2 (Guennoun y cols., 2015; Intlekofer y Petersen, 2011; Krebs y cols., 2000; Liu y cols., 2009; Meffre y cols., 2005).

Distribución de receptores para progesterona en el cerebro de rata

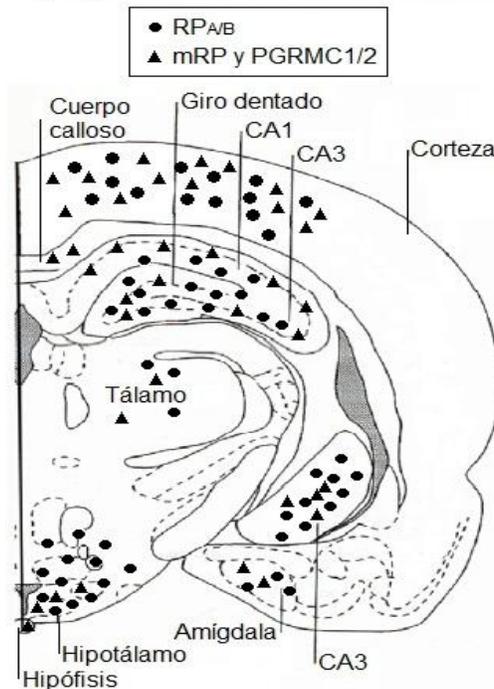


Fig. 9. Distribución de las dos isoformas del receptor a progesterona en la corteza, hipocampo, amígdala, diencéfalo e hipófisis de la ratona. Muestra la localización en un diagrama coronal del hemisferio izquierdo de la ratona mediante técnicas de *Western Blot*, *Northern Blot*, *RT-PCR* e hibridación *in situ*. Basado en Brinton y cols., 2008; Guerra-Araiza y cols., 2002, 2003; Kato y cols., 1994; Krebs y cols., 2000; Meffre y cols., 2013; Pang y cols., 2013; Zhu y cols., 2003.

Como neuroesteroide, la progesterona, puede ser sintetizada *de novo* en el SNC, en neuronas o glía e interactúa con sistemas de neurotransmisión, por ejemplo potenciando la actividad del receptor GABA_A, al interactuar directamente con él, independientemente de un efecto genómico (Baulieu y cols., 2001; Melcangi y cols., 1999; Mellon y Griffin, 2002; von Bohlen und Halbach y Dermietzel, 2006). Aunque las funciones más estudiadas de esta hormona están relacionadas con la regulación de la conducta sexual y embarazo; recientemente se han descrito sus efectos de regulación y control sobre células cancerosas e interesantemente, como neuroprotector (Brinton y cols., 2008; Germán-Castelán y cols., 2014; Mann y Babb, 2005; Robertson y Saraswati, 2014). Una de principales observaciones que permitieron el descubrimiento de sus efectos como neuroprotector fue que las hembras de diferentes especies de mamíferos, presentan consistentemente mejor desempeño y mayor rendimiento que los machos, después de sufrir un episodio isquémico o traumatismo (Roof y Hall, 2000).

4.1. Progesterona como neuroprotector

La progesterona participa en una gran variedad de funciones biológicas incluyendo la reproducción, diferenciación sexual, el metabolismo, el desarrollo del cerebro, cognición, especialmente en el aprendizaje y la memoria, entre otros (Guerriero, 2009; Hammes y Levin, 2007). Evidencia reciente indica que la progesterona tiene múltiples funciones en el sistema nervioso central en la regulación cognoscitiva, emocional, neuroprotector, procesos antiinflamatorios, antiapoptóticos, antioxidantes y antiexcitotóxicos por agonistas glutamatérgicos, incrementa la actividad mitocondrial, promoviendo la cadena respiratoria, neurogénesis, regeneración, mielinización en el sistema nervioso periférico y en la recuperación funcional tras una lesión cerebral traumática, así como estabilización de la barrera hematoencefálica, reducción de edema cerebral y contrarresta el estrés oxidativo (Baulieu y Schumacher, 2000; Brinton y cols., 2008; De Nicola y cols., 2009; Espinosa-García y cols., 2014; Irwin y cols., 2008; Johann y Beyer, 2013; Robertson y Saraswati, 2014; Roof y Hall, 2000).

5. Justificación

La integridad estructural y funcional del sistema colinérgico a lo largo de la gestación es fundamental para el óptimo proceso de desarrollo y maduración del SNC, comunicación celular e integración de la información en el organismo, especialmente en el aprendizaje y la memoria. Los diferentes componentes del sistema colinérgico interactúan de manera específica según las estructuras involucradas y la etapa del desarrollo; el papel de los diferentes subtipos de receptores nicotínicos es crucial, debido a la permeabilidad diferencial para los iones, en especial para el Ca^{2+} , principalmente por la cascada de señalización intracelular que desencadena, como la activación de CREB y la subsecuente regulación sobre la expresión génica, así como a su participación como mediadores de factores tróficos desde etapas tempranas. Los receptores nicotínicos presentan afinidad diferenciada por distintas moléculas, como acetilcolina y agonistas exógenos como nicotina. La exposición prenatal a nicotina en mamíferos es capaz de producir alteraciones neurofisiológicas, conductuales y cognitivas persistentes hasta etapas adultas, incluyendo al proceso de aprendizaje asociativo como es la discriminación de estímulos, derivada de alteraciones morfológicas, neuroquímicas y de conectividad en la corteza e hipocampo, relacionados con la actividad de señalización intracelular como es la entrada de calcio y la activación de los receptores nicotínicos, especialmente, los receptores formados por las subunidades $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\beta 2$ y $\beta 4$. Dichas alteraciones presentan diferencias entre sexo, lo cual se ha asociado a los efectos de hormonas esteroideas como la progesterona, la cual, ha mostrado tener efectos como neuroprotector ante daño celular generado por isquemia e interacción con agentes neurotóxicos. Sin embargo, persiste la duda respecto a los efectos por la exposición prenatal a nicotina sobre la adquisición de la discriminación visual, la memoria a corto plazo de esta tarea y especialmente, sobre el efecto de la administración postnatal de progesterona, así como los correlatos neuroanatómicos asociados a ambas interacciones.

6. Objetivos

- 1.** Analizar el efecto de la administración prenatal de nicotina sobre el aprendizaje asociativo en etapas adultas de la rata, a través de un paradigma de discriminación visual.
- 2.** Evaluar el efecto de la administración prenatal de nicotina sobre la memoria a corto plazo en etapas adultas de la rata, mediante la presentación de demoras variables (0, 2, 4, 8, 16 y 32 s) en un paradigma de discriminación visual.
- 3.** Describir el efecto de la administración de progesterona en etapa adulta de la rata, sobre los efectos de la exposición prenatal a nicotina en el aprendizaje asociativo través de un paradigma de discriminación visual.
- 4.** Estudiar el efecto de la administración postnatal de progesterona sobre los efectos de la exposición prenatal a nicotina en la memoria a corto plazo de la rata, mediante la presentación de demoras en un paradigma de discriminación visual.
- 5.** Analizar los efectos de la administración prenatal de nicotina y de la administración de progesterona en etapas posnatales (adultez) sobre las dimensiones y peso del encéfalo y su relación con el aprendizaje asociativo.

7. Hipótesis

- 1.** La administración prenatal de nicotina producirá un deterioro en el aprendizaje asociativo de estímulos visuales en etapas adultas de la rata.
- 2.** La administración prenatal de nicotina producirá un desplazamiento hacia la izquierda de la curva de olvido en etapas adultas de la rata.
- 3.** La administración de progesterona durante la adultez revertirá los efectos negativos de la exposición prenatal a nicotina, sobre el aprendizaje asociativo de estímulos visuales de la rata adulta.
- 4.** La administración de progesterona durante la adultez revertirá los efectos negativos de la exposición prenatal a nicotina, sobre la curva de olvido de la rata adulta.
- 5.** La administración prenatal de nicotina, producirá cambios en las características anatómicas del encéfalo y en estructuras relacionadas con el aprendizaje asociativo de ratas adultas.

8. Método

8.1. Sujetos

Se utilizaron 12 ratas hembra gestantes de la cepa Wistar (provenientes del bioterio de la Facultad de Psicología, UNAM) con 2 1/2 meses de edad y 35 de sus crías macho. Todos los sujetos fueron mantenidos con acceso libre al agua y al alimento, alojados individualmente (excepto durante la lactancia) con humedad ambiental al 70 %, temperatura constante (21 ± 1 °C) y bajo un ciclo luz-oscuridad de 12-12 h; las luces se encendían a las 8:00 h y se apagaban a las 20:00 h. A lo largo del estudio se realizaron todos los esfuerzos para evitar cualquier daño innecesario o sufrimiento a los animales y en todas las fases y procedimientos del estudio se respetaron las normas de uso y cuidado de animales de laboratorio (Norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999).

8.2. Fármacos

Se administró el agonista colinérgico no competitivo nicotina ((-) Nicotina ditartrato) (Tocris Bioscience, EUA) en una dosis de 2.0 mg/Kg/día, disuelta en solución salina (NaCl) isotónica al 0.9 % como vehículo, administrada mediante minibombas osmóticas de 1.0 ml (ALZET®) implantadas el séptimo día de gestación (G7). La progesterona se administró vía intraperitoneal (i.p.) en dosis de 1.0 mg/Kg, disuelto en 0.1 ml de aceite de sésamo como vehículo a partir del día posnatal 41 (PN41) y hasta el día posnatal 60 (PN60).

8.3. Materiales e instrumentos

Se utilizó un laberinto de dos opciones de acrílico negro, conformado por un compartimiento de salida (40x14x25 cm), un compartimiento de elección (40x40x35 cm) y dos compartimentos meta (40x20x25 cm), estos últimos divididos por una pared de acrílico negro. El compartimiento de salida estaba confinado por una puerta de guillotina para separarlo del compartimiento de elección y equipado con un foco de 4 W a 12.0 cm del suelo, a través del cual se presentó el estímulo discriminativo. Cada compartimiento meta contaba con un dispensador para el reforzador (comedero) ubicado a 3.0 cm a la derecha de la pared izquierda y a 2.0 cm sobre el suelo, en el cual se entregaba 1.0 g de alimento sólido como

reforzador (arroz inflado sabor chocolate: *Choco-Krispis*®). La presentación del estímulo, la entrega del reforzador y el registro de las respuestas, se llevaron a cabo por el experimentador.

8.4. Diseño experimental

El diseño experimental es de grupos independientes, los grupos de sujetos y condiciones experimentales se resumen en el siguiente cuadro:

Tabla 4. Diseño experimental y definición variables.

Condición Grupo (n)	VI ₁ :Exposición prenatal a nicotina G7-PN7	VI ₂ :Administración progesterona PN41-PN60	VD ₁ : Evaluación conductual PN61	VD ₂ : Evaluación neuroanatómica PN150
Control (11)	No	No	Si	Si
Nicotina (8)	Si	No	Si	Si
Progesterona (8)	No	Si	Si	Si
Nic+Prog (8)	Si	Si	Si	Si

Tabla 4. Muestra el diseño experimental. Los grupos, la variable independiente 1 (VI₁) administración prenatal de nicotina durante días de gestación 7 a 21 (G7-G21) y posnatales 1-7 (PN1-PN7), periodo que corresponde a la etapa de desarrollo fetal de la rata. La variable independiente 2 (VI₂) exposición a progesterona durante los días posnatales 41 a 60 (PN41-PN60, adultez). La variable dependiente 1 (VD₁) evaluación conductual: aprendizaje asociativo con estímulos visuales (discriminación de luz y no-luz) a partir del día posnatal 61 (PN61, adultez) y curva de olvido con demoras de 0, 2, 4, 8, 16 y 32 segundos. Finalmente, la variable dependiente 2 (VD₂) evaluación neuroanatómica: volumen y peso del encéfalo el día postnatal 150 (PN150).

8.5. Procedimiento

8.5.1. Manipulaciones iniciales

Para la implantación de la minibomba durante el día de gestación 7 (G7) se anestesió a las madres gestantes con pentobarbital sódico (13.0 mg/Kg, i.p.). Se hizo una incisión de 4 mm en el lomo previamente afeitado, esterilizado y anestesiado localmente con Xilocaina al 2 %. Posteriormente, se colocó la minibomba osmótica a 6 mm de profundidad, se cerró la herida con un punto de sutura y se regresó la rata a su respectiva caja-hogar en donde se supervisó la recuperación (Berger y cols., 2010). Las minibombas para los grupos experimentales, liberaban 2.0 mg/Kg/día de nicotina, concentración equivalente a

un paquete de cigarrillos al día en humanos fumadores (Levin y cols., 1996), para las hembras de los grupos control se realizó el mismo procedimiento quirúrgico, sin embargo se implantaron bombas únicamente con solución salina.

Una vez que nacieron las crías se registró el número de crías por camada, el porcentaje de crías que fallecieron durante los primeros 7 días posnatales y en todos los sujetos de ambos grupos (sin nicotina prenatal (control, n=19) y expuesto a nicotina durante la gestación (nicotina, n=16)), se tomaron las medidas de desarrollo. En PN0 y posteriormente, una vez a la semana (cada 8 días) se registraron las dimensiones craneofaciales: longitudinal (desde la punta de la nariz hasta la base del cráneo) y la circunferencia del cráneo a la altura de los auriculares, ambas en centímetros. Así mismo, desde PN0 hasta PN60 cada 24 horas (17:00 h) se registró el peso corporal en gramos y la talla desde la punta de la nariz hasta la base de la cola en centímetros.

El peso corporal promedio durante los últimos tres días consecutivos (PN58-PN60) previos al inicio de las manipulaciones conductuales en PN61, se consideró como la línea base de peso. Posteriormente, se restringió la ingesta a 5.0 g de alimento por cada 100.0 g de peso, con el fin de disminuir el peso corporal de los sujetos experimentales al 90 % de la línea base, cuidando que éste no disminuyera por debajo del 85 % y realizando los ajustes pertinente de acuerdo a la tasa de crecimiento de los sujetos. La restricción en el acceso al alimento tiene el propósito de controlar el nivel de motivación del sujeto para obtener el reforzador. Desde el día de nacimiento y a lo largo de todas las manipulaciones, los sujetos fueron mantenidos en condiciones de acceso libre al agua.

A partir de PN 41, el grupo control fue dividido aleatoriamente en dos grupos: **1)** Control (n=11) y **2)** Progesterona (Prog, n=8), al cual se le administró la hormona durante tres semanas consecutivas (días PN41 a PN60), previas al entrenamiento en la tarea de discriminación. El grupo con exposición prenatal a nicotina se dividió aleatoriamente en grupo: **1)** Nicotina (Nic, n=8) y **2)** Nicotina prenatal más progesterona posnatal (Nic+Prog, n=8) en el cual se administró la progesterona durante los días PN41 a PN60. Las evaluaciones conductual y anatómica se

llevaron a cabo durante la adultez a partir del día posnatal 61 (PN61) y el día PN150, respectivamente.

8.5.2. Entrenamiento en discriminación visual

Una vez que los sujetos experimentales alcanzaron la edad indicada (PN61) se realizaron 2 sesiones de habituación en el laberinto de dos opciones con el objetivo de que las ratas exploraran y se familiarizaran con el instrumento. Inmediatamente después inició la fase de entrenamiento en discriminación visual.

El entrenamiento se llevo a cabo diariamente 6 sesiones por semana, las cuales iniciaron a la misma hora. Cada sesión estuvo compuesta por 20 ensayos, en cada uno de los cuales, se presentaba al sujeto uno de los dos estímulos visuales (A: foco encendido (luz) o B: foco apagado (no-luz)) en una secuencia semialeatoria con la condición de que cada estímulo no se presentara más de 3 veces consecutivas. Las condiciones de asociación entre el estímulo (A o B) y la respuesta apropiada fueron contrabalanceadas con el fin de evitar un sesgo por lateralidad.

Cada ensayo iniciaba colocando al sujeto en el corredor de salida, el cual se encontraba cerrado y se presentaba el estímulo discriminativo (luz o no-luz de acuerdo con la secuencia) durante un periodo aleatorio entre 2 y 5 segundos, terminando éste período se abría la compuerta de salida, dando acceso al sujeto al compartimento de elección y a los brazos meta; permitiendo que el sujeto emitiera la respuesta correspondiente. El ensayo concluía una vez que el sujeto consumía el reforzador o inmediatamente después de ingresar al compartimento meta inadecuado. Terminado el ensayo, se regresaba al sujeto al compartimento de salida en donde permanecía durante un intervalo entre ensayos de 1 a 4 segundos y se repetía el procedimiento hasta completar 10 ensayos para el estímulo luz y 10 para el estímulo no-luz. Cada sesión concluía una vez que transcurrían 20 minutos o cuando el sujeto obtuviera 20 reforzadores, lo que ocurriera primero. El criterio de adquisición de la tarea para cada sujeto era de ≥ 90 % de ensayos correctos durante 3 sesiones consecutivas.

8.5.3. Pruebas con demoras variables

Las pruebas con demoras se iniciaron 24 horas después de que cada sujeto cumpliera los criterios de adquisición anteriormente descritos, cada sujeto recibió 3 sesiones de prueba con demoras, en las cuales se introdujeron aleatoriamente 6 ensayos con demoras variables (0, 2, 4, 8, 16 y 32 s) entre la presentación del estímulo (luz) y el acceso al compartimento de elección, además de omitir la entrega del reforzador. Los ensayos con demora se intercalaron aleatoriamente entre 14 ensayos idénticos a los presentados durante las sesiones de entrenamiento para evitar un proceso de extinción. Así mismo, entre las sesiones de prueba con demora se presentaron sesiones de entrenamiento para que los sujetos mantuvieran el nivel de discriminación ≥ 90 % de ensayos correctos.

8.5.4. Evaluación de coordinación fina

Adicionalmente, en el día posnatal 120 (PN120) se realizó una evaluación de coordinación fina en todos los sujetos de los diferentes grupos, misma que consistió en pelar una semilla de girasol (*Helianthus annuus*), se registró el tiempo desde el momento de acceso a la semilla hasta retirar por completo el pericarpo (epicarpo) y sacar la semilla (pulpa) y los errores definidos como el número de veces que el sujeto dejaba caer la semilla.

8.5.5. Evaluaciones neuroanatómicas

Concluidas las fases experimentales, en el día PN150 los sujetos fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital sódico (80.0 mg/Kg, i.p.), se les realizó una perfusión transcardial con solución salina al 0.9 % y formaldehído 4 %, ambos en una razón de 100 ml por cada 100 g de peso del sujeto. Posteriormente, los sujetos fueron decapitados, se extrajeron los cerebros y se registró su peso (g) y volumen (cm³), así mismo, se fotografiaron individualmente para el registro y presentación de los datos.

8.6. Análisis de los datos

Se utilizó una t de Student para grupos independientes, para comparar el promedio de crías paridas por camada en el grupo control y el grupo expuesto a nicotina, así como el porcentaje de crías que murió durante los primeros 7 días

posnatales, como una medida de mortalidad y las medidas cráneofaciales, los datos del peso y la talla de las crías registrados en PN0. Las medidas de desarrollo (peso corporal y talla) de PN1 hasta PN60 se agruparon en bloques de 5 días y fueron comparadas mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, considerando los días posnatales (bloques) como factor A y los grupos como factor B; al encontrar diferencias estadísticamente significativas se realizó un análisis *post-hoc* de Bonferroni.

En la adquisición se consideró la latencia y el porcentaje de ensayos correctos durante cada sesión, hasta observar una ejecución ≥ 90 %. Se registró el número total de sesiones necesarias para alcanzar el criterio de adquisición en cada grupo, esto se comparó mediante un ANOVA de una vía para grupos independientes; al encontrar diferencias estadísticamente significativas se aplicó un análisis de comparación múltiple de Tukey para identificar entre cuales grupos se presentaban dichas diferencias.

En cuanto a los datos obtenidos durante la evaluación con demoras se realizó una correlación de Pearson entre las demoras (0, 2, 4, 8, 16, 32 s) y el porcentaje de ensayos correctos (entradas al brazo asociado a luz encendida) y otra con la latencia de respuesta (tiempo transcurrido entre la apertura de la puerta y el ingreso del sujeto a alguno de los brazos meta), para cada uno de los cuatro grupos. Así mismo, para la descripción de las curvas de olvido de cada grupo, se aplicó un ajuste de decaimiento exponencial combinado con un ajuste lineal, utilizando la siguiente ecuación:

$$f=y_0+a*\exp(-b*x)+c*x$$

Dónde y_0 es el valor de la ordenada al origen; x es el valor y los parámetros a , b y c son estimados a partir de los datos en x .

Además, se realizó una regresión lineal para las curvas de olvido de cada grupo para obtener los parámetros de pendiente, valor máximo y mínimo de la curva, mediante la siguiente ecuación:

$$f=y_0+a*x$$

Dónde y_0 es la ordenada al origen, a es el valor de la pendiente y x es el dato estimado.

Los parámetros fueron comparados entre sí mediante un ANOVA de una vía para grupos independientes, en caso de encontrar diferencias estadísticamente significativas se aplicó un análisis de comparación múltiple de Tukey. Adicionalmente, a partir de ambas ecuaciones se obtuvo el punto de indiferencia subjetiva para cada grupo. Finalmente, para comparar la latencia entre grupos se utilizó un ANOVA de dos vías, considerando como factores a las demoras y a los grupos; en caso de encontrar diferencias estadísticamente significativas se realizó un análisis *post-hoc* de Bonferroni.

Durante la evaluación de coordinación fina, se registró el tiempo que los sujetos tardaban en pelar la semilla de girasol y el número de errores. Estos datos se compararon con un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis y al encontrar diferencias estadísticamente significativas se aplicó un análisis *post-hoc* de Dunn.

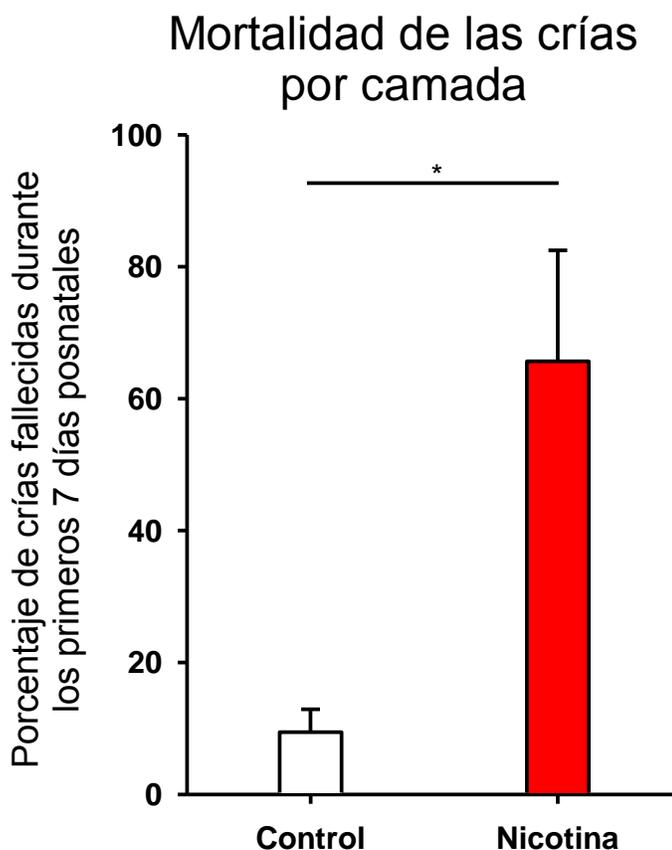
Finalmente, se compararon los datos de peso y volumen del encéfalo, mediante un ANOVA de una vía para grupos independientes.

En todos los casos se consideró un alfa de 0.05 %, para la significancia de los resultados estadísticos.

9. Resultados

9.1. Natalidad en el experimento y mortalidad de las crías por camada

En total las ratas madre dieron a luz a 45 crías macho y 58 crías hembra en el día 21 de gestación, mismo que fue definido como el día posnatal cero (PN0), las madres de los grupos sin nicotina prenatal (Control, n=4) tuvieron entre 9 y 12 crías por camada (10.75 ± 0.75 crías; media \pm error estándar) mientras que las madres de los grupos con nicotina prenatal (Nicotina, n=8) alumbraron entre 2 y 18 crías por camada (7.5 ± 2.13 crías), no se observaron diferencias entre el número de crías por camada ($t_{(10)}=1.035$, $p=0.3249$), sin embargo al comparar el porcentaje de crías que murieron durante la primera semana posnatal, si se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($t_{(10)}=2.298$, $p<0.05$); en el grupo Control se encontró un porcentaje de mortalidad de 9.444 ± 3.469 % mientras que en el grupo Nicotina fue 65.67 ± 16.81 % (Gráfica 1).



Gráfica 1. Presenta el porcentaje de mortalidad de las crías durante los primeros 7 días posnatales de ambos grupos: control y con exposición prenatal a nicotina. Media \pm error estándar de la media (EEM). * $p<0.05$.

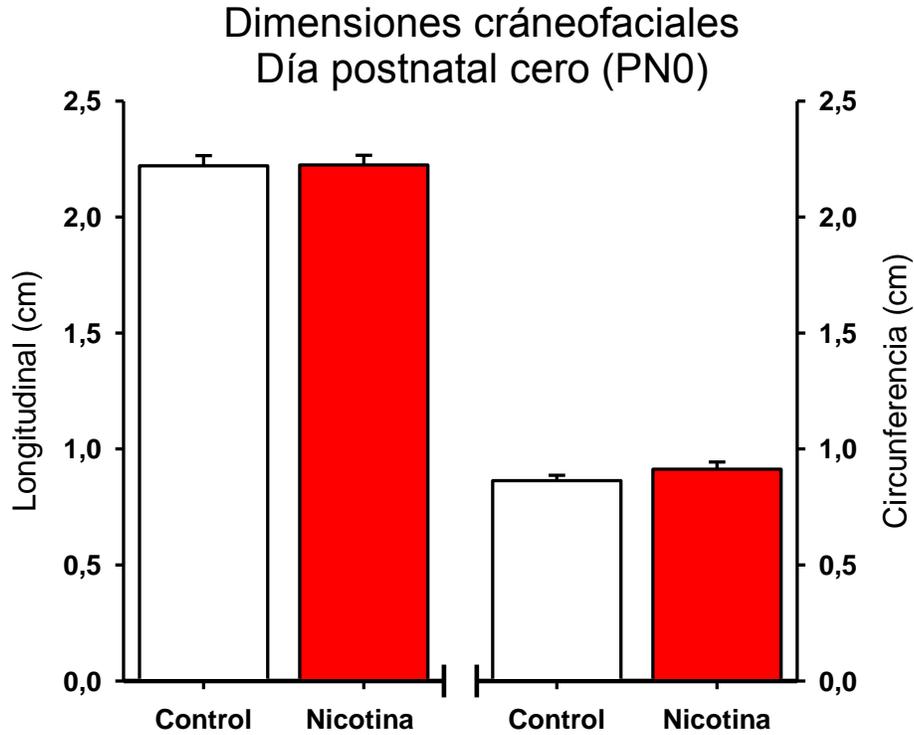
9.2. Desarrollo

9.2.1. Día posnatal cero (PN0)

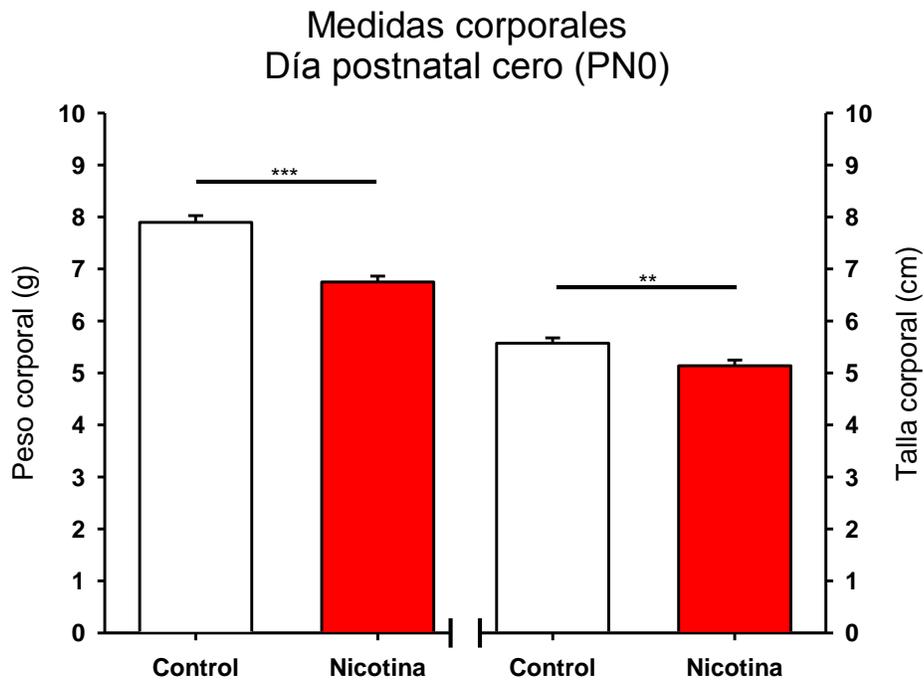
Como medidas de desarrollo durante el día de nacimiento (PN0) se consideraron las dimensiones craneofaciales longitudinal, definida como la distancia en centímetros (cm) entre la punta de la nariz y la base del cráneo, la circunferencia del cráneo a la altura de los auriculares (cm), el peso corporal (g) y la talla, definida como la distancia en cm entre la punta de la nariz y la base de la cola para cada sujeto. Estos datos fueron comparados con una T de Student entre el grupo sin nicotina prenatal (control, n=19) y el grupo expuesto a nicotina durante la gestación (nicotina, n=16).

En cuanto a las dimensiones craneofaciales, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Gráfica 2). En la medida longitudinal se encontró una media y error estándar de la media (EEM) igual a 2.221 ± 0.04365 cm para el grupo Control e igual a 2.2244 ± 0.04180 cm para el grupo Nicotina, mostrando un valor de $t_{(33)}=0.3713$ con probabilidad mayor a 0.05 ($p=0.7128$) (Gráfica 2, izquierda). Tampoco se encontraron diferencias en la circunferencia del cráneo ($t_{(33)}=1.286$, $p=0.2073$); con media y EEM igual a 0.8632 ± 0.02321 cm para el grupo Control y a 0.9125 ± 0.03146 cm en el grupo con Nicotina (Gráfica 2, derecha).

Por el contrario, cuando se compararon las medidas corporales (Gráfica 3) si se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos; para el peso corporal ($t_{(33)}=6.537$, $p<0.0001$), con media y EEM de 7.895 ± 0.1301 g para el grupo Control y de 6.750 ± 0.1118 g para el grupo Nicotina (Gráfica 3, izquierda). Mientras que en la talla se observó un valor de $t_{(33)}=2.889$ con $p<0.01$; la media y EEM en el grupo Control fue igual a 5.574 ± 0.1017 cm y en el grupo con Nicotina prenatal fue igual a 5.138 ± 0.1118 cm (Gráfica 3, derecha).



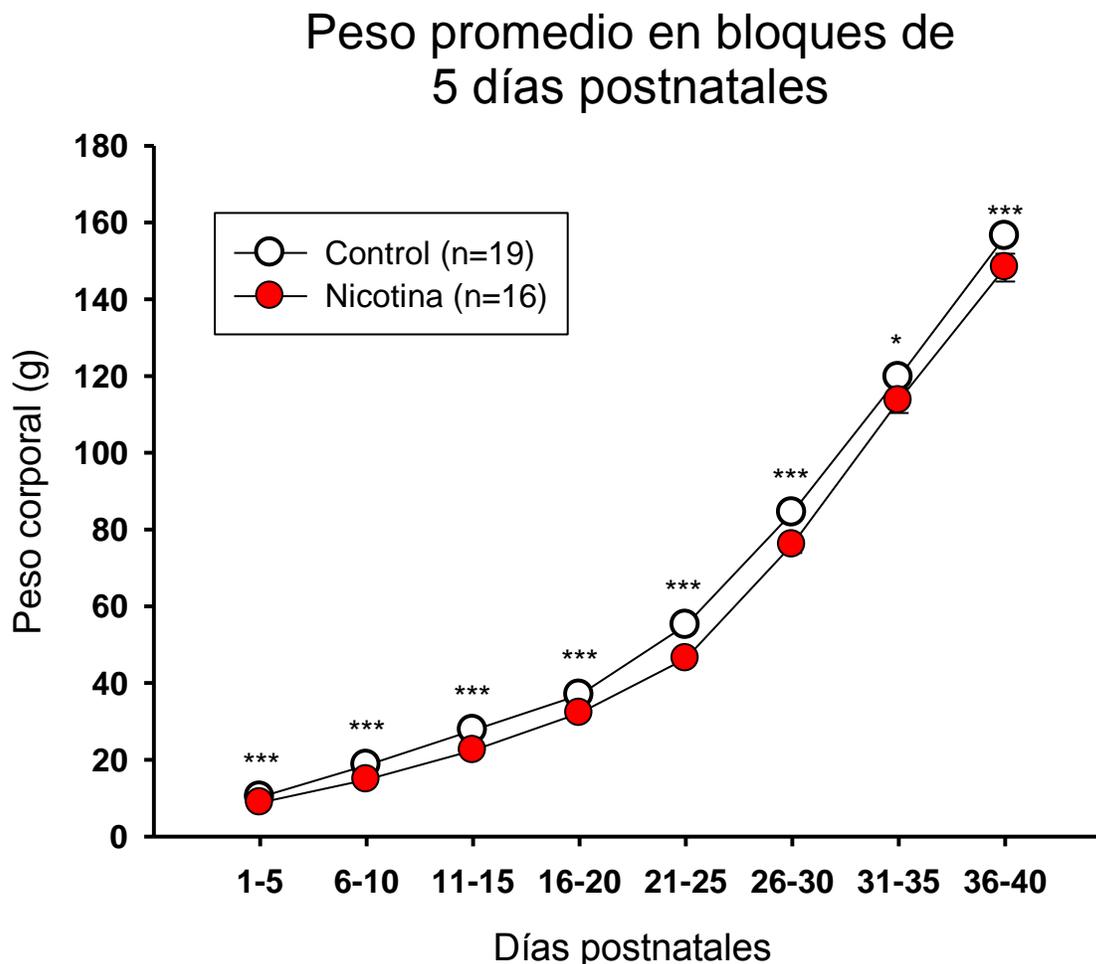
Gráfica 2. Medidas de desarrollo cráneo-facial durante PN0. A la izquierda la medida longitudinal y a la derecha la circunferencia del cráneo para ambos grupos. Media \pm EEM.



Gráfica 3. Medidas de desarrollo corporal durante PN0. A la izquierda el peso corporal de las crías macho para ambos grupos en gramos y a la derecha la talla corporal en centímetros. Media \pm EEM. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

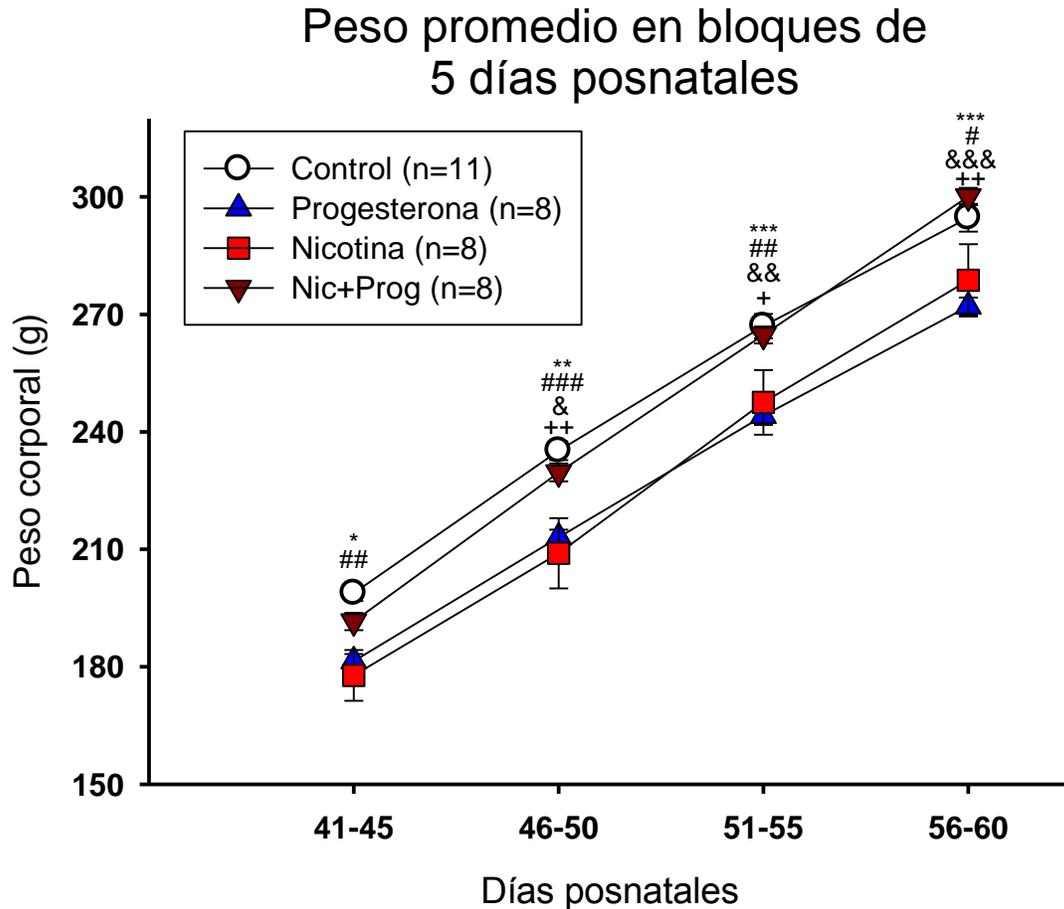
9.2.2. Crecimiento: Ganancia de peso

El peso corporal de los sujetos del grupo control y del grupo nicotina, incrementó diariamente. La gráfica 4, muestra el peso de los sujetos desde PN1 hasta PN40 en bloques de 5 días. Al comparar el peso corporal de los sujetos de cada grupo con un análisis de varianza de dos vías, considerando como primer factor el grupo y como segundo factor el día posnatal; se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($F_{(1)}=67.88$, $p<0.0001$) y entre los bloques de 5 días ($F_{(7)}=2496$, $p<0.0001$). El análisis *post-hoc* de Bonferroni, reveló diferencias significativas (ver gráfica 4) entre los grupos durante todo el periodo de registro ($p<0.001$, $p<0.01$ y $p<0.05$).



Gráfica 4. Peso corporal de las crías (únicamente machos) en bloques de 5 días desde PN1 hasta PN40. En las abscisas se muestran los bloques de 5 días posnatales y en las ordenadas el peso en gramos, los círculos blancos representan a los sujetos del grupo control y los círculos rojos representan a los sujetos del grupo con nicotina prenatal. Media \pm EEM. * $p<0.05$; *** $p<0.001$.

Posteriormente, se realizó el mismo análisis para los días PN41-PN60, entre los cuatro grupos, identificando diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($F_{(3)}=26.52$, $p<0.0001$) y entre los bloques de 5 días ($F_{(3)}=368.9$, $p<0.0001$), al realizar el análisis *post-hoc* de Bonferroni, revelando diferencias específicas entre los grupos (Gráfica 5).



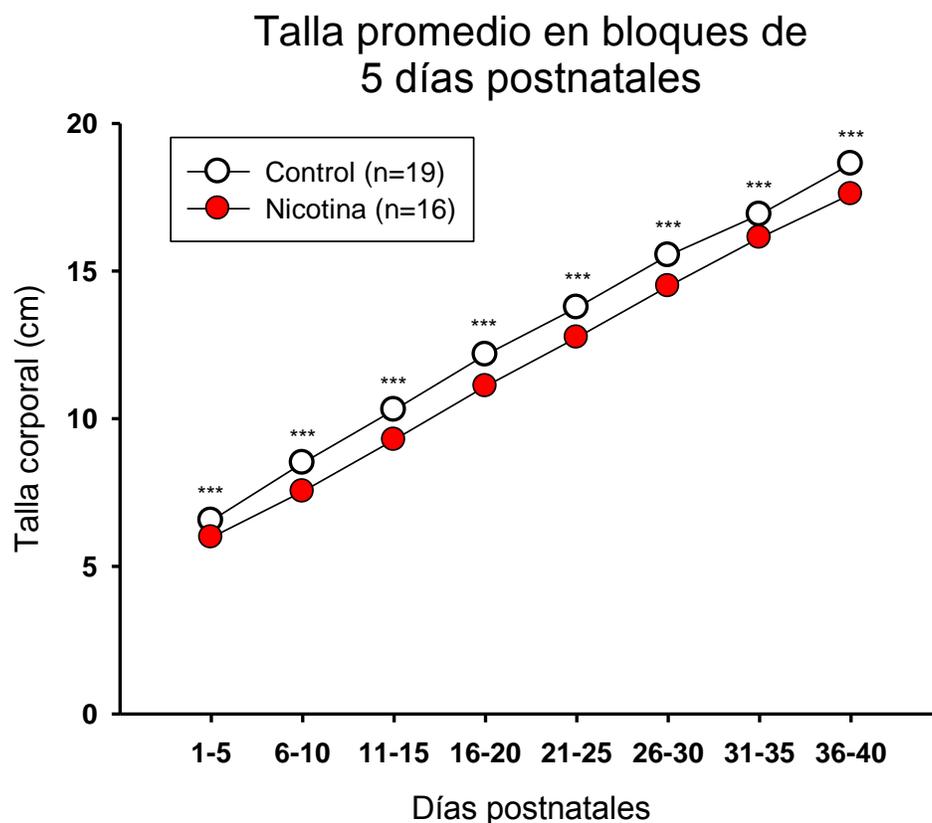
Gráfica 5. Peso corporal de los sujetos en bloques de 5 días desde PN41 hasta PN60. En las abscisas se muestran los bloques de 5 días posnatales (PN41-PN60) y en las ordenadas el peso corporal en gramos. Media \pm EEM. Los diferentes símbolos indican diferencias entre grupos observadas en el análisis de Bonferroni: Control vs Prog (*), Control vs Nicotina (#), Progesterona vs Nic+Prog (&) y Nicotina vs Nic+Prog (+). Los símbolos simples indican una $p<0.05$; los dobles una $p<0.01$ y los triples una $p<0.001$.

9.2.3. Crecimiento: Incremento de talla

Semejantemente a lo observado en el peso corporal de los sujetos, la talla incrementó diariamente durante los primeros 40 días posnatales (Gráfica 6); la gráfica 6, muestra la talla de los sujetos desde PN1 hasta PN40. Al comparar los

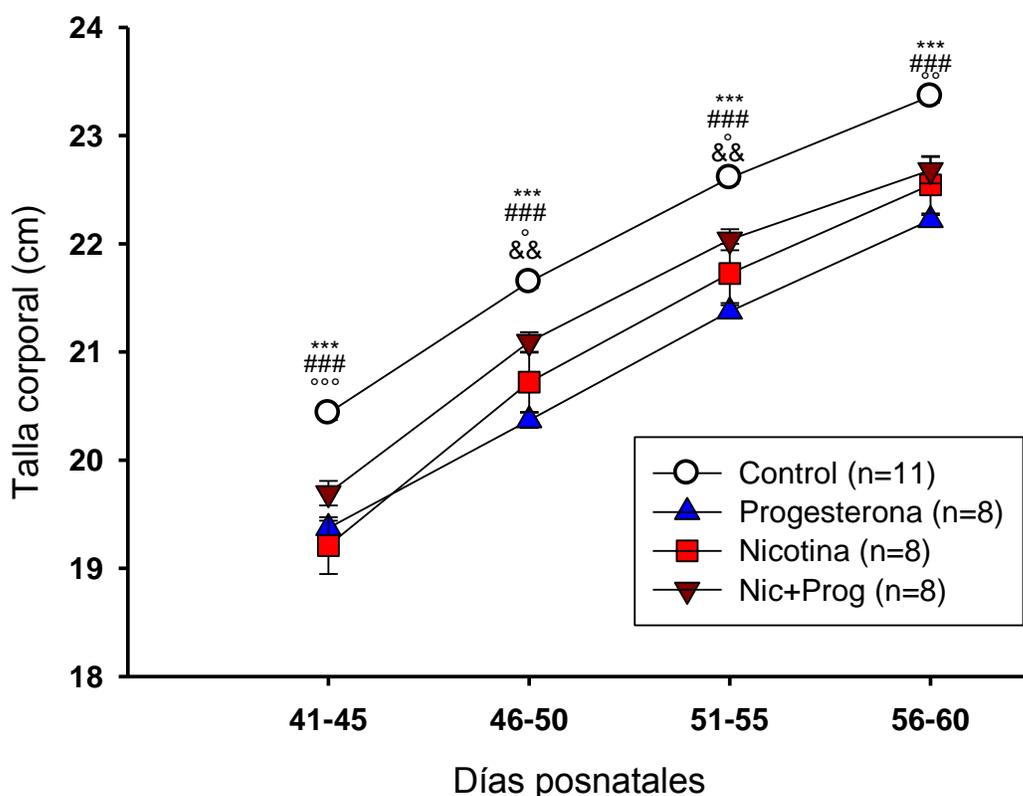
datos de los sujetos entre los grupos Control (n=19) y Nicotina (n=16) mediante un análisis de varianza de dos vías considerando como primer factor los grupos y como segundo factor el día posnatal, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($F_{(1)}=16.24$, $p<0.0001$ y $F_{(7)}=334.7$, $p<0.0001$), respectivamente, así mismo se encontró una interacción significativa entre los factores ($F_{(7)}=2.092$, $p<0.05$). Posteriormente, se realizó un análisis *post-hoc* de Bonferroni, mostrando diferencias entre los bloques de 5 días en los diferentes grupos.

Al realizar el mismo análisis estadístico para los datos de la talla corporal en bloques de 5 días durante PN41-PN60, entre los cuatro grupos, se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($F_{(3)}=52.70$, $p<0.0001$) y entre los bloques de 5 días ($F_{(3)}=342.0$, $p<0.0001$), al realizar el análisis de comparaciones múltiples de Bonferroni, se encontraron diferencias específicas entre los grupos (Gráfica 7).



Gráfica 6. Talla corporal de las crías en bloques de 5 días desde PN1 hasta PN40. En las abscisas se muestran los días posnatales (PN1-PN40) y en las ordenadas la talla en centímetros, los círculos abiertos representan a los sujetos del grupo Control y los círculos rojos representan a los sujetos del grupo Nicotina. Media \pm EEM. *** $p<0.001$.

Peso promedio en bloques de 5 días posnatales

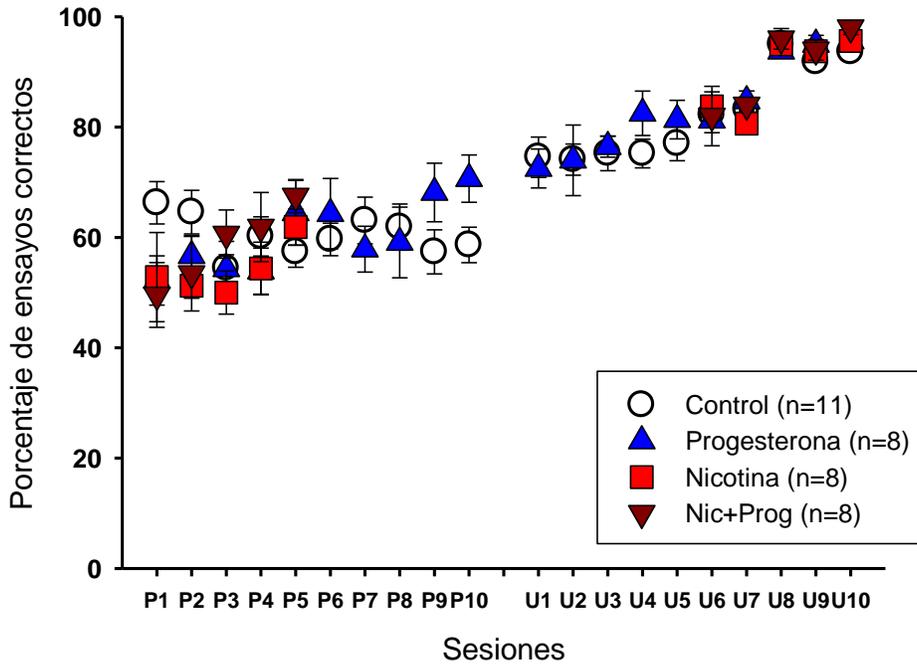


Gráfica 7. Talla corporal de los sujetos en bloques de 5 días desde PN41 hasta PN60. En las abscisas se muestran los bloques de 5 días posnatales (PN41-PN60) y en las ordenadas la talla corporal en centímetros. Media \pm EEM. Los diferentes símbolos indican diferencias entre grupos observadas en el análisis de Bonferroni: Control vs Progesterona (*), Control vs Nicotina (#), Control vs Nic+Prog (°) y Progesterona vs Nic+Prog (&). Los símbolos simples indican una $p < 0.05$; los dobles $p < 0.01$ y los triples $p < 0.001$.

9.3. Adquisición de la discriminación visual

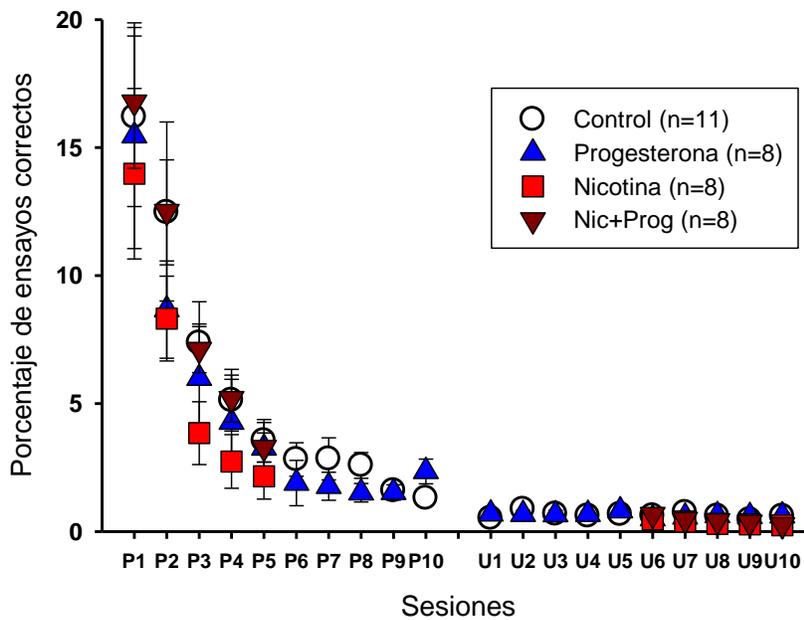
Durante las sesiones de entrenamiento se observó un incremento gradual en el porcentaje de ensayos correctos formando una curva de aprendizaje en todos los grupos. En la gráfica 8 se muestra el promedio del porcentaje de ensayos correctos de los sujetos de los 4 grupos durante la fase de entrenamiento. Por otra parte, la gráfica 9 presenta la latencia, definida como el tiempo que el sujeto tardaba en entrar a algún brazo meta, desde el momento en tener acceso al compartimento de elección; durante las sesiones de entrenamiento, se observa que en todos los grupos la latencia disminuyó conforme incrementa la experiencia en la tarea.

Adquisición de la discriminación visual Porcentaje de ensayos correctos



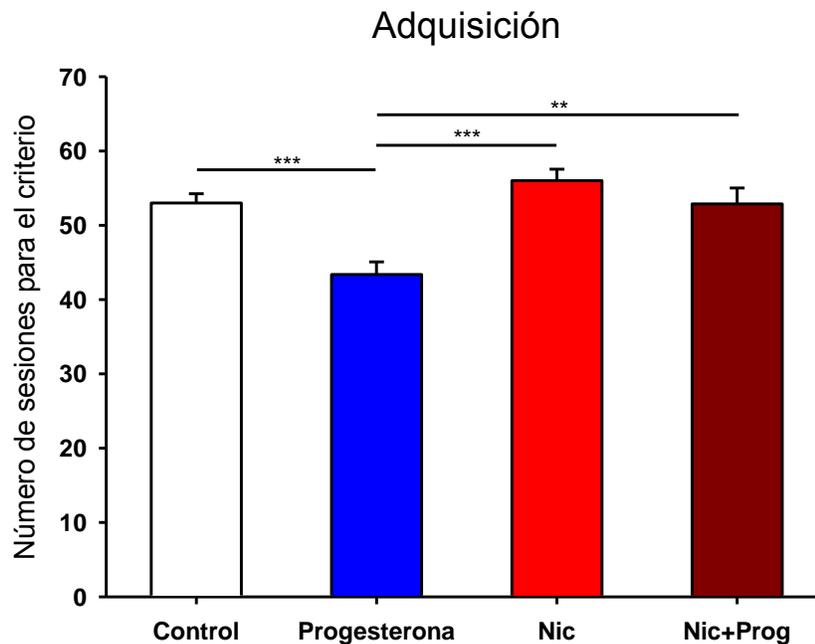
Gráfica 8. Adquisición de la discriminación visual. En las abscisas se muestran las primeras (P) y últimas (U) 10 sesiones de entrenamiento y en las ordenadas el porcentaje de ensayos correctos durante la sesión de 20 ensayos. Media \pm EEM.

Adquisición de la discriminación visual Latencia



Gráfica 9. Latencia en adquisición de la discriminación visual. En las abscisas se muestran las primeras (P) y últimas (U) 10 sesiones de entrenamiento y en las ordenadas se presenta la latencia en segundos. Media \pm EEM.

Así mismo, los sujetos del grupo Control requirieron entre 47 y 60 (53.0 ± 1.236) sesiones de entrenamiento para alcanzar el criterio de adquisición, a los sujetos del grupo con Progesterona postnatal les tomó entre 35 y 50 (43.38 ± 1.690) sesiones, mientras que los sujetos del grupo Nicotina, tardaron entre 50 y 63 (56.0 ± 1.535) sesiones y en el grupo Nic+Prog tardaron un rango de entre 44 y 61 (52.88 ± 2.133) sesiones. Estos datos se compararon mediante un ANOVA de una vía, encontrando diferencias estadísticamente significativas, con $F_{(3,31)}=10.55$, $p<0.0001$, posteriormente se realizó un análisis *post-hoc* de Tukey, revelando que la diferencia se encuentra entre el grupo Control y el de Progesterona, pero no con respecto a ninguno de los grupos con nicotina prenatal. El grupo Progesterona mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto a los sujetos expuestos prenatalmente a nicotina con y sin progesterona (Gráfica 10).

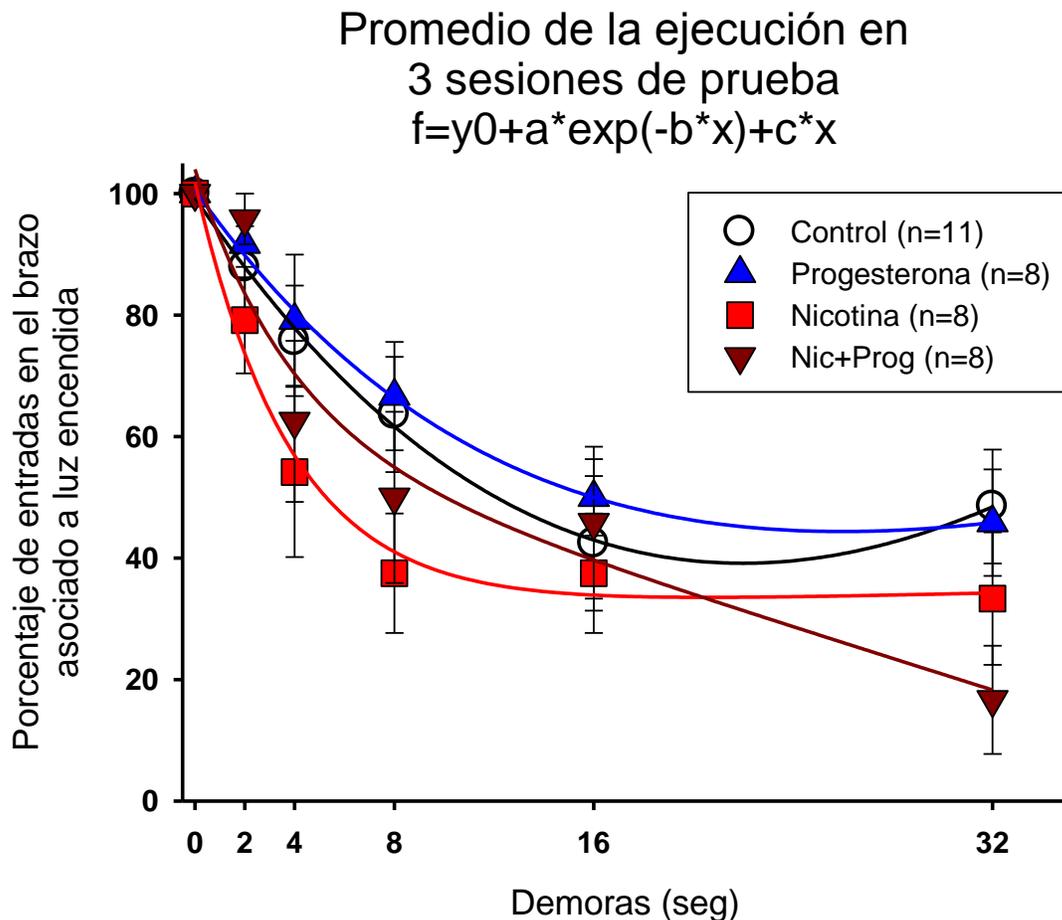


Gráfica 10. Presenta el número de sesiones necesarias para alcanzar el criterio en la fase de adquisición de la discriminación. Media \pm EEM. ** $p<0.01$; *** $p<0.001$.

9.4. Pruebas con demoras variables

Durante las pruebas con demoras se observa una típica curva de olvido con forme incrementa la duración de la demora, tanto en el grupo control como en el grupo con progesterona postnatal y los grupos con nicotina prenatal sin o con progesterona postnatal. La gráfica 11 presenta el promedio de tres sesiones de

prueba para todos los sujetos de los cuatro grupos. Se realizó una correlación de Pearson entre las demoras (0, 2, 4, 8, 16 y 32 s) y el porcentaje de ensayos correctos (entradas al brazo asociado a luz encendida), para todos los grupos se encontraron correlaciones negativas en todos los grupos, mismas que fueron significativas en el grupo Control ($r=-0.817$, $p<0.05$), Progesterona ($r=-0.890$, $p<0.05$) y Nic+Prog ($r=-0.901$, $p<0.05$); sin embargo, no fue significativa en el grupo Nicotina ($r=-0.729$, $p=0.0997$).



Gráfica 11. Porcentaje de ensayos correctos en ensayos con demora. En el eje de las abscisas se presentan las diferentes demoras en segundos y en el eje de las ordenadas el porcentaje de ensayos en los que el sujeto ingreso al brazo asociado a luz (foco encendido). Media \pm EEM.

Así mismo, se aplicó un ajuste de decaimiento exponencial combinado con un ajuste lineal, utilizando la ecuación $f=y_0+a*\exp(-b*x)+c*x$ (Gráfica 11) para la descripción de las curvas de olvido de cada grupo, a partir de éste se obtuvieron

los parámetros (Tabla 5) y a su vez se calculó el valor estimado del punto de indiferencia (Tabla 6).

Tabla 5. Parámetros de la curva.

Grupo	Parámetro			
	a	B	c	y0
Control	501.5103	0.027	7.4826	-402.1797
Progesterona	119.3009	0.0612	1.49	-18.6918
Nicotina	70.642	0.2573	0.0925	31.2736
Nic+Prog	44.3511	0.2573	-1.2929	59.6489

Parámetros obtenidos del ajuste de decaimiento exponencial combinado con un ajuste lineal ($f=y_0+a*\exp(-b*x)+c*x$).

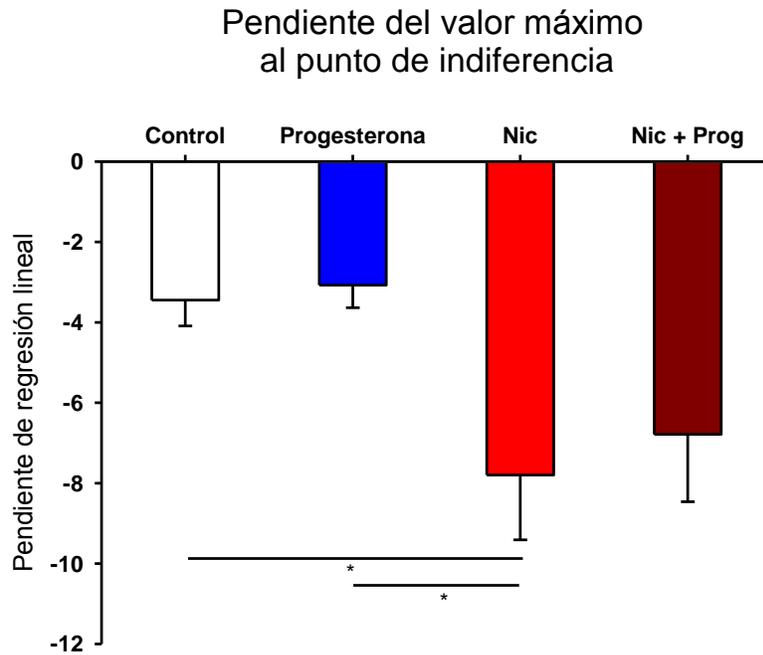
Tabla 6. Punto de indiferencia

Grupo	Punto de indiferencia estimado por ajuste	
	Combinado	Lineal
Control	12.11	12.93
Progesterona	15.9	14.93
Nicotina	5.25	5.76
Nic+Prog	10.03	7.48

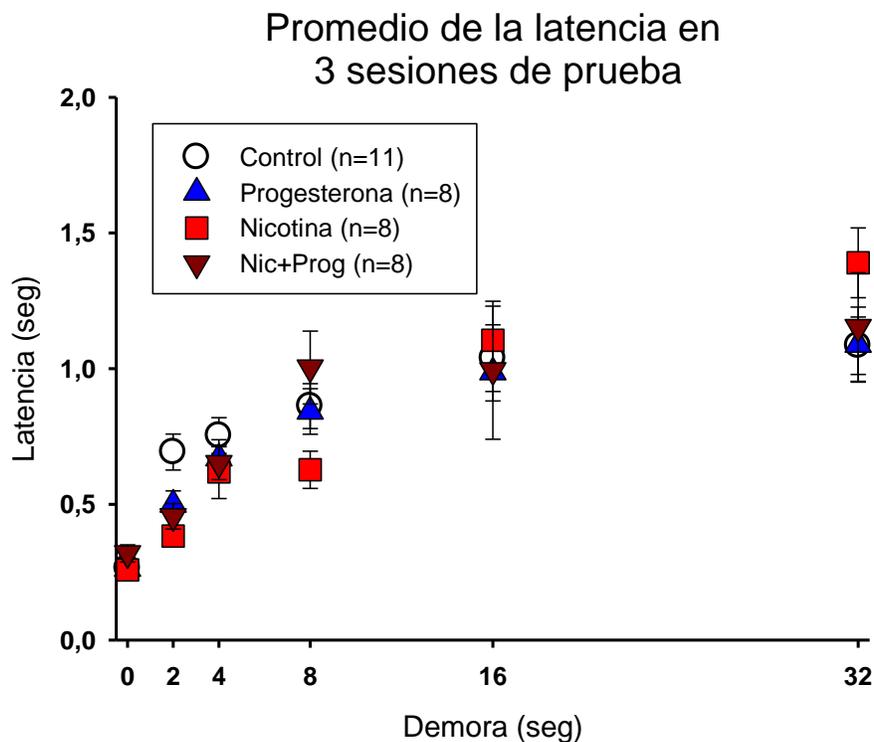
Valores calculados a partir del ajuste de decaimiento exponencial combinado con un ajuste lineal ($f=y_0+a*\exp(-b*x)+c*x$) y a partir del ajuste lineal ($f=y_0+a*x$).

Adicionalmente, se realizó una regresión lineal mediante la ecuación $f=y_0+a*x$, para las curvas de olvido de cada sujeto por grupo para obtener los parámetros de pendiente, valor máximo, mínimo de la curva y un segundo valor estimado del punto de indiferencia (Tabla 6). Estos parámetros se compararon con una ANOVA de una vía; la pendiente para el grupo Control fue de -3.447 ± 0.6416 , en el grupo Progesterona fue de -3.0729 ± 0.5634 , para el grupo Nicotina -77976 ± 1.6121 y para Nic+Prog -6.7857 ± 1.6774 ; se identificaron diferencias estadísticamente significativas en la pendiente ($F_{(3,31)}=4.060$, $p<0.05$), por lo que se realizó un análisis de comparación múltiple de Tukey, el cual reveló diferencias entre el grupo nicotina con respecto al grupo control y al grupo progesterona (Gráfica 12). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre grupos para el valor máximo ni mínimo ($F_{(3,31)}=1.518$, $p=0.2292$). Por otra parte, la gráfica 13 muestra el promedio de la latencia en tres sesiones con demora para los sujetos de los cuatro grupos. Se observa un incremento de la latencia en función del incremento de duración de la demora, lo que se confirmó al realizar una correlación de Pearson entre ambas

variables para los distintos grupos (Control; $r = 0.789$, $p=0.0617$; Progesterona: $r=0.861$, $p<0.05$; Nicotina: $r=0.962$, $p<0.01$ y Nic+Prog: $r=0.841$, $p<0.05$).



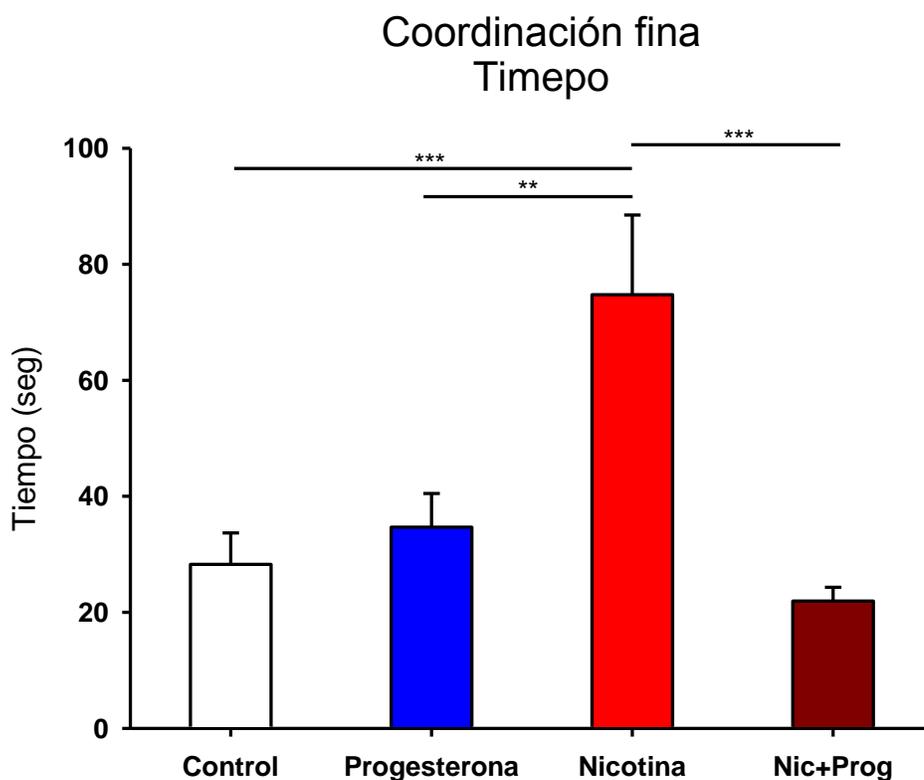
Gráfica 12. Pendiente desde el valor máximo al punto de indiferencia obtenido con el ajuste lineal ($f=y_0+a*x$). Media \pm EEM. * $p<0.05$.



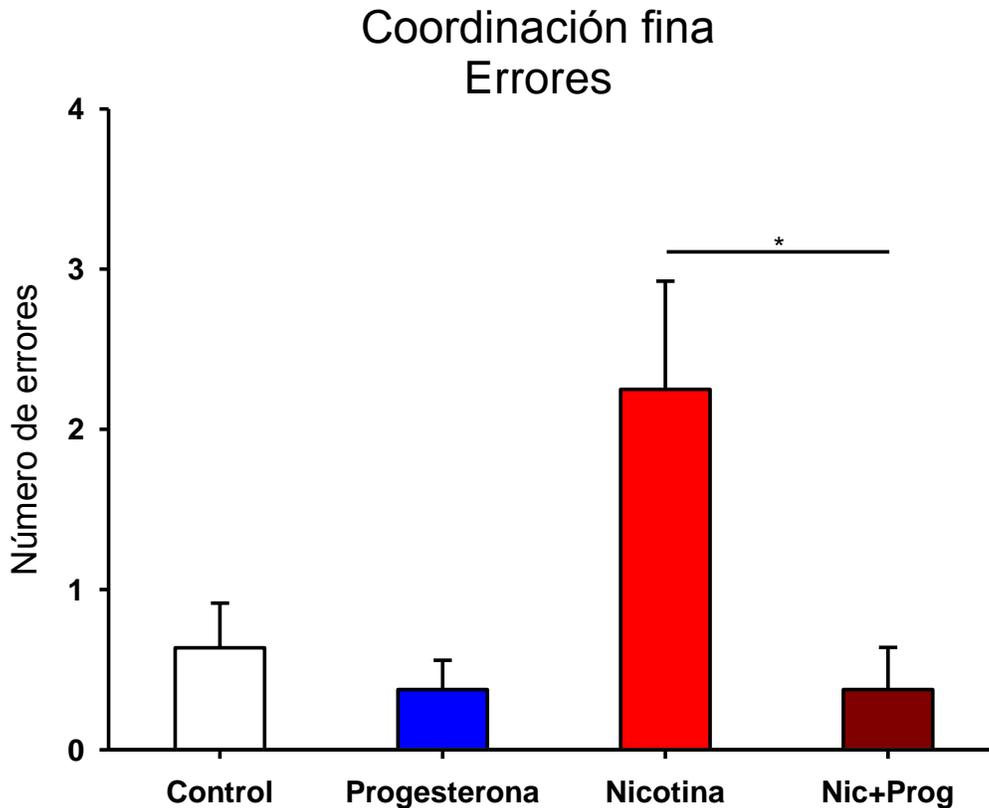
Gráfica 13. Latencia promedio de los ensayos con demora en tres sesiones de prueba. En el eje de las abscisas se presentan las demoras en segundos y en el eje de las ordenadas la latencia en segundos. Media \pm EEM.

9.5. Coordinación fina

Al analizar el tiempo que los sujetos tardaron en pelar la semilla de girasol con un ANOVA de una vía, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($F_{(3,31)}=9.012$, $p<0.001$), posteriormente se realizó un análisis *post-hoc* de Tukey, para identificar las diferencias específicas, las cuales fueron entre el grupo Nicotina y cada uno de los otros tres grupos (Control, Progesterona y Nic+Prog); los datos se muestran en la gráfica 14. La media para el grupo Control fue de 28.26 segundos con un error estándar de la media igual a 5.429 segundos mientras que para el grupo con Progesterona, Nicotina y Nic+Prog, fueron de 34.68 ± 5.820 , 74.76 ± 13.74 y 21.94 ± 2.368 s, respectivamente (Gráfica 14). Por otra parte, el número de errores, definidos como el número de veces que los sujetos dejaban caer la semilla fue comparado con un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($H_{(0.05,11,8,8,8)}=10.26$, $p<0.05$), posteriormente se realizó un análisis *post-hoc* de Dunn, encontrando diferencias entre los grupos Nicotina y Nic+Prog (Gráfica 15).



Gráfica 14. Tiempo para pelar la semilla de girasol. En las abscisas se muestran los grupos control (n=11), Progesterona (n=8), Nicotina (n=8) y Nicotina prenatal con progesterona posnatal(n=8). En las ordenadas se presenta el tiempo en segundos. Media \pm EEM. ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.



Gráfica 15. Número de errores al soltar la semilla de girasol. En las abscisas se muestran los grupos Control (n=11), Progesterona (n=8), Nicotina (n=8) y Nic+Prog (n=8). En las ordenadas se presenta el número de errores. Media ± EEM. * $p < 0.05$.

9.6. Características neuroanatómicas

El volumen del encéfalo fue medido en cm^3 por desplazamiento de líquido en una probeta de 20 ml, en el grupo Control se observó una media y error estándar de la media igual a $1.973 \pm 0.03835 \text{ cm}^3$, en el grupo Progesterona fue de $2.013 \pm 0.05154 \text{ cm}^3$, en el grupo Nicotina fue igual a $1.95 \pm 0.04629 \text{ cm}^3$ y en el grupo Nic+Prog $1.975 \pm 0.05261 \text{ cm}^3$. Al comparar los datos con un ANOVA de una vía para grupos independientes, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($F_{(3,31)}=0.2849$, $p=0.8359$).

El peso del encéfalo en el grupo Control fue de $2.175 \pm 0.03073 \text{ g}$, en el grupo Progesterona 2.228 ± 0.02455 , para Nicotina $2.176 \pm 0.0435 \text{ g}$ y para Nic+Prog $2.185 \pm 0.03454 \text{ g}$; el ANOVA no mostró diferencias significativas ($F_{(3,31)}=0.5089$, $p=0.6791$).

Adicionalmente, en la figura 10 se muestra la fotografía del cerebro de un sujeto representativo de cada grupo.

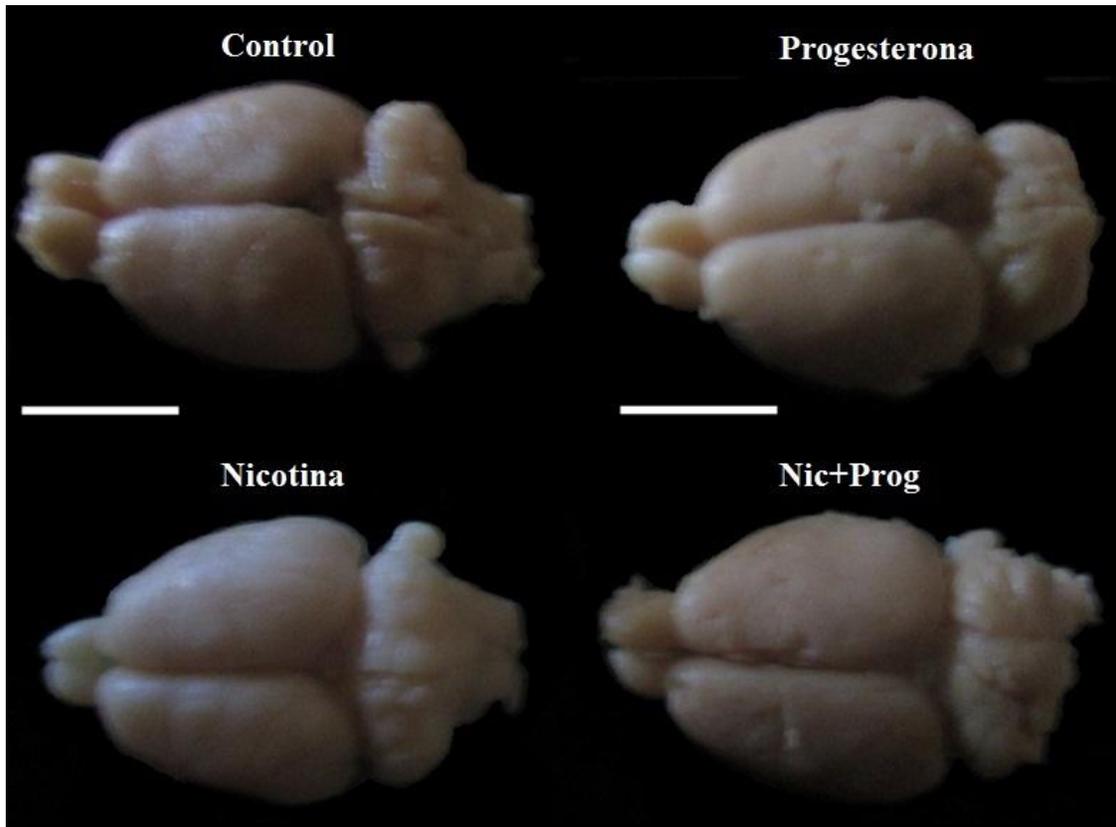


Fig.10. Encéfalos. Se presta la fotografía de un encéfalo representativo de cada grupo. La barra de escala representa 1 cm.

10. Discusión

Este estudio se realizó para analizar los efectos de la nicotina prenatal sobre el proceso de aprendizaje asociativo, memoria a corto plazo y macroestructuras neuroanatómicas, así como el efecto de una administración crónica de progesterona durante la adultez, sobre los efectos de la exposición prenatal a nicotina en ratas Wistar macho. Los resultados observados en este trabajo en relación con el desarrollo de los sujetos, es congruente con los datos reportados por otros autores como Mao y sus colaboradores en 2008; quienes estudiaron en ratas albinas el efecto de la administración de nicotina durante la gestación hasta el nacimiento (G21) de manera temprana, media y tardía (a partir de G3, G9 y G15, respectivamente). El periodo medio coincide con el usado en la presente investigación. Estos datos se suman a la abundante evidencia sobre el retraso del crecimiento pre y postnatal a consecuencia de la exposición prenatal a nicotina (Mao y cols., 2008), así como con los resultados del grupo de trabajo de Abreu-Villaça en 2004; quienes reportan datos similares. Adicionalmente, en 2010, Eppolito y sus colaboradores no encontraron diferencias entre el peso corporal de ratas Long-Evans preñadas, a las cuales se les implantaron minibombas osmóticas durante la gestación de sus crías, con nicotina en una dosis baja o alta de 0.96 y 2.0 mg/Kg al día, respectivamente (Eppolito y cols., 2010). La exposición a nicotina durante la lactancia no afecta el peso corporal de ratas Wistar madres, al menos durante los primeros 21 días de lactancia, aunque disminuye significativa y gradualmente la ingesta de alimento durante los últimos 3 días de lactancia. En el día 21 se disminuye aproximadamente 10 gramos; esto coincide con un pico de leptina en suero cercano a 2.5 ng/ml, mientras que en el grupo control se encontró un promedio cercano a 1.6 ng/ml (Oliveira y cols., 2010) ésta molécula se transfiere a la cría a través de la leche, lo cual, aunque puede estar relacionado con menor peso de las crías expuestas a nicotina durante PN21, no explica la talla y peso inferior al nacer. Lo que indica que el bajo peso de las crías expuestas prenatalmente a nicotina, no depende de desnutrición por parte de la madre, sino de las alteraciones producidas por la interacción entre la molécula y los procesos de desarrollo y maduración del sistema, no solo del encéfalo, sino de todo el

organismo; mismo que podría explicar los datos de la alta tasa de mortalidad en las crías expuestas a nicotina prenatalmente, observados en el presente estudio (Abreu-Villaça y cols., 2003, 2004; Biederman y cols., 2009; Blood-Siegfried y Rende, 2010; Nasrat y cols., 1986; Oliveira y cols., 2010; Phelan, 2014; Roy y cols., 2002; Slotkin, 2004). Interesantemente, no se encontraron diferencias en las medidas craneofaciales, esto no indica un apropiado desarrollo en esta área, sino un efecto negativo en la proporción del cuerpo con respecto a la cabeza, en los sujetos expuestos a una dosis de 2.0 mg/Kg/día de nicotina durante la gestación; estos resultados pueden deberse a la actividad de los receptores nicotínicos durante la formación del tubo neural (Roy y cols., 2002; Slotkin, 2004).

El daño celular, en la conectividad y funcionalidad del sistema colinérgico, especialmente en la corteza cerebral e hipocampo como resultado de la exposición prenatal a nicotina, persisten en etapas posteriores (Roy y cols., 2002; Slotkin, 2004) y puede afectar diferentes procesos, tales como el procesamiento sensorial, atención, aprendizaje y memoria (Abreu-Villaça y cols., 2011; Giocomo y Hasselmo, 2005; Hasselmo y McGaughy, 2004; Schneider y cols., 2011) y circuitos asociados a dicho sistema de neurotransmisión, por ejemplo el sistema emergente del complejo formado por la banda diagonal de Broca y el núcleo del *septum* medial que inervan al sistema límbico, principalmente a la formación hipocampal (Meeter y cols., 2004). De hecho, existe abundante evidencia respecto a los efectos de la exposición prenatal a nicotina sobre los procesos de aprendizaje y memoria (Albuquerque y cols., 2009; Genedani y cols., 1983; Johns y cols., 1982; Levin y cols., 1996; Martin y Becker, 1971; Sorenson y cols., 1991; Yanai y cols., 1992).

Cuando la nicotina interfiere en el proceso normal de desarrollo, altera la actividad de diferentes sistemas de neurotransmisión, incluyendo la acetilcolina, implicada en procesos de proliferación, maduración, diferenciación y sobrevivencia celular, así como otros neurotransmisores como glutamato, GABA y serotonina (Fabian-Fine y cols., 2001; Li y cols., 2002; Levin y cols., 2006; Marchi y cols., 2015; Sershen y cols., 1997; Vizi y cols., 1995), provocando disminución de ésta

amina en diferentes áreas del encéfalo, mismo que podría afectar el estado de ánimo de los sujetos, promoviendo conductas agresivas; por ejemplo el trabajo de Xu y sus colaboradores en 2001, quienes administraron nicotina (6 mg/Kg/día) durante la gestación (G4-21) de ratas y midieron su efecto sobre la unión de ^[3]Paroxetina con el transportador de serotonina, encontrando una disminución de ésta con respecto al grupo control; lo que indica una menor cantidad de terminales serotoninérgicas en corteza cerebral (Xu y cols., 2001); la disminución de serotonina en la corteza frontal está relacionada con agresividad (Rosell y Siever, 2015). En el presente trabajo se observó, pero no se midió mayor agresividad durante las mediciones diarias de peso y talla en las crías expuestas a nicotina, así como mayor reticencia a la habituación al contacto con el experimentador; en este sentido son pocos los estudios que miden dichas características conductuales, probablemente por limitaciones metodológicas, pero debería considerarse en las evaluaciones de este fenómeno.

Como se mencionó, los receptores nicotínicos se encuentran tanto en la membrana presináptica como postsináptica, así como en posiciones no activas para la comunicación celular directa (Fabian-Fine y cols., 2001; Frazier y cols., 1998); e interesantemente, en 1985 se reportó que la afinidad de la nicotina (^[3H]Nicotina) en el encéfalo fetal de ratas (G17 y G20) es similar a la observada en el tejido nervioso adulto, tanto en localización como en la concentración (Sugiyama y cols., 1985). Esto genera una amplia gama de interacciones biológicas que puede potenciar los efectos de la acetilcolina y por consiguiente de la nicotina en el tejido nervioso, no sólo sobre la modulación de otros sistemas de neurotransmisión, sino por los efectos sobre el neurodesarrollo que prevalecen hasta la adolescencia y adultez; en este sentido Slotkin y Seidler en 2015, reportaron que ratas hembra Sprague-Dawley expuestas prenatalmente a nicotina, presentaban un incremento significativo de receptores nicotínicos durante la adolescencia (PN30), especialmente, en la corteza frontal y parietal, en el hipocampo y en el estriado, pero disminuye drásticamente la densidad durante la adultez (PN150), particularmente en el hipocampo. Realizaron la misma evaluación en machos adultos (PN150), sin embargo no encontraron más que una

tendencia consistente a presentar menor densidad en dichas estructuras, excepto en el hipocampo, en donde se observó lo contrario, un incremento (no significativo) de receptores nicotínicos (Slotkin y Seidler, 2015). Estas diferencias en el patrón de expresión de receptores nicotínicos en función de la edad y dependiente del sexo, no son las únicas que se han reportado por ejemplo, los machos son consistentemente más sensibles a los efectos de la exposición prenatal a nicotina sobre la expresión del receptor $\alpha 7$ y deficiencias neuroconductuales derivados de dicho tratamiento (Slotkin y cols., 2004; Slotkin y Seidler, 2015), lo que deja ver el papel de otros factores que interactúan entre sí, generando los efectos postnatales de la exposición prenatal a nicotina, lo cual puede estar asociado a los efectos de hormonas esteroides como estrógeno y progesterona (Slotkin y Seidler, 2015).

Aunque la mayoría de los estudios sobre los efectos de la progesterona están enfocados a su papel como regulador de la conducta sexual y embarazo, se ha descrito que tiene efectos como neuroprotector ante daño celular generado por isquemia e interacción con agentes neurotóxicos (Brinton y cols., 2008; Germán-Castelán y cols., 2014; Mann y Babb, 2005; Robertson y Saraswati, 2014). Así mismo, puede interactuar con otros sistemas de neurotransmisión como GABA, potenciando la actividad del receptor $GABA_A$ (Baulieu y cols., 2001; Melcangi y cols., 1999; Mellon y Griffin, 2002; von Bohlen und Halbach y Dermietzel, 2006), mediante una de sus múltiples vías de acción, mismas que se sustentan en la diversidad de proteínas o receptores que presentan sensibilidad a la hormona, como el receptor intracelular o factor de transcripción activado por progesterona (RP) o componentes específicos en la membrana asociados a proteínas G (mPR, PGRMC1 y PGRMC2), afectando los niveles intracelulares de AMPc, la activación de CREB y la expresión génica o bien, mediando una rápida respuesta de Ca^{2+} productora de una cascada de señalización no genómica (Baulieu y cols., 2001; Brinton y cols., 2008; Guennoun y cols., 2015; Melcangi y cols., 1999; von Bohlen und Halbach y Dermietzel, 2006). Todo esto, repercute en múltiples funciones no reproductivas como la regulación cognoscitiva, emocional, procesos de neuroprotección, antiinflamatorios, antiapoptóticos, antioxidantes y

antiexcitotóxicos e incrementa la actividad mitocondrial, promoviendo la cadena respiratoria; así como neurogénesis, regeneración, mielinización en el sistema nervioso periférico y en la recuperación funcional tras una lesión cerebral traumática, así como estabilización de la barrera hematoencefálica y la reducción de edema cerebral (Baulieu y Schumacher, 2000; Brinton y cols., 2008; De Nicola y cols., 2009; Espinosa-García y cols., 2014; Irwin y cols., 2008; Johann y Beyer, 2013; Robertson y Saraswati, 2014; Roof y Hall, 2000).

Se ha observado que el sistema colinérgico interactúa con el sistema endocrino en mamíferos (Main y cols., 2010), no solo por compartir áreas de distribución para sus receptores, incluyendo la formación hipocampal, particularmente en el giro dentado, CA1 y CA3; la amígdala, el *septum*, área ventral tegmental y la corteza (Albuquerque y cols., 1995, 2009; Brinton y cols., 2008; Guennoun y cols., 2015; Guerra-Araiza y cols., 2002, 2003; Han y cols., 2000; Kato y cols., 1994; Krebs y cols., 2000; Levine y cols., 2001; Mann y Babb, 2005; Meffre y cols., 2013; Pang y cols., 2013; Seguéla y cols., 1993; Wang y cols., 1996; Zhu y cols., 2003); sino por los efectos de la administración prenatal de nicotina, misma que reduce los niveles de la aromatasa del citocromo P450 (P450arom) el paso enzimático en la biosíntesis del estradiol a partir de testosterona, en el encéfalo de ratas macho (Duffy y cols., 2010; von Ziegler y cols., 1991), dicha interacción se ha propuesto que afecta procesos cognoscitivos como el aprendizaje y la memoria (Flood y cols., 1992). La administración conjunta de estradiol y progesterona, dos hormonas esteroideas neuroactivas, revierten los efectos amnésicos de antagonistas colinérgicos en un laberinto radial (Tanabe y cols., 2004). La infusión de progesterona en el hipocampo dorsal de ratón, mejora la ejecución en una tarea de reconocimiento de objetos (Orr y cols., 2009). Adicionalmente, se ha reportado que el tratamiento hormonal (estrógenos y progesterona) en mujeres posmenopáusicas, mejora la memoria de trabajo, memoria verbal y episódica (Grigorova y Sherwin, 2006; Yonker y cols., 2006).

Las diferencias encontradas entre el número de sesiones que requirió el grupo de progesterona con respecto a los otros tres grupos, apoya la evidencia encontrada

por otros autores respecto a la mejora cognitiva que genera la progesterona en sujetos sanos. Por otro parte, el hecho de no encontrar diferencias entre los grupos con nicotina prenatal con o sin progesterona postnatal con respecto al grupo control, sugiere la participación de distintas variables no consideradas. A pesar de que se han reportado deficiencias en la discriminación visual de roedores expuestos a nicotina durante la gestación, los estímulos usados en dichos estudios, suelen ser patrones visuales o el color de las paredes en los compartimentos meta, sin embargo al utilizar una luz relativamente intensa, los sujetos si son capaces de discriminar el estímulo, indicando que la alteración bien podría generarse en el sistema sensorial, más que en el proceso de aprendizaje asociativo. Aunado a esto, al identificar el mismo patrón en las curvas de aprendizaje, se puede interpretar que los sujetos aprenden de la misma manera, pero a ritmos distintos. Esto también se observa en la latencia para la respuesta durante el entrenamiento en la tarea, al respecto es interesante la tendencia del grupo Nicotina para presentar una menor latencia, sin embargo ésta no fue estadísticamente significativa, es probable que esto se deba a la variabilidad de los sujetos que consistentemente fue mayor que en los otros tres grupos. Según esta perspectiva, se podría encontrar una diferencia sobre el aprendizaje de la tarea al realizar la misma evaluación en ratas hembra.

Es importante considerar que puede disminuir el número de receptores en general, pero mantenerse la población de algún subtipo específico relacionado con el aprendizaje como el $\alpha 7$ (Young y cols., 2004), $\alpha 4\beta 2$ (Lipiello y cols., 1996) o $\alpha 2\beta 4$ (Buccafusco, 2004) o bien, la interacción con otros sistemas de señalización (Albuquerque y cols., 2009; Frazier y cols., 1998; McQuiston y Madison, 1999) que le permitan al organismo aprender la tarea de discriminación visual. Quizás el efecto como neuroprotector del receptor $\alpha 7$ o la mayor sensibilidad a la regulación a la alta (medida en conductancia y desensibilización) del receptor $\alpha 2\beta 4$ al interactuar con la nicotina (Albuquerque y cols., 2009).

En cuanto a los resultados de la fase con demoras, al no observar una correlación significativa, entre el porcentaje de respuestas correctas y las demoras en el grupo

Nic, se presume un deterioro en la memoria a corto plazo en los sujetos de este grupo. Efecto que no se observó en el grupo Nic+Prog, en donde además de ser significativa, fue mayor que en el grupo control y el grupo sólo con progesterona, este dato no indica que los sujetos del grupo Nic+Prog recuerden más tiempo la información, sino que la pérdida de la información mantiene una relación con el intervalo transcurrido entre la presentación del estímulo y el momento para emitir la respuesta y que dicha relación es mayor que en los grupos Control y Progesterona. De hecho, la respuesta del grupo Nic+Prog, disminuye por debajo del nivel de azar, lo que indica que cuando la demora es larga (ej. 32 s), los sujetos responden en el brazo asociado a luz apagada. Esto podría explicarse por una sensibilidad diferencial entre los grupos ante distractores, por lo que resulta fundamental evaluar la conducta de ratas según este diseño, pero en tareas que evalúen el proceso de atención. En especial, al considerar las alteraciones funcionales, generadas en el sistema noradrenérgico por la exposición prenatal a nicotina (Levin y cols., 1996).

En el presente estudio no se realizó una evaluación molecular ni celular, sobre los receptores, pero al observar el patrón de densidad descrito por Slotkin y Seidler (2015) con una baja densidad en la corteza frontal y el hipocampo de ratas macho adultas (PN60) y tomando en cuenta los resultados en la fase con demoras, mostrados por el grupo Nic, podemos inferir un deterioro en los sistemas neurobiológicos que sustentan la memoria a corto plazo o de trabajo.

Considerando que en el presente trabajo los sujetos expuestos a nicotina prenatalmente no presentaron diferencias estadísticamente significativas en la adquisición de la tarea, pero si presentaron alteraciones en el patrón de respuesta durante la evaluación con demoras, podemos especular sobre estrategias alternativas usadas por los sujetos para el aprendizaje, pero cuya aplicación al evocar la información no es suficientemente eficiente.

Los resultados encontrados por Shoab y sus colaboradores en 2002, acerca de la incapacidad de ratones *knockout* para la subunidad $\beta 2$, para discriminar dosis bajas de nicotina, pero que al administrar dosis altas no presentaban diferencias

con respecto al grupo control (Shoaib y cols., 2002); aunada a la evidencia presentada por diversos autores en cuanto a la afinidad de la nicotina por los diferentes subtipos de receptores nicotínicos (Tabla 2) (Cohen y cols., 2003; Decker y cols., 1995; Hauser y cols., 2009; Lendvai y cols., 2013; Stauderman y cols., 1998; Wang y cols., 1996), la distribución diferencial de las distintas subunidades (Albuquerque y cols., 1995, 2009; Brown y cols., 2007; Chen y Patrick, 1997; Dani y De Biasi, 2001; Flora y cols., 2000; Han y cols., 2000; Seguéla y cols., 1993; Sinkus y cols., 2015; Toyohara y Hashimoto, 2010); así como el papel particular de cada una, sobre los procesos de aprendizaje y memoria (Buccafusco, 2004; Levin y cols., 1999; Lipiello y cols., 1996; Young y cols., 2004), la distribución diferenciada temporal y espacialmente de las mismas (Shacka y Robinson, 1998; Zoli y cols., 1995) y la identificación temprana en el desarrollo de receptores nicotínicos funcionales (Falk y cols., 2002; Gotti y cols., 1997; Hellström-Lindahl y cols., 1998), nos repiten a la necesidad de realizar estudios que abarquen los diferentes niveles de alteraciones generadas por la nicotina durante el desarrollo y maduración, no solo enfocándose en un nivel molecular, histológico u organizacional, sino incluyendo evaluaciones conductuales, motoras, sensoriales y cognoscitivas más sistemáticas para comprender los efectos a corto y largo plazo de la acción nicotínica sobre el neurodesarrollo.

Por otra parte, la nicotina no sólo altera el sistema colinérgico o un grupo determinado de proteínas, sino que afecta otros sistemas de señalización y ésta afectación puede ser bidireccional, por ejemplo en humanos, las hormonas esteroides modifican la actividad de la enzima CYP2A6 (Higashi y cols., 2007), lo que modifica el metabolismo de la nicotina, especialmente durante el embarazo y por lo tanto sus efectos sobre el sistema en desarrollo (Albuquerque y cols., 2009; Benowitz, 1990; Benowitz y cols., 2009; Blood-Siegfried y Rende, 2010; Dahlström y cols., 1990; Feldman y cols., 1997; Yildiz, 2004) entre muchos otros efectos. En este sentido los resultados del presente trabajo pueden estar relacionados con la interacción de la nicotina con el receptor $\alpha 7$ durante la gestación, así como la subsecuente desregulación sobre las concentraciones de Ca^{2+} intracelular y sobre

las cascadas de señalización mediadas por Ca^{2+} (Albuquerque y cols., 2009; Rowell y Duggan, 1998).

El efecto de la progesterona para contrarrestar las alteraciones producidas por la nicotina (administrada de manera prenatal), se observan en la evaluación de coordinación fina, en donde llama la atención que el incremento en la locomoción de las ratas prenatalmente expuestas a nicotina, reportada por diversos autores, no está regulada o enfocada a metas específicas, al menos no lo necesario para realizar esta tarea, según lo sugiere el tiempo y el número de errores para pelar la semilla de girasol que presentaron los sujetos del grupo Nicotina.

A pesar de que diversos autores reportan cambios estructurales en la neuroanatomía de sujetos expuestos a nicotina durante el desarrollo prenatal y en etapas tempranas postnatales, interesantemente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las mediciones encefálicas de peso y volumen, lo que puede deberse a que esta medición resulta poco sensible a las alteraciones encefálicas generadas por la administración prenatal de nicotina y/o postnatal de progesterona, esto es claro al revisar los trabajos de otros autores quienes señalan que estas alteraciones se encuentran a nivel molecular, neuroquímico y microestructural (Abreu-Villaça y cols., 2004; Blood-Siegfried y Rende, 2010; Falk y cols., 2005; Mao y cols., 2008; Roy y cols., 2002; Slotkin, 2004; Slotkin y cols., 2004; Slotkin y Seidler, 2015; Yanai y cols., 1992).

Adicionalmente, en 1998, Zarrindast y sus colaboradores reportaron que la administración postnatal de nicotina genera niveles bajos de catalepsia y las dosis de 0.5 mg/Kg o superiores, potencian la catalepsia inducida por Sulpirida en ratones (Zarrindast y cols., 1998). En cinco de los sujetos expuestos prenatalmente a nicotina (tres del grupo sólo con nicotina y dos del grupo con nicotina prenatal más progesterona postnatal), se observó conducta tipo cataléptica (rigidez muscular, ausencia de respuesta a estímulos, disminución de temperatura corporal, seguidas por agresividad e hiperactividad), los sujetos del grupo Nic, presentaron esta conducta a la edad de tres meses (PN85, PN92 y PN97, respectivamente) y los dos sujetos del grupo Nic+Prog entre seis y siete

meses de edad (PN100 y PN103, respectivamente) en estos sujetos la conducta tipo cataléptica se presentó con menor intensidad y duración que en los sujetos del grupo Nic. No se realizaron mediciones precisas ni análisis estadísticos, no obstante resulta interesante este efecto en algunos sujetos de ambos grupos, lo cual podría ser objeto de estudio para futuras investigaciones.

Considerando la alta tasa de mortalidad a causa del tabaco, por ejemplo en 2004 el 12 % de las defunciones en adultos mayores de 30 años estuvieron directamente relacionadas con el consumo de tabaco, mientras que el 7 % con la comorbilidad asociada como tuberculosis, 12 % por otras infecciones respiratorias, por alteraciones cardiovasculares (10 %), así como el 22 % de todas las muertes por cáncer y 36 % de las defunciones por problemas del sistema respiratorio (Gowing y cols., 2015) y especialmente, la tasa de mortalidad y morbilidad en infantes (Abreu-Villaça y cols., 2003, 2004; Biederman y cols., 2009; Blood-Siegfried y Rende, 2010; Boychuk y Hayward, 2011; Cornelius y Day, 2009; Dwyer y cols., 2008, 2009; Ernst y cols., 2001; Horst y cols., 2012; Key y cols., 2007; Levin y cols., 1996; Phelan, 2014; Roy y cols., 2002; Slotkin, 2004; Stephan-Blanchard y cols., 2008); es indispensable generar estrategias para disminuir el consumo de esta sustancia en la población en general y puntualmente, en las madres gestantes; así como ahondar en los efectos de la exposición prenatal a nicotina mediante la investigación con modelos animales que permita la manipulación de diferentes concentraciones de los componentes del tabaco, particularmente de nicotina; la interacción de esta condición con la administración de otras moléculas, como hormonas esteroideas y no esteroideas, aunado a la evaluación de los efectos a corto, mediano y largo plazo, no sólo en enfermedades sistémicas, sino en los procesos cognoscitivos, desde la discriminación de estímulos hasta el aprendizaje y los diferentes tipos de memoria.

11. Conclusiones

1.- La exposición prenatal a nicotina afecta el desarrollo intrauterino de las crías, generando bajo peso y menor talla al nacer.

2.- La exposición prenatal a nicotina afecta negativamente el aprendizaje asociativo y la memoria a corto plazo.

3.- La progesterona administrada durante la adultez, mejora el aprendizaje asociativo en ratas.

4.- La progesterona revierte los efectos negativos producidos por la administración prenatal de nicotina sobre la memoria a corto plazo y la coordinación fina.

5.- La nicotina administrada de manera prenatal no altera significativamente el peso y volumen del encéfalo.

12. Referencias

- Abreu-Villaça Y, Filgueiras CC, Manhaes AC. (2011) Developmental aspects of the cholinergic system. *Behav Brain Res.* 221(2): 367-378.
- Abreu-Villaça Y, Seidler FJ, Slotkin TA. (2004) Does prenatal nicotine exposure sensitize the brain to nicotine-induced neurotoxicity in adolescence? *Neuropsychopharmacology.* 29(8): 1440-1450.
- Abreu-Villaça Y, Seidler FJ, Tate C, Slotkin TA. (2003) Nicotine is a neurotoxin in the adolescent brain: critical periods, patterns of exposure, regional selectivity, and dose thresholds for macromolecular alterations. *Brain Research.* 979: 114-128.
- Albuquerque EX, Pereira EF, Alkondon M, Rogers SW. (2009) Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 89(1): 73-120.
- Albuquerque EX, Pereira EF, Castro NG, Alkondon M, Reinhardt S, Schröder H, Maelicke A. (1995) Nicotinic receptor function in the mammalian central nervous system. *Ann N Y Acad Sci.* 757: 48-72.
- Alsharari SD, Siu EC, Tyndale RF, Damaj MI. (2014) Pharmacokinetic and pharmacodynamics studies of nicotine after oral administration in mice: effects of methoxsalen, a CYP2A5/6 inhibitor. *Nicotine Tob Res.* 16(1): 18-25.
- Anand R, Lindstrom J. (1990) Nucleotide sequence of the human nicotinic acetylcholine receptor beta 2 subunit gene. *Nucleic Acids Res.* 18(14): 4272.
- Atluri P, Fleck MW, Shen Q, Mah SJ, Stadfelt D, Barnes W, Goderie SK, Temple S, Schneider AS. (2001) Functional nicotinic acetylcholine receptor expression in stem and progenitor cells of the early embryonic mouse cerebral cortex. *Dev Biol.* 240(1): 143-156.
- Attaway CM, Compton DM, Turner MD. (1999) The effects of nicotine on learning and memory: a neuropsychological assessment in young and senescent Fischer 344 rats. *Physiol Behav.* 67(3): 421-341.
- Azam L, Chen Y, Leslie FM. (2007) Developmental regulation of nicotinic acetylcholine receptors within midbrain dopamine neurons. *Neurosci.* 144(4): 1347-1360.
- Baulieu E, Schumacher M. (2000) Progesterone as a neuroactive neurosteroid, with special reference to the effect of progesterone on myelination. *Steroids.* 65(10-11): 605-612.
- Baulieu EE, Robel P, Schumacher M. (2001) Neurosteroids: beginning of the story. *Int Rev Neurobiol.* 46: 1-32.

- Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P. (2009) Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. 3rd. *Handb Exp Pharmacol.* (192).
- Benowitz NL. (1990) Pharmacokinetic considerations in understanding nicotine dependence. *Ciba Found Symp.* 152: 186-209.
- Berger DF, Lombardo JP, Peck JA, Faraone SV, Middleton FA, Youngetob SL. (2010) The effects of strain and prenatal nicotine exposure on ethanol consumption by adolescent male and female rats. *Behavioural Brain Research.* 210: 147-154.
- Biederman J, Monuteaux MC, Faraone SV, Mick E. (2009) Parsing the associations between prenatal exposure to nicotine and offspring psychopathology in a nonreferred sample. *J Adolesc Health.* 45(2): 142-148.
- Blood-Siegfried J, Rende EK. (2010) The long-term effects of prenatal nicotine exposure on neurologic development. *J Midwifery Womens Health.* 55(2): 143-152.
- Boonyaratanakornkit V, Edwards DP. (2004) Receptor mechanisms of rapid extranuclear signalling initiated by steroid hormones. *Essays Biochem.* 40: 105-120.
- Boychuk CR, Hayward LF. (2011) Prenatal nicotine exposure alters postnatal cardiorespiratory integration in Young male but not female rats. *Experimental Neurology.* 232: 212-221.
- Brinton RD, Thompson RF, Foy MR, Baudry M, Wang J, Finch CE, Morgan TE, Pike CJ, Mack WJ, Stanczyk FZ, Nilsen J. (2008) Progesterone receptors: form and function in brain. *Front Neuroendocrinol.* 29(2): 313-339.
- Brown RW, Collins AC, Lindstrom JM, Whiteaker P. (2007) Nicotinic alpha5 subunit deletion locally reduces high-affinity agonist activation without altering nicotinic receptor numbers. *J Neurochem.* 103(1): 204-215.
- Buccafusco JJ. (2004) Neuronal nicotinic receptor subtypes: defining therapeutic targets. *Mol Interv.* 4(5): 285-295.
- Canal-Castro C, Pagnussat AS, Orlandi L, Worm P, Moura N, Etgen AM, Alexandre Netto C. (2012) Coumestrol has neuroprotective effects before and after global cerebral ischemia in female rats. *Brain Res.* 1479: 82-90.
- Chen D, Patrick JW. (1997) The alpha-bungarotoxin-binding nicotinic acetylcholine receptor from rat brain contains only the alpha7 subunit. *J Biol Chem.* 272(38): 24024-24029.
- Ciamei A, Aversano M, Cestari V, Castellano C. (2001) Effects of MK-801 and nicotine combinations on memory consolidation in CD1 mice. *Psychopharmacology (Berl).* 154(2): 126-130.

- Cohen C, Bergis OE, Galli F, Lothead AW, Jegham S, Biton B, Leonardon J, Avenet P, Sgard F, Besnard F, Graham D, Coste A, Oblin A, Curet O, Voltz C, Gardes A, Caille D, Perrault G, George P, Soubrie P, Scatton B. (2003) SSR591813, a novel selective and partial alpha4beta2 nicotinic receptor agonist with potential as an aid to smoking cessation. *J Pharmacol Exp Ther.* 306(1): 407-420.
- Colombo SF, Mazzo F, Pistillo F, Gotti C. (2013). Biogenesis, trafficking and up-regulation of nicotinic ACh receptors. *Biochemical Pharmacology.* 86(8): 1063-1073.
- Cornelius MD, Day NL. (2009) Developmental consequences of prenatal tobacco exposure. *Curr Opin Neurol.* 22: 121-125.
- Dahlström A, Lundell B, Curvall M, Thapper L. (1990) Nicotine and cotinine concentrations in the nursing mother and her infant. *Acta Paediatr Scand.* 79(2): 142-147.
- Dani JA, De Biasi M. (2001) Cellular mechanisms of nicotine addiction. *Pharmacology Biochemistry and Behavior,* 70(4): 439-446.
- De Nicola AF, Labombarda F, Gonzalez Deniselle MC, Gonzalez SL, Garay L, Meyer M, Gargiulo G, Guennoun R, Schumacher M. (2009) Progesterone neuroprotection in traumatic CNS injury and motoneuron degeneration. *Front Neuroendocrinol.* 30(2): 173-187.
- Decker MW, Brioni JD, Bannon AW, Arneric SP. (1995) Diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: lessons from behavior and implications for CNS therapeutics. *Life Sci.* 56(8): 545-570.
- Decker MW, Majchrzak MJ, Anderson DJ. (1992) Effects of nicotine on spatial memory deficits in rats with septal lesions. *Brain Res.* 572(1-2): 281-285.
- Didier M, Berman SA, Lindstrom J, Bursztajn S. (1995) Characterization of nicotinic acetylcholine receptors expressed in primary cultures of cerebellar granule cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 30(1): 17-28.
- Dougherty KD, Turchin PI, Walsh TJ. (1998) Septocingulate and septohippocampal cholinergic pathways: involvement in working/episodic memory. *Brain Res.* 810(1-2): 59-71.
- Doura MB, Gold AB, Keller AB, Perry DC. (2008) Adult and periadolescent rats differ in expression of nicotinic cholinergic receptor subtypes and in the response of these subtypes to chronic nicotine exposure. *Brain Res.* 1215: 40-52.
- Duffy TA, Picha ME, Won ET, Borski RJ, McElroy AE, Conover DO. (2010) Ontogenesis of gonadal aromatase gene expression in atlantic silverside (*Menidia menidia*) populations with genetic and temperature-dependent sex determination. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol.* 313(7): 421-431.

- Dwyer JB, Broide RS, Leslie FM. (2008) Nicotine and brain development. *Birth Defects Res C Embryo.* 84: 30-44.
- Dwyer JB, McQuown SC, Leslie FM. (2009) The dynamic effects of nicotine on the developing brain. *Pharmacol Ther.* 122(2): 125-139.
- Eppolito AK, Bachus SE, McDonald CG, Meador-Woodruff JH, Smith RF. (2010) Late emerging effects of prenatal and early postnatal nicotine exposure on the cholinergic system and anxiety-like behavior. *Neurotoxicol Teratol.* 32(3): 336-345.
- Ernst M, Moolchan ET, Robinson ML. (2001) Behavioral and neural consequences of prenatal exposure to nicotine. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 40: 630-641.
- Espinosa-García C, Aguilar-Hernández A, Cervantes M, Morali G. (2014) Effects of progesterone on neurite growth inhibitors in the hippocampus following global cerebral ischemia. *Brain Res.* 1545: 23-34.
- Evans DE, Drobos DJ. (2009) Nicotine self-medication of cognitive-attentional processing. *Addict Biol.* 14(1): 32-42.
- Fabian-Fine R, Skehel P, Errington ML, Davies HA, Sher E, Stewart MG, Fine A. (2001) Ultrastructural distribution of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunit in rat hippocampus. *J Neurosci.* 21(20): 7993-8003.
- Falk L, Nordberg A, Seiger A, Kjaeldgaard A, Hellström-Lindahl E. (2002) The alpha7 nicotinic receptors in human fetal brain and spinal cord. *J Neurochem.* 80(3): 457-465.
- Falk L, Nordberg A, Seiger A, Kjaeldgaard A, Hellström-Lindahl E. (2005) Smoking during early pregnancy affects the expression pattern of both nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors in human first trimester brainstem and cerebellum. *Neuroscience.* 132(2): 389-397.
- Feldman RS, Meyer JS, Quenzer LF. (1997) *Principles of Neuropsychopharmacology.* Sinauer Associates, Inc: USA.
- Flood JF, Morley JE, Roberts E. (1992) Memory-enhancing effects in male mice of pregnenolone and steroids metabolically derived from it. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(5): 1567-1571.
- Flora A, Schulz R, Benfante R, Battaglioli E, Terzano S, Clementi F, Fornasari D. (2000) Neuronal and extraneuronal expression and regulation of the human alpha5 nicotinic receptor subunit gene. *J Neurochem.* 75(1): 18-27.
- Frazier CJ, Rollins YD, Breese CR, Leonard S, Freedman R, Dunwiddie TV. (1998) Acetylcholine activates an alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic current in rat hippocampal interneurons, but not pyramidal cells. *J Neurosci.* 18(4): 1187-1195.

- Fried PA, Makin JE. (1987) Neonatal behavioural correlates of prenatal exposure to marihuana, cigarettes and alcohol in a low risk population. *Neurotoxicol Teratol.* 9: 1-7.
- Genedani S, Bernardi M, Bertolini A. (1983) Sex-linked differences in avoidance learning in the offspring of rats treated with nicotine during pregnancy. *Psychopharmacology (Berl).* 80(1): 93-95.
- Germán-Castelán L, Manjarrez-Marmolejo J, González-Arenas A, González-Morán MG, Camacho-Arroyo I. (2014) Progesterone induces the growth and infiltration of human astrocytoma cells implanted in the cerebral cortex of the rat. *Biomed Res Int.* 2014: 393174.
- Gilbert HF. (2000) Basic concepts in biochemistry. A student's survival guide. Segunda edición. McGraw-Hill. EUA.
- Gioanni Y, Rougeot C, Clarke PB, Lepoucé C, Thierry AM, Vidal C. (1999) Nicotinic receptors in the rat prefrontal cortex: increase in glutamate release and facilitation of mediodorsal thalamo-cortical transmission. *Eur J Neurosci.* 11(1): 18-30.
- Giocomo LM, Hasselmo ME. (2005) Nicotinic modulation of glutamatergic synaptic transmission in region CA3 of the hippocampus. *Eur J Neurosci.* 22(6): 1349-1356.
- Givens B, Olton DS. (1994) Local modulation of basal forebrain: effects on working and reference memory. *J Neurosci.* 14: 3578-3587.
- Goldman D, Deneris E, Luyten W, Kochhar A, Patrick J, Heinemann S. (1987) Members of a nicotinic acetylcholine receptor gene family are expressed in different regions of the mammalian central nervous system. *Cell.* 48(6): 965-973.
- Gotti C, Fornasari D, Clementi F. (1997) Human neuronal nicotinic receptors. *Prog Neurobiol.* 53(2): 199-237.
- Gotti C, Moretti M, Gaimarri A, Zanardi A, Clementi F, Zoli M. (2007) Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors. *Biochemical Pharmacology,* 74(8): 1102-1111.
- Gowing LR, Ali RL, Allsop S, Marsden J, Turf EE, West R, Witton J. (2015) Global statistics on addictive behaviours: 2014 status report. *Addiction.* 110(6): 904-919.
- Grassi G, Seravalle G, Calhoun DA, Bolla GB, Giannattasio C, Marabini M, Del Bo A, Mancina G. (1994) Mechanisms responsible for sympathetic activation by cigarette smoking in humans. *Circulation.* 90(1): 248-253.
- Grigorova M, Sherwin BB. (2006) No differences in performance on test of working memory and executive functioning between healthy elderly postmenopausal

- women using or not using hormone therapy. *Climacteric*. 9(3): 181-194.
- Guennoun R, Labombarda F, Gonzalez Deniselle MC, Liere P, De Nicola AF, Schumacher M. (2015) Progesterone and allopregnanolone in the central nervous system: Response to injury and implication for neuroprotection. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 146C: 48-61.
- Guerra-Araiza C, Coyoy-Salgado A, Camacho-Arroyo I. (2002) Sex differences in the regulation of progesterone receptor isoforms expression in the rat brain. *Brain Res Bull*. 59(2): 105-109.
- Guerra-Araiza C, Villamar-Cruz O, González-Arenas A, Chavira R, Camacho-Arroyo I. (2003) Changes in progesterone receptor isoforms content in the rat brain during the oestrous cycle and after oestradiol and progesterone treatments. *J Neuroendocrinol*. 15(10): 984-990.
- Guerriero G. (2009) Vertebrate sex steroid receptors: evolution, ligands, and neurodistribution. *Ann N Y Acad Sci*. 1163: 154-168.
- Hammes SR, Levin ER. (2007) Extranuclear steroid receptors: nature and actions. *Endocr Rev*. 28(7): 726-741.
- Han ZY, Le Novère N, Zoli M, Hill JA, Champtiaux N, Changeux JP. (2000) Localization of nAChR subunit mRNAs in the brain of *Macaca mulatta*. *Eur J Neurosci*. 12(10): 3664-3674.
- Hasselmo ME. (1999) Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation. *Trends Cog Sci*. 3(9): 351-359.
- Hasselmo ME. (2006) The role of acetylcholine in learning and memory. *Curr Opin Neurobiol*. 16(6): 710-705.
- Hasselmo ME, McGaughy J, (2004). High acetylcholine sets circuit dynamics for attention and encoding: low acetylcholine sets dynamics for consolidation. *Progress in Brain Research* 145: 207-231.
- Hasselmo ME, Stern C. (2006). Mechanisms underlying working memory for novel information. *Trends in Cognitive Science*, 10(11): 487-493.
- Hauser TA, Kucinski A, Jordan KG, Gatto GJ, Wersinger SR, Hesse RA, Stachowiak EK, Stachowiak MK, Papke RL, Lippiello PM, Bencherif M. (2009) TC-5619: an alpha7 neuronal nicotinic receptor-selective agonist that demonstrates efficacy in animal models of the positive and negative symptoms and cognitive dysfunction of schizophrenia. *Biochem Pharmacol*. 78(7): 803-812.
- Heishman SJ, Kleykamp BA, Singleton EG. (2010) Meta-analysis of the acute effects of nicotine and smoking on human performance. *Psychopharmacology (Berl)*. 210(4): 453-469.

- Hellström-Lindahl E, Gorbounova O, Seiger A, Mousavi M, Nordberg A. (1998) Regional distribution of nicotinic receptors during prenatal development of human brain and spinal cord. *Brain Res Dev Brain Res.* 108(1-2): 147-160.
- Hidaka N, Suemaru K, Kato Y, Araki H. (2013) Involvement of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors in working memory impairment induced by repeated electroconvulsive seizures in rats. *Epilepsy Res.* 104(1-2): 181-185.
- Higashi E, Fukami T, Itoh M, Kyo S, Inoue M, Yokoi T, Nakajima M. (2007) Human CYP2A6 is induced by estrogen via estrogen receptor. *Drug Metab Dispos.* 35(10): 1935-1941.
- Horst NK, Heath CJ, Neugebauer NM, Kimchi EY, Laubach M, Picciotto MR. (2012) Impaired auditory discrimination learning following perinatal nicotine exposure or $\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor subunit deletion. *Behavioural Brain Research.* 231: 170-180.
- Impey D, Chique-Alfonzo M, Shah D, Fisher DJ, Knott VJ. (2013) Effects of nicotine on visuospatial attentional orienting in non-smokers. *Pharmacol Biochem Behav.* 106: 1-7.
- Intlekofer KA, Petersen SL. (2011) Distribution of mRNAs encoding classical progesterin receptor, progesterone membrane components 1 and 2, serpine mRNA binding protein 1, and progesterin and ADIPOQ receptor family members 7 and 8 in rat forebrain. *Neuroscience.* 172: 55-65.
- Irwin RW, Yao J, Hamilton RT, Cadenas E, Brinton RD, Nilsen J. (2008) Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria. *Endocrinology.* 149(6): 3167-3175.
- Jernigan TL, Baaré WF, Stiles J, Madsen KS. (2011) Postnatal brain development: structural imaging of dynamic neurodevelopmental processes. *Progress in Brain Research.* 189: 77-92.
- Jiang Y, Dai A, Zhou Y, Peng G, Hu G, Li B, Sham JS, Ran P. (2015) Nicotine elevated intracellular Ca^{2+} in rat airway smooth muscle cells via activating and up-regulating $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor. *Cell Physiol Biochem.* 33(2): 389-401.
- Johann S, Beyer C. (2013) Neuroprotection by gonadal steroid hormones in acute brain damage requires cooperation with astroglia and microglia. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 137: 71-81.
- Johns JM, Louis TM, Becker RF, Means LW. (1982) Behavioral effects of prenatal exposure to nicotine in guinea pigs. *Neurobehav Toxicol Teratol.* 4(3): 365-369.
- Kato J, Hirata S, Nozawa A, Yamada-Mouri N. (1994) Gene expression of progesterone receptor isoforms in the rat brain. *Horm Behav.* 28(4): 454-463.

- Key AP, Ferguson M, Molfese DL, Peach K, Lehman C, Molfese VJ. (2007) Smoking during pregnancy affects speech-processing ability in newborn infants. *Environ Health Perspect.* 115: 623-629.
- Khiroug L, Giniatullin R, Klein RC, Fayuk D, Yakel JL. (2003) Functional mapping and Ca²⁺ regulation of nicotinic acetylcholine receptor channels in rat hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci.* 23(27): 9024-9031.
- Klinkenberg I, Blokland A. (2010) The validity of scopolamine as a pharmacological model for cognitive impairment: a review of animal behavioral studies. *Neurosci Biobehav Rev.* 34: 1307-1350.
- Knott V, de la Salle S, Choueiry J, Impey D, Smith D, Smith M, Beaudry E, Saghir S, Ilivitsky V, Labelle A. (2015) Neurocognitive effects of acute choline supplementation in low, medium and high performer healthy volunteers. *Pharmacol Biochem Behav.* 131: 119-129.
- Köfalvi A, Sperlách B, Zelles T, Vizi ES. (2000) Long-lasting facilitation of 4-aminon-[2,3-(3)H]butyric acid ([³H]GABA) release from rat hippocampal slices by nicotinic receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther.* 295(2): 453-462.
- Krebs CJ, Jarvis ED, Chan J, Lydon JP, Ogawa S, Pfaff DW. (2000) A membrane-associated progesterone-binding protein, 25-Dx, is regulated by progesterone in brain regions involved in female reproductive behaviors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(23): 12816-12821.
- Leite FB, Prediger RD, Silva MV, de Sousa JB, Carneiro FP, Gasbarri A, Tomaz C, Queiroz AJ, Martins NT, Ferreira VM. (2013) Role of nicotine on cognitive and behavioral deficits in sepsis-surviving rats. *Brain Res.* 1507: 74-82.
- Lendvai B, Kassai F, Szájli A, Némethy Z. (2013) $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors and their role in cognition. *Brain Res Bull.* 93: 86-96.
- Lendvai B, Vizi ES. (2008) Nonsynaptic chemical transmission through nicotinic acetylcholine receptors. *Physiol Rev.* 88(2): 333-49.
- Levin ED. (1992) Nicotinic systems and cognitive function. *Psychopharmacology (Berl).* 108(4): 417-431.
- Levin ED, Bettgowda C, Blosser J, Gordon J. (1999) AR-R17779, and alpha7 nicotinic agonist, improves learning and memory in rats. *Behav Pharmacol.* 10(6-7): 675-680.
- Levin ED, Chen E. (2004) Nicotinic involvement in memory function in zebrafish. *Neurotoxicol Teratol.* 26(6): 731-735.
- Levin ED, McClernon FJ, Rezvani AH. (2006) Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology (Berl).* 184(3-4): 523-539.

- Levin ED, Simon BB. (1998) Nicotinic acetylcholine involvement in cognitive function in animals. *Psychopharmacology (Berl)*. 138(3-4): 217-230.
- Levin ED, Torry D. (1996) Acute and chronic nicotine effects on working memory in aged rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 123(1): 88-97.
- Levin ED, Wilkerson A, Jones JP, Christopher C, Briggs, SJ. (1996) Prenatal nicotine effects on memory in rats: pharmacological and behavioral challenges. *Brain Res Dev Brain Res*. 97: 207-215.
- Levine JE, Chappell PE, Schneider JS, Sleiter NC, Szabo M. (2001) Progesterone receptors as neuroendocrine integrators. *Front Neuroendocrinol*. 22(2): 69-106.
- Li SP, Park MS, Bahk JY, Kim MO. (2002) Chronic nicotine and smoking exposure decreases GABA(B1) receptor expression in the rat hippocampus. *Neurosci Lett*. 334(2): 135-139.
- Lippiello PM, Bencherif M, Gray JA, Peters S, Grigoryan G, Hodges H, Collins AC. (1996) RJR-2403: a nicotinic agonist with CNS selectivity II. In vivo characterization. *J Pharmacol Exp Ther*. 279(3): 1422-1429.
- Liu L, Wang J, Zhao L, Nilsen J, McClure K, Wong K, Brinton RD. (2009) Progesterone increases rat neural progenitor cell cycle gene expression and proliferation via extracellularly regulated kinase and progesterone receptor membrane components 1 and 2. *Endocrinology*. 150(7): 3186-3196.
- Main KM, Skakkebaek NE, Virtanen HE, Toppari J. (2010) Genital anomalies in boys and the environment. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 24(2): 279-289.
- Mann PE, Babb JA. (2005) Neural steroid hormone receptor gene expression in pregnant rats. *Brain Res Mol Brain Res*. 142(1): 39-46.
- Mao C, Yuan X, Zhang H, Lv J, Guan J, Miao L, Chen L, Zhang Y, Zhang L, Xu Z. (2008) The effect of prenatal nicotine on mRNA of central cholinergic markers and hematological parameters in rat fetuses. *Int J Dev Neurosci*. 26(5): 467-475.
- Marchi M, Grilli M, Pittaluga AM. (2015) Nicotinic modulation of glutamate receptor function at nerve terminal level: a fine-tuning of synaptic signals. *Front Pharmacol*. 6: 89.
- Martin JC, Becker RF. (1971) The effects of maternal nicotine absorption or hypoxic episodes upon appetitive behavior of rat offspring. *Dev Psychobiol*. 4(2): 133-147.
- Masuyama H, Hiramatsu Y, Mizutani Y, Inoshita H, Kudo T. (2001) The expression of pregnane X receptor and its target gene, cytochrome P450 3A1, in perinatal mouse. *Mol Cell Endocrinol*. 172(1-2): 47-56.

- McQuiston AR, Madison DV. (1999) Nicotinic receptor activation excites distinct subtypes of interneurons in the rat hippocampus. *J Neurosci.* 19(8): 2887-2896.
- Meeter M, Murre JMJ, Talamini LM. (2004) Mode shifting between storage and recall based on novelty detection in oscillating hippocampal circuits. *Hippocampus.* 14: 722-741.
- Meffre D, Delespierre B, Gouézou M, Leclerc P, Vinson GP, Schumacher M, Stein DG, Guennoun R. (2005) The membrane-associated progesterone-binding protein 25-Dx is expressed in brain regions involved in water homeostasis and is up-regulated after traumatic brain injury. *J Neurochem.* 93(5): 1314-1326.
- Meffre D, Labombarda F, Delespierre B, Chastre A, De Nicola AF, Stein DG, Schumacher M, Guennoun R. (2013) Distribution of membrane progesterone receptor alpha in the male mouse and rat brain and its regulation after traumatic brain injury. *Neuroscience.* 231: 111-124.
- Melcangi RC, Magnaghi V, Martini L. (1999) Steroid metabolism and effects in central and peripheral glial cells. *J Neurobiol.* 40(4): 471-483.
- Mellon SH, Griffin LD. (2002) Neurosteroids: biochemistry and clinical significance. *Trends Endocrinol Metab.* 13(1): 35-43.
- Mesulam MM, Mufson EJ, Wainer BH, Levey AI. (1983) Central cholinergic pathways in the rat: an overview based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). *Neuroscience.* 10(4): 1185-1201.
- Meyer C, Schmid R, Scriba PC, Wehling M. (1996) Purification and partial sequencing of high-affinity progesterone-binding site(s) from porcine liver membranes. *Eur J Biochem.* 239(3): 726-731.
- Mirza NR, Bright JL. (2001) Nicotine-induced enhancements in the five-choice serial reaction time task in rats are strain-dependent. *Psychopharmacology (Berl).* 154(1): 8-12.
- Monteggia LM, Gopalakrishnan M, Touma E, Idler KB, Nash N, Arneric SP, Sullivan JP, Giordano T. (1995) Cloning and transient expression of genes encoding the human alpha 4 and beta 2 neuronal nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) subunits. *Gene.* 155(2): 189-193.
- Moragrega I, Carrasco MC, Vicens P, Redolat R. (2003) Spatial learning in male mice with different levels of aggressiveness: effects of housing conditions and nicotine administration. *Behav Brain Res.* 147(1-2): 1-8.
- Murray JE, Wells NR, Bevins RA. (2011) Nicotine competes with a visual stimulus for control of conditioned responding. *Addict Biol.* 16(1): 152-162.
- Nasrat HA, Al-Hachim GM, Mahmood FA. (1986) Perinatal effects of nicotine. *Biol Neonate.* 49: 8-14.

- Nelson DL, Cox MM. (2005) Lehninger principles of biochemistry. Cuarta edición. Omega. EUA.
- Oliveira E, Pinheiro CR, Santos-Silva AP, Trevenzoli IH, Abreu-Villaça Y, Nogueira Neto JF, Reis AM, Passos MC, Moura EG, Lisboa PC. (2010) Nicotine exposure affects mother's and pup's nutritional, biochemical, and hormonal profiles during lactation in rats. *J Endocrinol.* 205(2): 159-170.
- Orr PT, Lewis MC, Frick KM. (2009) Dorsal hippocampal progesterone infusions enhance object recognition in young female mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 93(2): 177-182.
- Pang Y, Dong J, Thomas P. (2013) Characterization, neurosteroid binding and brain distribution of human membrane progesterone receptors δ and $\{\epsilon\}$ (mPR δ and mPR $\{\epsilon\}$) and mPR δ involvement in neurosteroid inhibition of apoptosis. *Endocrinology.* 154(1): 283-295.
- Phelan S. (2014) Smoking cessation in pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 41(2): 255-266.
- Pidoplichko VI, Noguchi J, Areola OO, Liang Y, Peterson J, Zhang T, Dani JA. (2004) Nicotinic cholinergic synaptic mechanisms in the ventral tegmental area contribute to nicotine addiction. *Learning & Memory.* 11(1): 60-69.
- Puma C, Deschaux O, Molimard R, Bizot JC. (1999) Nicotine improves memory in an object recognition task in rats. *Eur Neuropsychopharmacol.* 9(4): 323-327.
- Radcliffe KA, Fisher JL, Gray R, Dani JA. (1999) Nicotinic modulation of glutamate and GABA synaptic transmission of hippocampal neurons. *Ann N Y Acad Sci.* 868: 591-610.
- Rahman S, López-Hernández GY, Corrigan WA, Papke RL. (2008) Neuronal nicotinic receptors as brain targets for pharmacotherapy of drug addiction. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 7(5): 422-441.
- Raval AP, Bhatt A, Saul I. (2009) Chronic nicotine exposure inhibits 17 β -estradiol mediated protection of the hippocampal CA1 region against cerebral ischemia in female rats. *Neurosci Lett.* 458: 65-69.
- Rezvani AH, Bushnell PJ, Levin ED. (2002) Effects of nicotine and mecamylamine on choice accuracy in an operant visual signal detection task in female rats. *Psychopharmacology (Berl).* 164(4): 369-375.
- Robertson CL, Saraswati M. (2014) Progesterone protects mitochondrial function in a rat model of pediatric traumatic brain injury. *J Bioenerg Biomembr.* 47(1-2): 43-51.
- Roof RL, Hall ED. (2000) Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone. *J Neurotrauma.* 17(5): 367-388.

- Rosell DR, Siever LJ. (2015) The neurobiology of aggression and violence. *CNS Spectr.* 20(3): 254-279.
- Rowell PP, Duggan DS. (1998) Long-lasting inactivation of nicotinic receptor function in vitro by treatment with high concentrations of nicotine. *Neuropharmacology.* 37(1): 103-111.
- Roy TS, Seidler FJ, Slotkin TA. (2002) Prenatal nicotine exposure evokes alterations of cell structure in hippocampus and somatosensory cortex. *J Pharmacol Exp Ther.* 300: 124-133.
- Schneider T, Ilott N, Brolese G, Bizarro L, Asherson PJ, Stolerman IP. (2011) Prenatal exposure to nicotine impairs performance of the 5-choice serial reaction time task in adult rats. *Neuropsychopharmacology.* 36(5): 1114-1125.
- Seguéla P, Wadiche J, Dineley-Miller K, Dani JA, Patrick JW. (1993) Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci.* 13(2): 596-604.
- Selmin O, Lucier GW, Clark GC, Tritscher AM, Vanden Heuvel JP, Gastel JA, Walker NJ, Sutter TR, Bell DA. (1996) Isolation and characterization of a novel gene induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rat liver. *Carcinogenesis.* 17(12): 2609-2615.
- Sershen H, Balla A, Lajtha A, Vizi ES. (1997) Characterization of nicotinic receptors involved in the release of noradrenaline from the hippocampus. *Neuroscience.* 77(1): 121-130.
- Shacka JJ, Robinson SE. (1998) Postnatal developmental regulation of neuronal nicotinic receptor subunit alpha 7 and multiple alpha 4 and beta 2 mRNA species in the rat. *Brain Res Dev Brain Res.* 109(1): 67-75.
- Sharma G, Vijayaraghavan S. (2003) Modulation of presynaptic store calcium induces release of glutamate and postsynaptic firing. *Neuron.* 38(6): 929-939.
- Shoaib M, Gommans J, Morley A, Stolerman IP, Grailhe R, Changeux JP. (2002) The role of nicotinic receptor beta-2 subunits in nicotine discrimination and conditioned taste aversion. *Neuropharmacology.* 42(4): 530-539.
- Shram MJ, Funk D, Li Z, L  AD. (2006) Preadolescent and adult rats respond differently in tests measuring the rewarding and aversive effects of nicotine. *Psychopharmacology (Berl).* 186(2): 201-208.
- Sinkus ML, Graw S, Freedman R, Ross RG, Lester HA, Leonard S. (2015) The human CHRNA7 and CHRFA7A genes: A review of the genetics, regulation, and function. *Neuropharmacology.* pii: S0028-3908 (15) 00053-2.
- Slotkin TA, Seidler FJ. (2015) Prenatal nicotine alters the developmental neurotoxicity of postnatal chlorpyrifos directed toward cholinergic systems: better, worse, or just "different?" *Brain Res Bull.* 110: 54-67.

- Slotkin TA, Southard MC, Adam SJ, Cousins MM, Seidler FJ. (2004) Alpha7 nicotinic acetylcholine receptors targeted by cholinergic developmental neurotoxicants: nicotine and chlorpyrifos. *Brain Res Bull.* 64(3): 227-235.
- Slotkin TA. (2004) Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. *Toxicol Appl Pharmacol.* 198(2): 132-151.
- Socci DJ, Sanberg PR, Arendash GW. (1995) Nicotine enhances Morris water maze performance of young and aged rats. *Neurobiol Aging.* 16(5): 857-860.
- Sorenson CA, Raskin LA, Suh Y. (1991) The effects of prenatal nicotine on radial-arm maze performance in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 40(4): 991-993.
- Squire LR, Zola SM. (1996) Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc Natl Acad Sci.* 93: 13515-13522.
- Stauderman KA, Mahaffy LS, Akong M, Veliçelebi G, Chavez-Noriega LE, Crona JH, Johnson EC, Elliott KJ, Gillespie A, Reid RT, Adams P, Harpold MM, Corey-Naeve J. (1998) Characterization of human recombinant neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit combinations alpha2beta4, alpha3beta4 and alpha4beta4 stably expressed in HEK293 cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 284(2): 777-789.
- Stephan-Blanchard E, Telliez F, Leke A, Djeddi D, Bach V, Libert JP, Chardon K. (2008) The influence of in utero exposure to smoking on sleep patterns in preterm neonates. *Sleep.* 31(12): 1683-1689.
- Stiver ML, Jacklin DL, Mitchnick KA, Vicic N, Carlin J, O'Hara M, Winters BD. (2015) Cholinergic manipulations bidirectionally regulate object memory destabilization. *Learn Mem.* 22(4): 203-214.
- Sugiyama H, Hagino N, Moore G, Lee JW. (1985) [3H]Nicotine binding sites in developing fetal brains in rats. *Neurosci Res.* 2(5): 387-392.
- Szász BK, Mayer A, Zsilla G, Lendvai B, Vizi ES, Kiss JP. (2005) Carrier-mediated release of monoamines induced by the nicotinic acetylcholine receptor agonist DMPP. *Neuropharmacology.* 49(3): 400-409.
- Tanabe F, Miyasaka N, Kubota T, Aso T. (2004) Estrogen and progesterone improve scopolamine-induced impairment of spatial memory. *J Med Dent.* 51: 89-98.
- Terry AV Jr, Buccafusco JJ. (2003) The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther.* 306(3): 821-827.

- Toyohara J, Hashimoto K. (2010) $\alpha 7$ Nicotinic Receptor Agonists: Potential Therapeutic Drugs for Treatment of Cognitive Impairments in Schizophrenia and Alzheimer's Disease. *Open Med Chem J.* 4: 37-56.
- Vanoye-Carlo A, Morales T, Ramos E, Mendoza-Rodríguez A, Cerbón M. (2008) Neuroprotective effects of lactation against kainic acid treatment in the dorsal hippocampus of the rat. *Horm Behav.* 53(1): 112-123.
- Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, McDonnell DP. (1993) Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol.* 7(10): 1244-1255.
- Vicens P, Carrasco MC, Redolat R. (2003) Effects of early training and nicotine treatment on the performance of male NMRI mice in the water maze. *Neural Plast.* 10(4): 303-317.
- Vizi ES, Sershen H, Balla A, Mike A, Windisch K, Jurányi Z, Lajtha A. (1995) Neurochemical evidence of heterogeneity of presynaptic and somatodendritic nicotinic acetylcholine receptors. *Ann N Y Acad Sci.* 757: 84-99.
- von Bohlen und Halbach O, Dermietzel R. (2006) Neurotransmitters and Neuromodulators. *Handbook of receptors and biological effects.* Segunda edición. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Alemania.
- von Ziegler NI, Schlumpf M, Lichtensteiger W. (1991) Prenatal nicotine exposure selectively affects perinatal forebrain aromatase activity and fetal adrenal function in male rats. *Brain Res Dev Brain Res.* 62(1): 23-31.
- Wang F, Gerzanich V, Wells GB, Anand R, Peng X, Keyser K, Lindstrom J. (1996) Assembly of human neuronal nicotinic receptor $\alpha 5$ subunits with $\alpha 3$, $\beta 2$, and $\beta 4$ subunits. *J Biol Chem.* 271(30): 17656-17665.
- Wonnacott S. (1997) Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends Neurosci.* 20(2): 92-98.
- Woodruff-Pak DS, Green JT, Coleman-Valencia C, Pak JT. (2000) A nicotinic cholinergic agonist (GTS-21) and eyeblink classical conditioning: acquisition, retention, and relearning in older rabbits. *Exp Aging Res.* 26(4): 323-336.
- Wolf NJ. (1991) Cholinergic systems in mammalian brain and spinal cord. *Prog Neurobiol.* 37: 475-524.
- Xu Z, Seidler FJ, Ali SF, Slikker W Jr, Slotkin TA. (2001) Fetal and adolescent nicotine administration: effects on CNS serotonergic systems. *Brain Res.* 914(1-2): 166-178.
- Yanai J, Pick CG, Rogel-Fuchs Y, Zahalka EA. (1992) Alterations in hippocampal cholinergic receptors and hippocampal behaviors after early exposure to nicotine. *Brain Res Bull.* 29(3-4): 363-368.

- Yildiz D. (2004) Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol*, 43: 619-632.
- Yonker JE, Adolfsson R, Eriksson E, Hellstrand M, Nilsson LG, Herlitz A. (2006) Verified hormone therapy improves episodic memory performance in healthy postmenopausal women. *Neuropsychol Dev Cogn B Aging Neuropsychol Cogn*. 13 (3-4): 291-307.
- Young JW, Finlayson K, Spratt C, Marston HM, Crawford N, Kelly JS, Sharkey J. (2004) Nicotine improves sustained attention in mice: evidence for involvement of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Neuropsychopharmacology*. 29(5): 891-900.
- Zarrindast MR, Haeri-Zadeh F, Zarghi A, Lahiji P. (1998) Nicotine potentiates sulpiride-induced catalepsy in mice. *J Psychopharmacol*. 12(3): 279-282.
- Zhou FM, Liang Y, Dani JA. (2001) Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the striatum. *Nat Neurosci*. 4(12): 1224-1229.
- Zhu Y, Bond J, Thomas P. (2003) Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(5): 2237-2242.
- Zoli M, Le Novère N, Hill JA Jr, Changeux JP. (1995) Developmental regulation of nicotinic ACh receptor subunit mRNAs in the rat central and peripheral nervous systems. *J Neurosci*. 15(3 Pt 1): 1912-1939.