



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

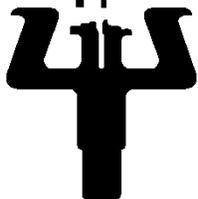
**“INFLUENCIA DE LA LUZ CONSTANTE SOBRE
EL DESARROLLO FISIOLÓGICO Y
CONDUCTUAL TEMPRANO DE RATAS: UN
ESTUDIO CRONBIOLÓGICO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN PSICOLOGÍA
P R E S E N T A:
M A D A H I P A L M A G Ò M E Z

DIRECTOR: DR. ALBERTO MANUEL ÁNGELES CASTELLANOS.

REVISORA: DRA. MARÍA DOLORES RODRÍGUEZ ORTIZ.



® **Facultad
de Psicología**

MÉXICO, D.F.

2011.



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.

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, por su inagotable pulmón, su apoyo incondicional en mi aprendizaje y por enseñarme la libertad y responsabilidad en cada una de mis decisiones.

A Abraham, por ser mi hermano, ser leal, cómplice y por reírse de mí y cuestionar: ¿Cómo, estudias psicología?... ¡Gracias por ayudarme!

A mi papá por poner límites y por recordarme el creer en mí.

A mis abuelos y a Yuli, por ser parte de mi vida y apoyarme.

Al Dr. Manuel Ángeles, agradezco que me acogiese en el laboratorio y apostase por mí cuando le dije que lo elegía para mi director de tesis. Ha sido para mí una gran fuente de información científica. ¡Terminamos... con el principio!

A la Dra. Laura Ubaldo, por sus continuas y pacientes explicaciones, me han ayudado a darle sentido a los datos y a lo que hacía, sin duda ha sido y será una gran influencia a lo largo de mi carrera científica.

A Carlos, por su paciencia, su amor y por su confianza en mí y en mi trabajo.

A Gabriel, por ser un apoyo en mi vida, por su amor, por todos los buenos momentos que me ha dado ¡que han sido todos!

A Cesar, por su trabajo, su cambio, su apoyo, sus ganas y por estar...

Al Dr. Armando Pérez Torres, por su disposición y la ayuda con el análisis histológico de esta tesis.

A la Dra. Escobar, a mi revisora, la Dra. Dolores y a la Lic. Katia, por sus comentarios y disposición para mejorar este trabajo.

Todos ustedes han contribuido en gran medida a la realización y redacción de esta primer Tesis.

Gracias.

MADAHÍ

ÍNDICE	PAG.
ABREVIATURAS.....	7
1. ANTECEDENTES.....	8
1.1. Los ritmos biológicos.....	8
1.2. Homeostasis, cronostasis y cronobiología.....	10
1.3. Importancia de los ritmos biológicos.....	12
1.4. El estudio de los ritmos biológicos.....	13
1.5. Mecanismos para la generación de los ritmos circadianos.....	16
1.6. Núcleo supraquiasmático (NSQ) y sistema circadiano.....	18
1.7. Papel de la glándula pineal y la melatonina en el sistema circadianos.....	21
1.8. Sincronización de los ritmos biológicos.....	22
1.8.1. Sincronización fótica y no fótica.....	23
1.9. Cronobiología, desincronización y salud.....	24
1.10. Desarrollo retiniano e Investigaciones Neonatales.....	26
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	32
3. OBJETIVO GENERAL.....	33
3.1. Objetivos específicos.....	33
4. HIPÓTESIS.....	34
5. MÉTODO.....	35
5.1. Animales.....	35

5.2. Materiales e instrumentos.....	35
5.3. Procedimientos.....	36
5.3.1. Diseño experimental.....	36
5.3.2. Cuantificación del peso corporal.....	38
5.3.3. Consumo de alimento.....	38
5.3.4. Obtención de tejido.....	38
5.3.5. Registro de tejido graso.....	38
5.3.6. Registro Conductual.....	39
5.3.7. Análisis Histológico.....	39
5.4 Análisis Estadístico.....	40
6. RESULTADOS.....	41
6.1 Ganancia de peso corporal.....	41
6.1.1. Fase de amamantamiento.....	41
6.1.2. Fase post- amamantamiento.....	42
6.1.3. Consumo de alimento.....	45
6.2. Cantidad de tejido graso.....	45
6.3. Actividad locomotora.....	47
6.3.1. Fase de actividad locomotora durante el amamantamiento ..	47
6.3.2. Fase de actividad locomotora post-amamantamiento ...	49
6.4. Anàlisis Histològico	50
7. DISCUSION	54
7.1. Peso corporal	54
7.1.1. Cantidad de tejido graso	55

7.2. Actividad locomotora	56
7.3 Histología de retinas.....	57
8.CONCLUSIONES	59
9.BIBLIOGRAFÍA.....	61

RESUMEN

La mayoría de los seres vivos coordinan gran parte de su actividad conductual y fisiológica de acuerdo a ritmos biológicos, los ritmos biológicos se manifiestan en funciones orgánicas tales como: la temperatura corporal, el ritmo del latido cardiaco, la secreción de algunas glándulas endocrinas, el ritmo de actividad-reposo, etc. Estos ritmos biológicos pueden estar asociados a las variaciones ambientales periódicas como el movimiento de rotación y translación de nuestro planeta y de la luna (por ejemplo, las distintas estaciones del año, el ciclo luz-oscuridad, el fotoperiodo, las mareas, cambios de temperatura y humedad, etc.).

Los ritmos biológicos diarios (circadianos) son de gran interés, ya que al modificar el orden temporal interno o interrumpir la periodicidad de los ritmos se pueden generar cambios fisiológicos, conductuales o incluso trastornos clínicos.

El presente estudio tiene como objetivos: analizar el crecimiento corporal de ratas recién nacidas a las que se mantuvo en condiciones de luz constante, estudiar el ritmo de la actividad locomotora de los sujetos y analizar la citoarquitectura de las retinas de las ratas sometidas a luz constante.

Se utilizaron 60 ratas recién nacidas de la cepa Wistar (30 hembras y 30 machos) de aproximadamente 4.09 ± 0.10 gramos de peso. Las ratas fueron divididas en 3 grupos. Se crearon dos grupos control, el primer grupo, estuvo conformado por 20 ratas sometidas a un ciclo de luz-oscuridad (L-D, 12:12), donde el encendido de luz fue a las 6:30 horas. (Zeitgeber time, ZT0) y el apagado a las 18:30 horas (ZT12).

El segundo grupo control estuvo conformado por 20 ratas que estuvieron bajo condiciones de oscuridad constante (D-D) las 24 horas, el tercer grupo (experimental) se sometió a condiciones de luz constante (L-L) las 24 horas.

Los primeros 23 días las ratas recién nacidas fueron alimentadas por ratas lactantes, las ratas lactantes se mantuvieron bajo un ciclo de luz oscuridad 12:12, cada rata lactante alimento de forma alternada entre los grupos a 10 ratas recién nacidas. A partir del día 23 (destete) las ratas recién nacidas fueron separadas en hembras y machos, se suprimió la presencia de la madre lactante y se mantuvieron con libre acceso al agua y alimento hasta el final del experimento (50 días).

Los resultados muestran que el peso corporal de los animales del grupo L-D fue significativamente diferente durante todo el estudio comparado con el grupo D-D y el L-L.

La actividad locomotora general del grupo L-L fue menor comparada con el grupo L-D y D-D. El grupo L-D muestra un patrón de ritmicidad circadiana muy estable en el ritmo de actividad locomotora en comparación con el grupo D-D que muestra arritmicidad y con el grupo L-L que muestra poca actividad y también arritmicidad.

El análisis de la cito arquitectura retiniana muestra que la luz constante produce un deterioro en todas las capas celulares de la retina.

Con estos datos concluimos que la luz constante desde el nacimiento produce al menos en la vía de entrada del sistema circadiano un efecto de deterioro y arritmicidad en la actividad locomotora.

ABREVIATURAS

L-D	Luz - Oscuridad
D-D	Oscuridad - Oscuridad (Oscuridad Continua)
L-L	Luz – Luz (Luz Continua)
NSQ	Núcleo Supraquiasmático
TRH	Tracto Retino Hipotalámico
TGH	Tracto Geniculo-Hipotalámico
NR	Núcleo del Rafe
VL	Ventro Lateral
DM	Dorso Medial
GABA	Acido gama-amino butírico
VIP	Péptido Intestinal Vasoactivo
IGL	Hojuela Intergeniculada
PVT	Núcleo Paraventricular del Tálamo
GP	Glándula Pineal
SNC	Sistema Nervioso Central
ZT	Zeitgeber Time
EP	Epitelio Pigmentario
CF	Células Fotorreceptoras
CNE	Capa Nuclear Externa
CPE	Capa Plexiforme Externa
CNI	Capa Nuclear Interna
CPI	Capa Plexiforme Interna
CG	Células Ganglionares

*Entre el día y la noche hay un territorio inexplorado.
No es sol ni es sombra: es tiempo.*

Octavio Paz

1. ANTECEDENTES.

1.1. Los ritmos biológicos.

Un ritmo biológico es una variación cíclica de un parámetro biológico que se repite a intervalos regulares de tiempo siendo por tanto previsible (Gruart y Cols., 2002).

Los ritmos biológicos surgieron en el curso de la evolución en respuesta a determinadas variables ambientales cíclicas (exposición a la luz, temperatura, humedad, salinidad, etc.), que actúan como claves temporales o *zeitgebers* modelando en los organismos una representación endógena del tiempo externo.

Así el correlato biológico-geofísico se explica por la impresión original del ambiente, mientras que sus diferencias se deben a las características particulares de las especies para adaptarse al medio ambiente (Pittendrigh, 1981).

Los ritmos biológicos tienen un carácter hereditario, es decir, están genéticamente determinados y gran parte de los ritmos biológicos están sincronizados por factores del entorno pero se originan a partir de procesos rítmicos intrínsecos (endogenia) (Marques y Menna, 2003).

Los ritmos biológicos medidos en ambientes constantes muestran períodos de curso libre similares al período del ritmo geofísico más relevante para el organismo. Franz Halberg introdujo el prefijo "circa" (cerca a) para caracterizar esta periodicidad endógena relacionada a la variable ambiental de influencia con el ciclo diario de luz-oscuridad, (Halberg, 1959). Por otro lado, Jürgen Aschoff extendió el concepto, a "circadiano" hallando periodicidades "circamareales", "circalunares" y "circanuales", dependiendo del ciclo ambiental al que se ajuste, así los ritmos con un período menor a 24 horas se les designa *ultradianos* (se repiten más veces en 24 horas) como el ritmo cardíaco o la actividad eléctrica cerebral e *infradianos* con un período mayor a 24 horas (se repiten menos veces en 24 horas) como el ciclo menstrual o la hibernación.

Una amplia evidencia experimental, sustentada en la hipótesis acerca del origen endógeno de los ritmos, fue extendiéndose más allá de los primeros estudios en plantas hacia una gran variedad de especies animales. Del estudio de estos "circarritmos", surgen las características fundamentales (Aschoff, 1969; Aschoff, 1981):

- 1.- Se encuentran en la mayoría de las especies biológicas.
- 2.- Se mantienen por períodos prolongados de aislamiento ambiental.
- 3.- Se observa una gran variabilidad individual y es siempre constante para los distintos ritmos del mismo individuo, por lo tanto habiéndose eliminado la fuente de variación ambiental, aquella variabilidad sólo puede explicarse por diferencias genéticas.
- 4.- El período de libre curso exhibe poca variación a lo largo de series de tiempo prolongadas, como consecuencia de un proceso que cuenta con mecanismos de regulación.

1.2. Homeostasis, cronostasis y cronobiología.

En 1842 el médico y fisiólogo Claude Bernard (1813-1878), planteó la existencia de un medio interno que debía mantenerse constante. Pero no fue sino hasta 1928 que el biólogo Walter Cannon (1871-1945) acuñó el término homeostasis (Del griego *homeo* que significa «similar», y *estasis*, «estabilidad»), el cual fue definido como el conjunto de mecanismos que tienden a la estabilidad en la composición bioquímica de los líquidos, células y tejidos, para mantener la vida (Caponi, 2001).

Según el principio de homeostasis, el organismo responde a los estímulos externos con el fin de mantener las diversas variables del medio interno en niveles relativamente constantes y fisiológicamente adecuados.

Actualmente la teoría homeostática resulta insuficiente para explicar algunos aspectos de la fisiología, como la ingestión de alimento, necesidad previa a cambios en los niveles de metabolitos que mantienen el balance energético. Es decir, existen mecanismos que inician procesos complejos de búsqueda y consumo de alimento antes de que suceda una hipoglucemia severa, de la misma manera que la saciedad en el consumo de alimento ocurre antes de la absorción completa de nutrientes. Esto indica la existencia de sistemas especializados para la regulación fisiológica, capaces de detectar y prevenir estímulos que producirán alteraciones en el sistema homeostático (Ángeles y Cols., 2004). Estos cambios de tipo predictivo, incluyen a los ritmos biológicos, considerados como una forma de adaptación conductual y fisiológica en respuesta al medio ambiente cambiante y cíclico, lo cual es un proceso cronostático. El término de Cronostasis, define aquellos mecanismos que dan un orden temporal a diversos procesos fisiológicos, que ajustan el tiempo biológico con el geofísico y que coordinan la progresión temporal de distintos procesos fisiológicos y conductuales entre sí. La forma en que la cronostasis opera es a través del sistema circadiano. (Escobar y Aguilar- Roblero, 2002).

La cronobiología es una ciencia joven que estudia los ritmos biológicos desde todos los puntos de vista, incluyendo aspectos conductuales, fisiológicos, celulares y moleculares. A mediados del siglo XX comenzaron a formalizarse los conceptos del estudio del *cuándo ocurren las cosas* (Golombek, 2002). Se comprobó lo que se sospechaba desde la antigüedad: todas las funciones fisiológicas, bioquímicas y

conductuales son periódicamente regulares (Aldana, 1992). En particular, el hecho de haberse adaptado a un planeta que gira con un período de 24 horas sin duda condicionó a infinidad de ritmos biológicos en plantas y animales a la presencia de esos ritmos circadianos (CIRCA: cerca; DIAN: día; “cercano al día”). En condiciones naturales, los ritmos biológicos se ajustan a los ciclos ambientales, el más conspicuo de los cuales es el ciclo de Luz-Oscuridad (L-D). De esta manera, un sincronizador o indicador temporal usualmente llamado *zeitgeber* (del alemán *zeit*, tiempo; *geber*, indicador, dador), pone en hora a los ritmos diarios. Sin embargo, dado que en ausencia del *zeitgeber* la mayoría de estos ritmos se mantienen o persisten con un carácter circadiano, debe postularse la presencia de un mecanismo interno de medición temporal llamado sistema circadiano. De esta manera, la manifestación de un ritmo biológico sincronizado se genera de la interacción de tres componentes: *zeitgeber* (componente exógeno), reloj biológico (componente endógeno) y los ritmos biológicos propiamente, así como las relaciones entre estos: la sincronización entre el componente exógeno, endógeno y el acoplamiento entre el reloj y los ritmos. (Diez y Cols. 1996). Este concierto cronobiológico tiene como consecuencia que los organismos estén mejor preparados para diferentes funciones y comportamientos en distintas horas del día. Aprovechar esas capacidades distintas dependiendo del momento es sin duda una de las aplicaciones más inmediatas de la cronobiología.

1.3. Importancia de los ritmos biológicos.

Los organismos realizamos diariamente una serie de funciones para sobrevivir, cada respuesta o función adaptativa requiere de la interacción de varios órganos y sistemas (Touitou y Haus, 1994). Estos sistemas además de estar constituidos por estructuras especializadas, cuentan con vías para la entrada de información y vías para la salida de información, de manera que los organismos son un conjunto de redes funcionales complejas, las cuales tratamos de comprender a través de la anatomía y fisiología, lo que nos permite conocer su localización, forma y relaciones funcionales.

Entre las múltiples funciones que realizamos los seres vivos diariamente, está la de mantener un orden temporal. Esto es, realizar todas nuestras actividades en congruencia con los cambios diarios asociados al medio ambiente. Durante un ciclo de 24 horas debemos enfrentar cambios asociados al día y la noche, por lo tanto a un ciclo de L-D, también enfrentamos cambios en las oscilaciones de la temperatura corporal, modificaciones ambientales, la humedad, etc. Estos ciclos diarios le imponen a todo individuo un reto adaptativo que requiere de respuestas óptimas sincronizadas con el momento del día. Adicionalmente, para una buena adaptación se requiere que los organismos coordinen sus conductas con ciclos diarios de L-D, que por presentar un periodo regular son predecibles. En consecuencia cada individuo muestra ciclos en su conducta y fisiología, siendo el ejemplo más claro de ello la alternancia del ciclo actividad-reposo, el cual es de aproximadamente 24 horas (Anders, 1982).

1.4 El estudio de los ritmos biológicos.

Un mito griego cuenta que en su transcurso diario por el cielo en su carro dorado, *Febo* (el Dios Sol) llegó a enamorar a una joven de nombre *Clythie*, que lo observaba embelesada desde la Tierra. Al no ser correspondida, *Clythie* decidió “plantarse” en la tierra y seguir a *Febo*. Tanto se tomó en serio el trabajo que al cabo de un tiempo de seguir al sol con su mirada, su cuerpo comenzó a transformarse, sus pies echaron raíces hasta que se convirtió en un girasol (Ovidio, Edición 2008). Nada más parecido a un ritmo biológico: tenemos una planta (lo biológico) que repite un movimiento día a día (lo rítmico).

Algo sobre los ritmos biológicos debían saber médicos y filósofos de la Grecia antigua. El poeta Hesíodo escribió hacia el año 700 a.C.: “las enfermedades caen sobre los hombres, algunas de día y otras por la noche”. El mismo Hipócrates aconsejaba a los interesados en la medicina “investigar las estaciones del año y lo que ocurre en ellas”. Como consejo práctico, sugería “administrar las purgas de arriba hacia abajo en el verano y de abajo hacia arriba en el invierno”. En el año 325 a.C., Andróstenes de Thasos da una de las primeras descripciones de ritmos biológicos, detallando el movimiento periódico de las hojas de *Tamarindus indicus* (Dunlap y Cols., 1994).

El primer experimento cronobiológico verdadero no discrepa de las observaciones previas, la idea totalmente lógica de que los ritmos en los movimientos de las plantas eran una simple respuesta pasiva a un ambiente periódico se demostró por un experimento realizado y publicado en 1729, no por un biólogo sino por el físico-astrónomo Jean Jacques D’ortous de Mairan, quien tenía en su observatorio una maceta con una particular planta sensitiva, probablemente fue la *Mimosa púdica* (cuyas hojas se mueven al ser tocadas). De Mairan observó que las hojas de la planta se mantenían extendidas durante el día y retraídas durante la noche, algo muy sencillo de explicar en función de la utilización diurna de la energía solar. Sin embargo, el astrónomo fue un paso más allá y realizó una experiencia que no resultaba ser tecnológicamente muy avanzada: colocar la maceta dentro de un armario al que no llegaba la luz solar (Figura 1). Para su sorpresa, las hojas de la *Mimosa* se seguían moviendo, por lo que se demostró por primera vez que los ritmos

circadianos eran capaces de mantenerse aun en ausencia de señales temporales del ambiente (es más, la definición de ritmo circadiano requiere que sean de carácter endógeno, y que no dependan del ambiente en forma absoluta).

De Mairan propuso que esta situación era equivalente a la de los pacientes que, aun sin saber la hora del día, mantenían un patrón de sueño relativamente regular, De Mairan sugirió también extender los experimentos a otras especies (Golombek y Yanielli, 1996).

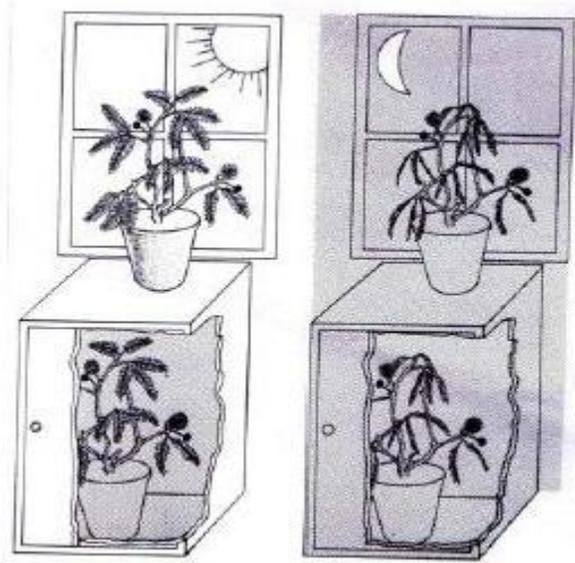


Figura 1. El experimento de De Mairan, que demostró por primera vez la existencia de ritmos Circadianos endógenos. Al tener una planta de Mimosa púdica expuesta a un ciclo de luz y oscuridad, las Hojas se mueven como siguiendo al sol. Sin embargo, al eliminar la influencia de la luz solar colocando la Planta en oscuridad constante (paneles inferiores), las hojas continúan moviéndose. (Modificado de Moore et al., 1982).

Más adelante De Monceau, detectó que los movimientos de las hojas en oscuridad no se debían a cambios en la temperatura ambiente, en realidad fue muy poco lo que se avanzó sobre estos ritmos endógenos hasta el siglo XX. Entre los experimentos fundamentales deben mencionarse los de De Candolle, quien en 1832 demostró que este movimiento de las hojas bajo condiciones constantes no seguía un período de 24 horas, sino uno de 22-23 horas. El mismo Charles Darwin, en sus años de ensayista luego de dar la vuelta al mundo, propuso en el libro “El poder del movimiento en las plantas” que estos ritmos en la posición de las hojas eran una propiedad *inherente* (Cardinalli y Cols. 1996).

La prueba definitiva del carácter endógeno de los ritmos en humanos provino de una serie de experimentos realizados en 1960, Jürgen Aschoff y Rütger Wever registraron ritmos de temperatura y actividad-reposo en humanos bajo condiciones de aislamiento absoluto y ausencia de señales cronológicas, encontraron que los ciclos endógenos respondían con un período de aproximadamente 25 horas en la mayoría de los casos. Recientemente, el grupo de Charles Czeisler en la Universidad de Harvard, demostró que el período endógeno de los ritmos circadianos en humanos es en realidad extremadamente cercano a las 24 horas (23.5 horas). Aschoff y Wever también encontraron que en algunos de los voluntarios que realizaron una prueba de aislamiento el período del ritmo de temperatura se mantenía cercano a las 24 horas (de 23.5 a 26 horas), mientras que el del ciclo de actividad locomotora podía superar las 30 horas, observaron que los ritmos de temperatura y de actividad-reposo, se desfasaban entre sí, a este fenómeno se le denominó *desincronización interna*.

Los hallazgos anteriores sugirieron la presencia de 2 tipos de relojes u osciladores principales en humanos (algo diferente a lo observado en otros animales), hecho que aún no se ha podido verificar experimentalmente, más allá de situaciones en las que se observa la desincronización (por ejemplo, algunos casos de *Jet-lag*, o desincronización transmeridiana) (Golombek, 2002).

1.5. Mecanismos para la generación de los ritmos circadianos.

La tarea más complicada en el estudio de los ritmos biológicos ha sido la localización del reloj biológico. Carl RITCHER en 1967 realizó estudios en ratas en las cuales lesionó el hipotálamo anterior y observó que los animales perdían la organización temporal y que la actividad locomotora se presentaba al azar a lo largo del día (Aschoff, 1981).

En 1972 dos grupos por separado realizaron estudios de marcaje retrogrado retiniano y lesiones más específicas en el hipotálamo, así demostraron que el Núcleo Supraquiasmático del hipotálamo (NSQ) es el responsable de generar la ritmicidad, ya que su lesión provoca que la rata se vuelva arrítmica en su conducta, es decir pierde la ritmicidad endógena y por lo tanto la capacidad para responder a los ciclos L-D y a tener periodos de alternancia entre actividad/descanso específicos, lo que afirma la idea del NSQ como el reloj biológico, capaz de transmitir esta ritmicidad al resto del organismo (Moore y Eichler 1972; Stephan y Zucker 1972).

Una evidencia más del papel del NSQ como reloj endógeno fueron los resultados del trasplante de células fetales del hipotálamo anterior en el tercer ventrículo de ratas con lesión previa del NSQ, esta manipulación restablece el ritmo perdido con la lesión (Aguilar-Roblero y Cols., 1986).

Estos experimentos demuestran la independencia y el papel del NSQ como reloj maestro del organismo, así como su capacidad de generar y transmitir patrones rítmicos a estos sistemas.

Actualmente se sabe que el sistema circadiano se encuentra constituido por tres componentes esenciales: las vías de entrada de información, los mecanismos del reloj y las vías de salida para la transmisión de ritmicidad a otras partes del cuerpo. Entre las vías de entrada de información se consideran a las vías que proporcionan señales del ambiente para mantener sincronizado al sistema a los ciclos externos, de estas señales la más poderosa es la alternancia del ciclo L-D.

Esta vía de entrada de información incluye a la retina así como al tracto retino-hipotalámico (TRH). Por su parte, sobre los mecanismos del reloj biológico, se ha identificado que el NSQ del hipotálamo, genera los ritmos aún en condiciones en que no recibe señales ambientales del tiempo (Rodríguez, 2007). El NSQ tiene además

la propiedad de transmitir señales de tiempo a todos los tejidos finos del cuerpo por medio de hormonas y del sistema nervioso autónomo. Mediante estas señales los tejidos y órganos ajustan sus oscilaciones en concordancia con la actividad o el reposo (Buijs y Kreier, 2008).

1.6. Núcleo supraquiasmático (NSQ) y sistema circadiano.

En los mamíferos los NSQ, tienen forma oval y se encuentran localizados en la región ventral del hipotálamo, dorsales al quiasma óptico y ventrolaterales al tercer ventrículo. Cada uno de los núcleos está constituido por cerca de 10.000 células y un volumen total de 0,068 mm³ (Hastings y Cols. 2003).

Una característica principal de los NSQ es su división en dos regiones inicialmente distinguidas por sus patrones de inervación retiniana y luego por su distinto fenotipo histoquímico: una región ventrolateral (VL) o “core”, caracterizada por la presencia del péptido intestinal vasoactivo (VIP) y una región dorsomedial (DM) y rostral o “shell”, que presenta neuronas con una alta densidad del neuropéptido vasopresina (VP) (Hendrickson, 1972).

Las células de la región VL reciben inervación directa de la retina, responden a la luz expresando tanto genes reguladores (como *c-fos*) como genes propios del mecanismo que controla la fase del reloj (*Per1* y *Per2*) y liberan, como ya se mencionó, VIP, GABA y péptido liberador de gastrina (GRP) desde sus terminales sinápticas proyectadas hacia la región DM. Además estas células presentan un ritmo diario de sensibilidad a la luz y son fundamentales para el mantenimiento de los ritmos del organismo (Yanielli y Harrington, 2004).

Por otro lado, las células de la región DM poseen el reloj molecular siendo intrínsecamente rítmicas, existiendo además otras que responden de manera indirecta a la luz por la acción de los neurotransmisores liberados desde la región “core”. (Figura 2). (Antle y Silver, 2005).

La cantidad de luz ambiental es detectada en la retina por fotorreceptores circadianos diferentes a los que intervienen en la visión. Los fotorreceptores circadianos son células retinianas ganglionares tipo W, las cuales poseen el fotorreceptor melanosina y se caracterizan por tener un campo receptivo visual muy amplio y por codificar la cantidad de luz (Rollag, 2003). Los axones de las células ganglionares forman el TRH que llega a la porción VL del NSQ, estos axones liberan un aminoácido excitador, probablemente glutamato, y el péptido hipofisiario activador de la adenilato ciclasa (PACAP) (Hannibal., 2002).

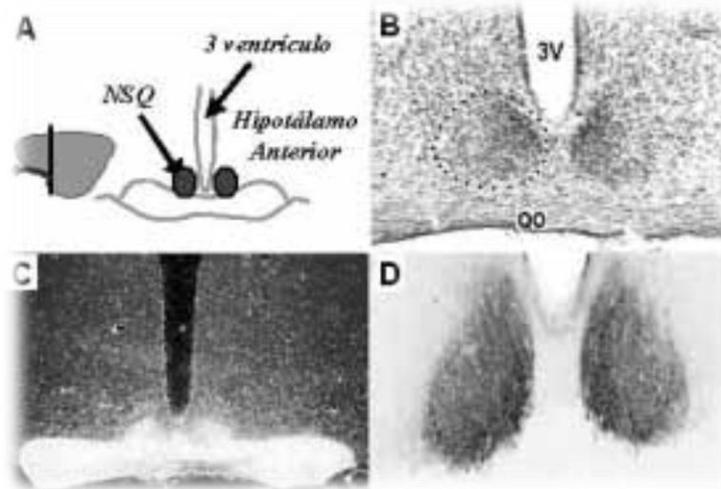


Figura 2. Localización y características del núcleo supraquiasmático (NSQ) en la rata. **A)** Esquema de un corte coronal del hipotálamo que muestra las relaciones anatómicas del NSQ, el nivel del corte está indicado en la vista lateral del cerebro. **B)** corte histológico teñido con la técnica de Nissl, las líneas punteadas indican el NSQ del lado derecho. 3V, tercer ventrículo. QO, quiasma óptico. **C)** Autorradiografía obtenida 48 h después de la inyección de 3H-prolina en la cámara vítrea del ojo, se puede observar las terminales de la vía retino hipotalámica en el NSQ. **D)** Corte horizontal del hipotálamo a la altura del NSQ, que muestra una doble tinción con inmunohistoquímica para detectar vasopresina (células claras) y péptido intestinal vasoactivo (VIP; células oscuras). Se puede observar claramente la distribución de las neuronas con vasopresina en la región dorso lateral del NSQ, mientras que las neuronas con VIP en la región ventromedial. (modificado de Aguilar-Roblero y Cols. 2004).

Como era de esperarse, la sección selectiva del tracto retino-hipotalámico impide la sincronización de los ritmos circadianos al ciclo de iluminación ambiental sin afectar la visión espacial. Algunas fibras colaterales del TRH proyectan bilateralmente a una región del cuerpo geniculado lateral del tálamo llamada “hojuela intergeniculada (IGL)”. A partir de la hojuela se origina otra aferente al NSQ denominada tracto geniculo-hipotalámico (TGH). Otras aferencias al supraquiasmático se originan del complejo del rafé (NR) y el núcleo paraventricular del tálamo (PVT). Tanto la IGL como el NR proyectan a la región VL del NSQ con fibras que contienen respectivamente neuropéptido-Y y serotonina. Estas aferentes también participan en ajustar el inicio del ritmo de actividad locomotora con el inicio de la oscuridad. También se ha propuesto que la IGL puede ser un relevo, junto con el PVT, para transmitir información de índole sensorial diferente a la luz, como pueden ser ruidos, temperatura o movimiento. A través de estas vías se posibilita que diversos estímulos también puedan ejercer influencia como sincronizador de los ritmos circadianos.

La capacidad de generar el patrón circadiano de actividad es inherente a cada una de las neuronas del NSQ, aunque las interacciones sinápticas dentro del núcleo parecen participar hasta cierto grado en el acoplamiento de los osciladores individuales (Aguilar-Roblero y Cols., 1994).

1.7. Papel de la glándula pineal y la melatonina en el sistema circadiano.

La glándula Pineal (GP) transmite información referente al fotoperiodo del medio ambiente y los ritmos circadianos a las diferentes glándulas endócrinas y a diversas estructuras cerebrales. Dicho proceso se efectúa a través de la modulación funcional tanto del eje hipotálamo-hipófisis como por efectos directos sobre diversos órganos blanco. Actualmente se acepta que la GP funciona como un transductor neuroendocrino, en cuanto a que responde a impulsos nerviosos con la síntesis y secreción de la hormona denominada melatonina (Cassone y Cols., 1993). La melatonina se libera hacia la circulación, y actúa primariamente en el SNC, particularmente a nivel del NSQ. Es a este nivel que la melatonina afecta el período oscilatorio del reloj circadiano y afecta los ritmos reproductivos, el control de la síntesis y liberación de melatonina por la GP depende principalmente de su inervación simpática.

La actividad de la GP es regulada por el fotoperiodo, la secreción de melatonina ocurre exclusivamente durante la fase de oscuridad. De tal forma que el alargamiento o acortamiento del día tiene consecuencias en la duración de la fase de secreción de melatonina, mientras que en animales en condiciones experimentales donde han sido mantenidos en luz continua (L-L) presentan una inhibición casi completa de la secreción de esta hormona. En sujetos experimentales que se mantienen en oscuridad continua (D-D), no se observan valores constantes de melatonina sino que se observa una secreción con un patrón circadiano. (Koping y Cols.1961).

1.8. Sincronización de los ritmos biológicos.

Los ritmos biológicos tendrán relevancia adaptativa siempre y cuando se presenten en concordancia con los ciclos ambientales. Para ello se requiere la sincronización del reloj biológico con las señales externas. Estos factores externos capaces de reajustar el ritmo de un individuo con las variables internas se denominan sincronizadores.

Específicamente, la sincronización puede definirse como la coordinación entre el tiempo externo (oscilaciones geofísicas ambientales) con el tiempo interno (oscilaciones de los relojes biológicos circadianos); es un proceso biológico en el cual el tiempo endógeno del reloj circadiano se ajusta al de una señal periódica externa. (Roenneberg y Cols., 2003).

El fenómeno de sincronización requiere que el sistema circadiano (el reloj o sus osciladores) establezca una relación de fase específica con el sincronizador, para lo que es necesaria la sensibilización de los osciladores endógenos a señales ambientales específicas y la habituación a otras. Para que el oscilador sea funcional, estas señales de tiempo deben de ser periódicas y predecibles para el organismo, lo que provoca un ajuste o sincronización del periodo del sistema circadiano al de la señal externa, llamada zeitgeber (Ángeles 2004). La palabra zeitgeber fue utilizada por primera vez en 1929 por August Forel, y refiere al evento capaz de imponer periodo y fase al oscilador o reloj endógeno, es decir sincroniza los ritmos dependientes del reloj (Pittendrig, 1981).

En ausencia de una señal de sincronización, (ciclo L-D), que resulta de condiciones de D-D, el ritmo de la actividad locomotora de la rata tiene un periodo poco mayor de 24 horas, mientras que al imponer un ciclo externo de alternancia L-D de 12/12 horas el ritmo de actividad tendrá un periodo de 24 horas y estará sincronizado en la fase de inicio de la actividad locomotora (Escobar y Cols., 2001).

La sincronización se distingue de otros fenómenos como el aprendizaje porque actúa en ausencia de otras señales externas que le indiquen al organismo la llegada del sincronizador, se sigue presentando la actividad cíclica endógena aún en ausencia del estímulo y presenta límites determinados de sincronización (Moore y Cols., 1982; citado en Shettleworth, 1998).

1.8.1. Sincronización fótica y no fótica.

Uno de los sincronizadores que más impone es el ciclo L-D. La acción de los sincronizadores sobre los ritmos se puede comprobar, manteniendo constante el entorno. En esta situación normalmente no desaparece el ritmo biológico, sino que se presenta en lo que se denomina libre corrimiento, es decir, el ritmo no depende ya del sincronizador externo sino que es generado intrínsecamente por el organismo, demostrando su carácter endógeno. En esta situación el ritmo suele desfasarse del ciclo del sincronizador, pero es reajutable cuando se restituye la acción del sincronizador. (Mendoza y Cols., 2004).

Moore y Lenn 1972 y por su parte Hendrickson en el mismo año, utilizaron trazadores bioquímicos para describir la vía por la que la información luminosa entra por la retina hasta el NSQ. Klen y Moore en 1979, también demostraron que las aferencias TRH eran independientes de la vía visual debido a que la sección del quiasma óptico, sin lesionar el TRH, incapacitaba a la rata para la visión, pero no afecta la sincronización, mientras que la lesión del TRH produce la incapacidad de sincronización del organismo, pero no genera pérdida de ritmicidad endógena. (Jhonson y Cols., 1988; cit. en Meijer, 2001).

No obstante, existen otro tipo de estímulos cíclicos que también son capaces de modificar la expresión rítmica de distintos parámetros del organismo como la actividad locomotora, temperatura y niveles hormonales, afectando la actividad del NSQ. A los estímulos que son capaces de sincronizar la actividad del NSQ y por lo tanto todas aquellas conductas o parámetros fisiológicos rítmicos dependientes de este núcleo y que no son luminosos, se les llama No-Fóticos. Algunos estímulos de este tipo pueden ser ciclos como la temperatura ambiental, el alimento en condiciones especiales, fármacos o la propia actividad física (Mendoza y Cols., 2004).

Los estímulos no fóticos generalmente se denominan sincronizadores secundarios o débiles, y adquieren mayor intensidad en ausencia del ciclo L-D y son capaces de influir sobre el ritmo endógeno del organismo y la actividad del NSQ sólo en condiciones de D-D (Mrosovsky, 1996).

1.9. Cronobiología y desincronización.

El humano como uno más de los organismos que viven en un medio fluctuante es vulnerable a distintas condiciones que pueden alterar su maquinaria cronobiológica, cuando el orden cronobiológico es alterado por la pérdida en la sincronización, esta se puede clasificar en una desincronización externa o desincronización interna de acuerdo al origen del factor (externo o interno) (Escobar y Cols., 2001).

La desincronización externa es la pérdida de coherencia entre las fluctuaciones del medio externo y las oscilaciones generadas por el reloj biológico, la cual es consecuencia de una alteración o daño de las vías de sincronización o por una alteración de la señal de sincronización, esto puede producirse, por ejemplo, como resultado de un viaje a través de varios husos horarios. Dependiendo de la dirección del viaje, se genera un adelanto o un retraso de las horas, lo cual produce una pérdida de relación entre la hora geográfica del lugar y la función de los efectores. Este fenómeno es conocido como «Jet-lag». Otro ejemplo de este tipo de desincronización, se debe a una incongruencia entre las actividades del individuo y las señales de sincronización externas. Tal es el caso de los trabajadores nocturnos, quienes se ven forzados a trabajar de noche y a dormir de día. Las consecuencias pueden ser: irritabilidad, trastornos gastrointestinales, enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico y aumento en la incidencia de cáncer. Este problema lo comparten varios de los trabajadores que son sometidos a horarios rotatorios de trabajo, entre ellos los estudiantes de postgrado en medicina (residentes), enfermeras, policías, etc., en estos casos, la fatiga y las alteraciones del ciclo sueño-vigila, propician errores laborales y de eficacia en el trabajo, que pueden tener consecuencias graves. (Marques y Cols., 2003 y Lamberg, 2000).

La desincronización interna es la pérdida de relación entre las oscilaciones del reloj y el resto del organismo. Se plantea que existe una correcta relación entre el reloj y el medio externo, pero una alteración en la salida de señales rítmicas hacia el resto del organismo o bien en la transmisión de éstas a los efectores conduce a una alteración interna en la sincronización y en el ritmo biológico. Esta condición anormal también puede ser desarrollada en pacientes con enfermedades crónico-degenerativas como la diabetes, la hipertensión y el cáncer.

Recientemente se ha estudiado la contribución del sistema nervioso autónomo en la comunicación neuronal de los NSQ con la periferia. Cuando ocurre una alteración en el sistema nervioso autónomo que afecte al reloj biológico, puede resultar un estado de desincronización interna y pérdida de la coherencia entre los ritmos de diferentes variables, entre ellas la glucosa, la insulina y el cortisol (Cardinalli y Golombek, 1992).

Cuando se pierde la periodicidad de la luz y esta se presenta en forma continua y constante, se ha señalado la desincronización por un ciclo de L-L constante o por ausencia total de luz o D-D (Gruart y Cols., 2002).

1.10 Desarrollo retiniano e Investigaciones neonatales.

Se sabe que durante el periodo de gestación del feto, la estimulación auditiva, los estímulos táctiles, quinestésicos y sensoriales, los ritmos circadianos y la información externa la provee la madre. Lo anterior sucede tanto en la rata como en el humano (Dowling, 1987).

El primer elemento que se da durante el desarrollo del ojo es la arteria hialoidea, que se forma a partir de células mesodérmicas y está inmersa en el vítreo primario. Esta arteria se empieza a formar en la tercera o cuarta semana de gestación y termina de desarrollarse alrededor de la novena semana de gestación, extendiéndose desde el futuro nervio óptico al cristalino en formación. La arteria hialoidea nace de la arteria oftálmica. Más tarde en el desarrollo desaparecerá y solo persistirá una porción como arteria central de la retina. En la semana 16 desde la arteria hialoidea comienzan a formarse vasos que avanzan desde el nervio óptico hacia la periferia, la retina es funcional en la semana 21 alcanzando la ora serrata nasal aproximadamente en la semana 36 y la temporal en la semana 40. (Saravia 2007).

En la rata la morfología de la retina es muy similar a la del humano y las capas que contienen son prácticamente las mismas (Dowling, 1987).

En el momento de nacer, la retina, aunque no desarrollada por completo, posee todos los elementos neurales -retinoblastos no diferenciados-, que se convertirán en las células componentes de la retina (fotorreceptores, células gliales, amacrinas, ganglionares, bipolares, horizontales). El desarrollo postnatal consistirá en la diferenciación y distribución en capas de todas estas células.

La retina puede dividirse macroscópicamente en: externa e interna (o neural).

1) Externa: es el epitelio pigmentario, su núcleo es ovalado, contiene gránulos de melanina en su citoplasma, con microvellosidades que albergan la porción externa de los conos y bastones. Tiene fuertes uniones llamadas ocludens, su superficie presenta procesos digitados que los relaciona con los fotorreceptores, su función es la de actuar como barrera hemato-retiniana para regular las sustancias que llegan por sangre, además fagocita restos de fotorreceptores y es el almacén de la vitamina A. Sus funciones son: nutrición, absorción de los rayos luminosos y fagocitosis de los segmentos internos que se van liberando de los conos y bastones.

2) Interna: se encarga de la recepción luminosa y elaboración del estímulo. Se encuentra anclada sólo a nivel de la papila (unión de fibras nerviosas retinianas), y a nivel de la orta serrata. No hay conexión anatómica entre el epitelio pigmentario y la retina neural, por lo que se facilita el desprendimiento. (Saravia, 2007).

Microscópicamente, la retina posee 8 capas. De la más externa a la más interna (o de atrás para adelante): (Sobrado y Cols. 2007).

1) Capa Fotorreceptora (CF): constituida por los segmentos externo e interno de los conos y los bastones. Los bastones sirven para la visión nocturna y existen de un solo tipo. Los conos sirven para la visión diurna y son de tres tipos: large/L-rojo, médium/M-verde o small/S-azul. Ambos fotorreceptores se forman por un segmento externo, encargado de la transducción. En el segmento interno se alojan los organelos, mientras que el cuerpo contiene al núcleo. Poseen además una prolongación interna que puede ser en esférula (bastón) o pedicelo (cono). El segmento externo del bastón básicamente se forma por pliegues de la membrana celular, que forman discos continuos, de forma apilada (uno sobre otro). Aquí se ubica una proteína "opsina" y también otra molécula, "rodopsina". Ambas van a tener un rol fundamental en la transducción de la señal. En el cono, estos discos no son continuos, sino que están envueltos por la membrana plasmática. Funcionalmente, los bastones son más sensibles a la luz que los conos, se encuentran por toda la retina y son más importantes para la percepción visual cuando la luz es de baja intensidad, como ocurre en el crepúsculo y al amanecer. Son receptores de baja frecuencia (380 a 600 nanómetros de longitud de onda). Los conos no son tan sensibles a la luz como los bastones, y son funcionalmente más importantes cuando la intensidad luminosa es alta, como sucede durante el día (receptores de alta frecuencia, 450 a 780 nanómetros). Los conos son también los únicos responsables de la visión del color, la fovea, continúan desarrollándose hasta los 4 ó 5 años. Es precisamente esta inmadurez de la retina y especialmente de la fovea, la responsable de una baja agudeza visual.

2) Capa o membrana limitante externa (CLE): corresponde a la zona apical de las células de Müller.

3) Capa nuclear o granulosa externa (CNE): formada por los cuerpos y núcleos de conos y bastones.

4) Capa plexiforme externa (CPE): zona de sinapsis entre fotorreceptores y células bipolares. Además aquí se encuentran unas interneuronas llamadas células horizontales.

5) Capa nuclear o granulosa interna (CNI): formada por los núcleos de las células bipolares, horizontales, amacrinas y de Müller.

Células Horizontales. Pueden ser de tipo 1 o de tipo 2, dependiendo del número de sinapsis que establezcan con los fotorreceptores.

Células de Müller: Es una célula glial altamente ramificada. Se extiende desde la capa 8 a la capa 2, posee función estructural y de protección (envuelve enteramente a cada uno de los elementos fotosensibles principales de la retina) y nutrición. Esto es importante porque la retina interna no tiene irrigación.

Células bipolares. Las hay magnocelulares (que se relacionan con los conos) y parvocelulares (que se relacionan con los bastones).

6) Capa plexiforme interna (CPI): capa multisináptica, formada por las conexiones entre células bipolares, ganglionares y amacrinas (que poseen muchas proyecciones).

7) Capa de Células Ganglionares (CG). Las células ganglionares son las únicas células del sistema visual a las que se les podría considerar como neuronas propiamente, son las únicas que poseen proyecciones hacia el diencefalo y mesencefalo. Además dan origen a los núcleos de axones que se organizan de forma radial en la superficie vítrea de la retina para finalmente confluir en el disco del nervio óptico, fuera del ojo la totalidad de las fibras se juntan para formar el nervio óptico.

8) Capa o membrana limitante interna (CLI): límite basal de las células de Müller. (Moore y Cols. 2004)

A lo largo de la mayor parte de la retina, los rayos de luz atraviesan las capas retinianas y las células ganglionares, bipolares y ocasionalmente amacrinas y horizontales antes de alcanzar los fotorreceptores. Aunque, membranas, núcleos y células son relativamente transparentes pueden, sin embargo, provocar alguna

distorsión de los rayos de luz. La fovea (de 0,4 mm) situada en el centro de la retina es la zona donde se logra la mayor agudeza visual. Está especialmente diseñada para minimizar la distorsión de la luz, ya que en ella, las células ganglionares y bipolares están colocadas hacia un lado permitiendo el acceso directo de los rayos luminosos a los conos, puesto que los bastones se encuentran fuera de la fovea se halla interrumpida la salida de los axones de la capa celular ganglionar en su camino hacia el cerebro. Este punto, localizado en posición anterior a la fovea, es el disco óptico; origen del nervio óptico (I par craneal), nervio muy rico en axones (existen más axones en ambos nervios ópticos que en todas las raíces dorsales de la médula espinal).

En el bebé recién nacido a término (que concluye las 39 o 40 semanas de embarazo) o prematuro (pretermino) continúa el desarrollo de forma postnatal y el medio ambiente incrementa sus múltiples estímulos sensoriales y su influencia circadiana (Als y Cols., 1986; Madrid y Cols., 2006). En este sentido, la luz tiene efectos importantes para la salud y el desarrollo.

Un ambiente de L-L ha estado relacionado con estrés en los infantes, manifestándose un incremento en los niveles de actividad locomotora, decrementando el sueño, produciendo arritmicidad y bradicardia (Mirmirian, 2000). Las primeras investigaciones y reportes sobre la influencia de la luz en el desarrollo fisiológico temprano, surgió en los años de 1960 en las Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN), en esos años las UCIN eran una sala moderadamente iluminada junto a una guardería principal, con un número pequeño de niños. Al paso del tiempo las habitaciones se hicieron más luminosas y amplias en gran medida por la necesidad de mantener un número mayor de niños prematuros y enfermos en observación constante y por la suposición de que un ambiente con luz constante (las 24hrs) era bien tolerado por los lactantes mientras se encontraban en la UCIN, en ese momento se utilizaban técnicas de monitoreo que proveían observación y registro constante sobre cuándo y cuánto sonreían los infantes se movían o lloraban, eran sólo estas variables, las tomadas en cuenta para realizar investigación sobre los infantes prematuros que ingresaban a la UCIN (Miller y Cols., 1995).

A partir de lo anterior surgió entonces la necesidad de investigar si la exposición de los bebés prematuros a los niveles de iluminación excesiva, derivaban en una consecuencia negativa para su desarrollo y si ello se constituía como una desventaja constante al compararse con los bebés que se desarrollaban bajo un ciclo L-D (Miller y Cols., 1996). El primer estudio para examinar los efectos de L-L en los bebés prematuros se llevó a cabo por Mann y sus colaboradores (1986), bebés prematuros y convalecientes fueron divididos en un grupo experimental y un grupo control. El grupo experimental lo componían los bebés prematuros que se mantuvieron bajo L-D 12:12, el grupo control se conformó por bebés en L-L.

Las mediciones diarias, mostraron que los bebés que se encontraban en el grupo L-D, aumentaron su peso corporal en un tiempo más corto que los bebés bajo L-L. Además, presentaron puntuaciones más altas en la escala motora de Brazelton y tuvieron un sueño más profundo, pasaron mayor número de veces por la fase 4 de sueño (REM), en comparación con el grupo L-L. Por lo anterior el tiempo en que daban de alta a los bebés en el grupo L-D se redujo. (Mann y Cols., 1986).

Mirmiran y Ariagno (2000), mostraron alteraciones de los ritmos biológicos y de los estados del sueño en infantes recién nacidos, quienes previamente se habían encontrado bajo un ciclo L-L. Además de efectos negativos en cuanto al aumento de peso y defectos en el desarrollo del nervio óptico.

Ángeles-Castellanos y Cols., en 2010, estudiaron en el Hospital "Juárez de México" a 30 bebés recién nacidos y prematuros con bajo peso al nacer. Estos bebés ingresaron a la unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN) del hospital con el único objetivo de ganar peso, no tenían alguna enfermedad o algún diagnóstico extra, en cuanto ganarán un peso saludable egresaban del hospital. En este estudio los bebés fueron divididos en 2 grupos de 15 sujetos cada uno. El primer grupo se compuso de recién nacidos que se encontraron bajo L-L las 24hrs. (que es el ciclo con el que trabajan todas las UCIN normalmente, con una intensidad de 250 luxes.). El segundo grupo estuvo bajo un ciclo L-D 12:12, para crear esta condición los bebés permanecían en su cuna y sólo se cubría con tela el casco protector de la cuna para crear las 12 horas de oscuridad dejando una intensidad de 21 luxes.

En este estudio se reportó que los bebés bajo un ciclo de L-D, tenían mayor tolerancia al alimento (menos diarrea y vómitos), una mayor tasa de crecimiento y un egreso más rápido del hospital (40 días de diferencia) que los bebés que estaban bajo el ciclo de L-L, implicando un gasto menor para el hospital y para sus familiares. La Vail y Cols. (1992) Investigando agentes neurotróficos en diversos sistemas neurales, estudiaron las retinas de 30 ratas Sprague-Dawley con distrofia retiniana que tenían 3 meses de edad y que desde el momento del nacimiento habían estado bajo un ciclo de L-D (12:12). Tuvieron un grupo control (n= 10) bajo un ciclo de L-D y dos grupos experimentales. El primer grupo experimental (n=10) estuvo bajo condiciones de L-L y el segundo (n=10) también bajo condiciones de L-L pero con la diferencia de que 2 días previos a pasar a condiciones L-L se les había inyectado Factor Neurotrófico derivado del Cerebro. Los 3 grupos estuvieron en esas condiciones durante una semana.

Al extraer y analizar las retinas de las ratas, observaron que en las retinas bajo L-L, se aceleraba el proceso de degeneración de los fotorreceptores, y de las células ganglionares, a diferencia de aquellas que habían estado bajo un ciclo de luz-oscuridad o bajo luz constante las 24 horas pero que previamente se les había inyectado en la retina Factor Neurotrófico derivado del Cerebro.

Proponiendo así que tanto el ciclo L-D como el factor de crecimiento reduce la degeneración de los fotorreceptores y de las células ganglionares producidas por la luz constante en la rata

Más adelante, Hidenobu y Cols., en el 2006, registraron que el 14% de los recién nacidos, nacen con bajo peso, por ello son enviados inmediatamente a la UCIN expuestos a L-L artificial. Hidenobu al utilizar en su investigación ratones transgénicos para PER1: GFB (Hidenobu, 2006.), a los que se les imponía un ciclo L-L, observaron que se interrumpe el desarrollo del sistema circadiano, que los patrones de actividad locomotora eran arrítmicos y que la sincronía en el reloj biológico se interrumpía. Proponiendo entonces que el ciclo L-D es importante para mantener un orden temporal y para el desarrollo del NSQ.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Con base en los antecedentes de la literatura sobre ritmos biológicos y en los estudios sobre la influencia de condiciones fóticas ambientales tanto en recién nacidos humanos como en ratas neonatas, consideramos importante el conocer bajo condiciones aún más estrictas de control experimental, el efecto de la L-L sobre el desarrollo del sistema circadiano y sobre el desarrollo y crecimiento de la actividad locomotora y el peso corporal en animales expuestos a cambios en los ciclos lumínicos durante los primeros días de nacimiento.

3. OBJETIVO GENERAL.

Conocer el efecto de un ambiente de L-L durante los primeros días de nacimiento sobre el desarrollo, actividad conductual y organización citoarquitectónica retiniana de ratas Wistar.

3.1. Objetivos específicos.

Objetivo 1. Conocer el efecto de L-L sobre la ganancia de peso corporal diaria durante los primeros 50 días postnatales y compararla con la ganancia de peso de ratas bajo L-D y D-D.

Objetivo 2. Analizar la actividad locomotora de ratas sometidas a condiciones L-L y compararla con la actividad locomotora ratas control L-D Y D-D durante los primeros 50 días postnatales.

Objetivo 3. Analizar el efecto de L-L sobre la organización citoarquitectonica de la retina de ratas que estuvieron en condiciones de luz constante durante sus primeros 50 días de vida y compararla con la organización citoarquitectonica de la retina de de ratas bajo L-D y D-D.

4. HIPÒTESIS

H₁.- Las ratas mantenidas en condiciones de L-L durante los primeros 50 días postnatales, presentarán menor ganancia de peso corporal, y diferencias en la actividad locomotora con respecto a los grupos de ratas mantenidas en condiciones de L-D (12:12) y D-D.

H₀.- Si las condiciones de luz constante no influyen sobre el desarrollo de las ratas, no se presentarán cambios en la ganancia de peso corporal y actividad locomotora en relación a los grupos de ratas mantenidas en condiciones de L-D (12:12) y D-D.

H₂.- Las ratas mantenidas en condiciones de L-L durante los primeros 50 días de nacimiento mostrarán hipoplasia celular y degeneración en retina.

H₀.- Si las condiciones de luz constante no tienen influencia sobre la retina, las ratas No mostrarán hipoplasia celular y degeneración.

5. MÉTODO.

5.1. Animales.

Para la realización de este trabajo se utilizaron 60 ratas de la cepa Wistar (30 machos y 30 hembras) obtenidas el día de su nacimiento (P0) con un peso inicial aproximado de 4.09 ± 0.10 gramos. Las ratas se obtuvieron del bioterio general de la Facultad de Medicina de la UNAM y fueron mantenidas en el bioterio del Departamento de Anatomía de la propia Facultad, en cajas habitación de acrílico (50x30x20) en condiciones de temperatura y humedad controladas.

Para la alimentación inicial de las ratas recién nacidas se emplearon 6 ratas madres lactantes (nodrizas) con excelentes condiciones de salud, las cuales amamantaron a las crías durante los primeros 23 días, las ratas nodrizas tuvieron un peso de entre 250 y 300 gramos., estas ratas fueron de la misma cepa y estuvieron bajo un ciclo de L-D 12:12, donde el prendido de luz fue a las 6:30 horas. (Zeitgeber time, ZT0) y el apagado a las 18:30 horas (ZT12).

5.2. Materiales e instrumentos.

18 cajas habitación de acrílico (50x30x20).

Sistemas de registro de actividad locomotora (SPAD).

Microscópio Óptico Olympus Bx41.

Balanza ACCULAB de 3500 mg.

Criostato LEICA 1850

Material quirúrgico.

Hojas de registro de datos.

Colorantes y reactivos para la técnica histológica de Hematoxilina-Eosina.

Eosina Azulosa 45400 Hycel de México y Hematoxilina 75290 Mallinckrodt.

Computadora personal y software para análisis de datos (MATLAB)

5.3. Procedimientos.

5.3.1. Diseño experimental.

La presente investigación es un estudio cuantitativo, longitudinal de grupos independientes, para ello se obtuvieron dos grupos control (L-D y D-D) y un grupo experimental (L-L) compuesto por 10 ratas hembras y 10 ratas machos Wistar en cada uno, de acuerdo a las siguientes condiciones.

Grupo 1 (n= 20). Las ratas estuvieron en un ciclo de luz-oscuridad (L-D) (12:12), donde el prendido de luz será a las 6:30 horas (ZT0) y el apagado a las 18:30 horas (ZT12).

Grupo 2 (n= 20). Las ratas estuvieron en condiciones de oscuridad constante (D-D).

Grupo 3 (n=20). Las ratas estuvieron en un ciclo de luz constante (L-L). (Figura 3)

Durante los primeros 23 días las ratas recién nacidas fueron alimentadas por ratas lactantes mantenidas en un ciclo de luz oscuridad 12:12. Cada rata lactante alimento a 10 ratas recién nacidas.

Para lograr el ciclo luz-oscuridad en las ratas madre, estas pasaron 12 horas con un grupo L-L y 12 horas con el grupo D-D. Las madres de los grupo L-D se cambiaron únicamente de caja mantenidas en el ciclo luz oscuridad 12:12, el prendido de luz fue a las 6:30 am (ZT0) y el apagado a las 18:30 horas (ZT12).

Después del día 23 (día del destete), las ratas se mantuvieron con libre acceso al agua y alimento (Rodent Laboratory Chow 5001).

A partir del día 23 (día del destete), las ratas fueron separadas de la rata madre y fueron divididas en hembra y macho manteniendo la condición en la que se encontraban de acuerdo al grupo. El día 23 las ratas fueron destetadas, estuvieron bajo el mismo ciclo ambiental y tuvieron libre acceso al agua y al alimento hasta el último día del registro experimental (día 50), además después de la etapa de amamantamiento se registró diariamente el alimento que consumían las ratas con el fin de saber al finalizar el estudio si existían diferencias en la ingesta de consumo en cada uno de los grupos después de ser separados de las ratas lactantes.

El día 50 se obtuvo la grasa peritoneal con el fin de saber si la ganancia de peso se correlacionaba con la cantidad de grasa en las ratas.

El manejo y trato de animales se realizó bajo las normas de uso de animales de experimentación según el decreto de ley de protección a los animales del Distrito Federal, publicada en la Gaceta Oficial del Distrito Federal, 26-02-02. El cuarto de registro donde se mantuvieron los animales durante el experimento se encontró aislado con una temperatura constante de 21 a 23 °C aproximadamente, un sistema de control de iluminación y un ruido blanco constante, esto con el objetivo de evitar cualquier estimulación externa que pudiera dar una señal temporal a las ratas.

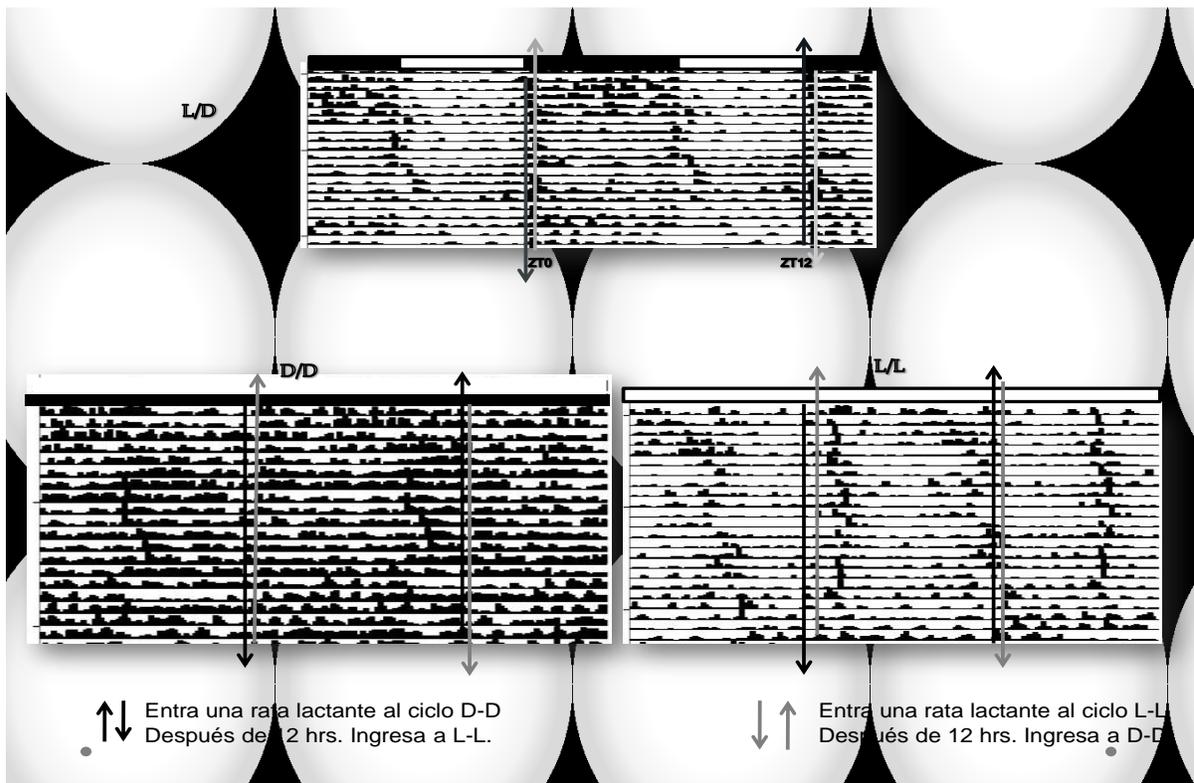


Figura 3.- Esquema del diseño experimental, donde ZT0 en el grupo L-D representa la hora en que se enciende la luz (06:30 horas.) y ZT12 la hora en la que se apaga (18:30horas) para el mismo grupo, las ratas lactantes permanecieron bajo el ciclo L-D.

En el grupo L-L la luz permaneció constante y en el grupo D-D la oscuridad fue constante, en este caso las ratas lactantes alternaban 12 horas con un grupo L-L y 12 horas con un grupo D-D para lograr un ciclo L-D 12:12.

5.3.2. Cuantificación del peso corporal.

Las crías fueron pesadas todos los días a la misma hora (06:30 am) desde el momento del nacimiento y hasta el día 50. Se obtuvo el promedio de cada uno de los grupos (L-D, D-D y L-L) desde el día 1 hasta el día 23 y se graficó (esta etapa fue nombrada fase de amamantamiento) y desde el día 23 al día 50 y se graficó (esta etapa fue nombrada fase post-amamantamiento). El día 50 se obtuvo el peso y promedio de cada uno de los grupos para observar las diferencias que existían entre ellos y después se sacrificó a cada uno de los animales.

5.3.3 Consumo de alimento

Después de la etapa de amamantamiento se pesó diariamente y a la misma hora el alimento que consumían las ratas. El último día se realizó un promedio de los datos de cada uno de los grupos para corroborar si existían diferencias en la ingesta de consumo de alimento en las diferentes condiciones y después se graficó.

5.3.4. Obtención de tejido.

El día 50 se sacrificaron las ratas, se anestesiaron con una sobredosis de pentobarbital (0.065mg/kg), (Barbital 65mg/ml), y fueron perfundidas a través del ventrículo izquierdo del corazón hacia la arteria aorta con aproximadamente 150 ml de solución salina isotónica al 0.9% seguido de 150 ml de paraformaldehído al 4.0% en buffer fosfato (PBS, 0.1 M, con un PH de 7.2). Se extrajeron los cerebros y los ojos con ayuda de instrumental quirúrgico y se post fijaron en paraformaldehído al 4.0% durante un hora. Posteriormente los tejidos fueron almacenados en sacarosa al menos 24 horas para su crioprotección.

5.3.5 Registro de tejido graso

Después de obtener los cerebros y las retinas se realizó una incisión medial en el abdomen, esto con el fin de tener una medición extra. Para extraer la grasa peritoneal, se disecó del omento mayor así como el mesenterio en su totalidad y la grasa de gónadas con pinzas de disección y tijera curva, esto fue considerado como la grasa peritoneal. (Basado en Amaya, 2009).

5.3.6. Registro conductual.

Para el registro de la actividad locomotora se utilizó un sistema de registro conductual automatizado. Las ratas se mantuvieron en cajas individuales equipadas con sensores de presión en la placa inferior que registran el movimiento de los animales. La información se colecto en intervalos de 15 min., por un sistema de adquisición automatizado y una PC esclavo. A través de un sistema de análisis de datos (OmniaIva® basado en Matlab) se elaboraron gráficamente los actogramas. Además se cuantifico la intensidad y organización de conducta locomotora y elaborar gráficas con los promedios de actividad (Perfil de actividad).

El registro de actividad locomotora fue continua durante todo el estudio y se realizó para los tres grupos, se elaboraron perfiles de actividad que se presentarán desde el día 1 hasta el día 23 (fase de amamantamiento) y del día 23 hasta el día 50 (fase post-amamantamiento), representando las mediciones de cada intervalo de quince minutos de la actividad de cada grupo.

5.3.7. Análisis histológico.

El día 50 después de que los tejidos fueron almacenados en sacarosa al menos 24 horas para su crioprotección, los ojos se cortaron en forma longitudinal en un criostato a -19° con un grosor de 10 *micras* y se colectaron 4 series por ojo. Posteriormente se utilizó la Técnica Histológica con los colorantes hematoxilina y eosina, para observar los fotorreceptores y las células ganglionares las muestras fueron vistas y se capturaron imágenes de las muestras con un microscópico óptico (Olympus Bx41), se midieron cada una de las capas de la retina.

5.4 Análisis Estadístico.

Se registraron datos diarios sobre el peso corporal de cada sujeto y el peso del tejido graso obtenido del peritoneo de cada sujeto, se realizaron comparaciones estadísticas entre los 3 grupos, las comparaciones se realizaron con un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para medidas independientes. Además todas las pruebas de ANOVA que presentaron diferencias estadísticamente significativas fueron seguidas de una prueba *post hoc* de tuckey (HSD; honest significant difference). Se consideró un valor estadísticamente significativo con una $p < 0.05$.

Para cada condición y grupo se mostrará la media y el error estándar de la media (S.E.M.) que le corresponde a cada medición.

Los datos derivados de la actividad locomotora de cada grupo fueron mostrados mediante actogramas de doble plot y sus respectivos perfiles de actividad.

En cuanto a los resultados de la histología se analizaron los resultados sobre densidad y morfología. Se realizó la cuantificación de longitud de cada una de las capas presentes en la retina y se realizaron comparaciones estadísticas entre los 3 grupos, las comparaciones se realizaron con un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para medidas independientes, todas las pruebas de ANOVA que presentaron diferencias estadísticamente significativas fueron seguidas de una prueba *post hoc* de tuckey (HSD; honest significant difference). Se consideró un valor estadísticamente significativo con una $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 GANANCIA DE PESO CORPORAL.

A partir del día de nacimiento (P0) se seleccionaron aleatoriamente 60 ratas, las cuales se asignaron a tres grupos (L-D, L-L y D-D) de 20 crías cada uno. Las crías del grupo L-D tuvieron un peso inicial de 6.2 ± 0.10 gramos, las 20 crías del grupo D-D tuvieron un peso inicial de 5.8 ± 0.10 gramos y las crías del grupo L-L iniciaron el experimento con un peso de 5.7 ± 0.07 gramos. Estadísticamente no existen diferencias entre los grupos al comparar el peso inicial (*Figura 4*).

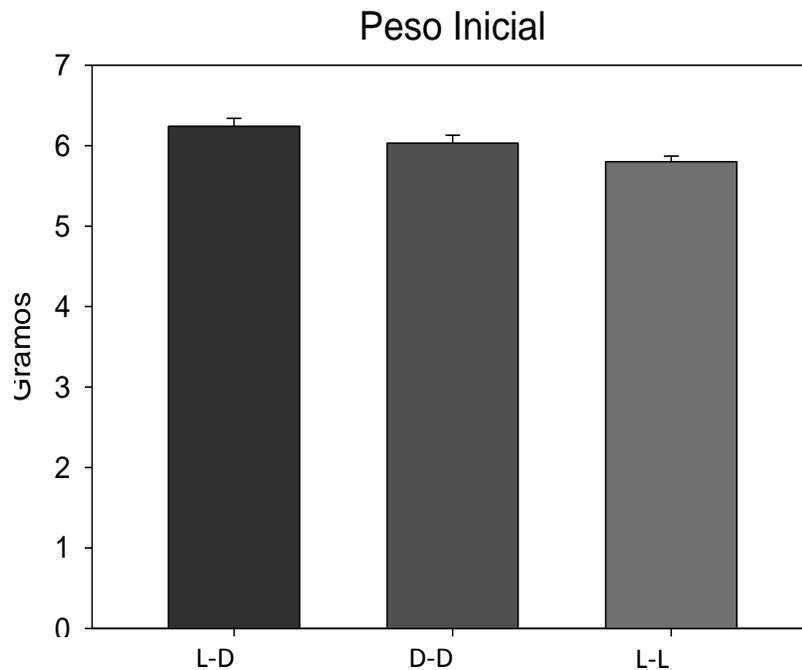


Figura 4. Peso corporal al nacimiento de las ratas. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

6.1.1. Fase de amamantamiento

Una vez asignados a los tres diferentes grupos experimentales, se evaluó el crecimiento a través del registro diario del peso corporal, desde el día P0 hasta el día P50 de edad. En los primeros 23 días correspondientes a la etapa de amamantamiento, pudimos observar que los grupos controles L-D y D-D mostraron un crecimiento constante, y que el crecimiento de D-D fue significativamente diferente del grupo L-D. Sin embargo, pudimos observar que el grupo L-L mostró un

aumento de peso corporal más acelerado que el grupo L-D y que el grupo control D-D, este incremento fue estadísticamente significativo a partir del día P7, el ANOVA de dos vías mostró diferencias significativas en el factor “Grupo” ($F_{(2,1094)}=877.363$; $P<0.0001$), en el factor “DÍAS” ($F_{(20,1094)}=2392.716$; $P<0.0001$) así como en la interacción GxD ($F_{(40,1094)}=22.027$; $P<0.0001$), esto se puede observar en la figura 5.

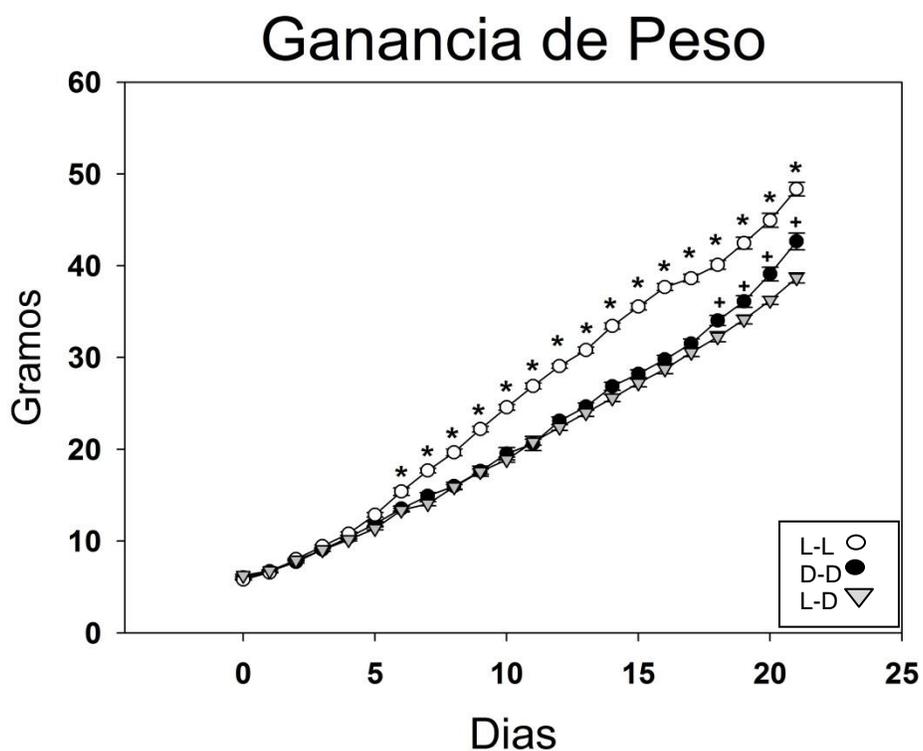


Figura 5. Ganancia de peso corporal desde el día P0 hasta el día P23 (destete). El eje de las abscisas representa los primeros 23 días que las ratas fueron pesadas, mientras que el eje de las ordenadas muestra los gramos que las ratas fueron ganando cada día. A partir del día 7 puede observarse que el grupo L-L tiene una ganancia de peso mayor que el grupo D-D y que el grupo L-D. (*)Representa la diferencia estadística entre el grupo LL vs DD y LD ($p<0.001$). El signo (+) representa la diferencia estadística entre el grupo DD vs LD ($p<0.001$).

6.1.2. Fase post-amamantamiento.

Posterior a la fase de amamantamiento, en la cual las crías fueron separadas de la madre lactante, la diferencia en la ganancia del peso corporal entre el grupo L-L y L-D se conservó. De forma interesante, a partir del inicio de la fase post-amamantamiento el grupo D-D también presenta diferencias con respecto al grupo L-D y al grupo L-L, como puede observarse en la Figura 6a.

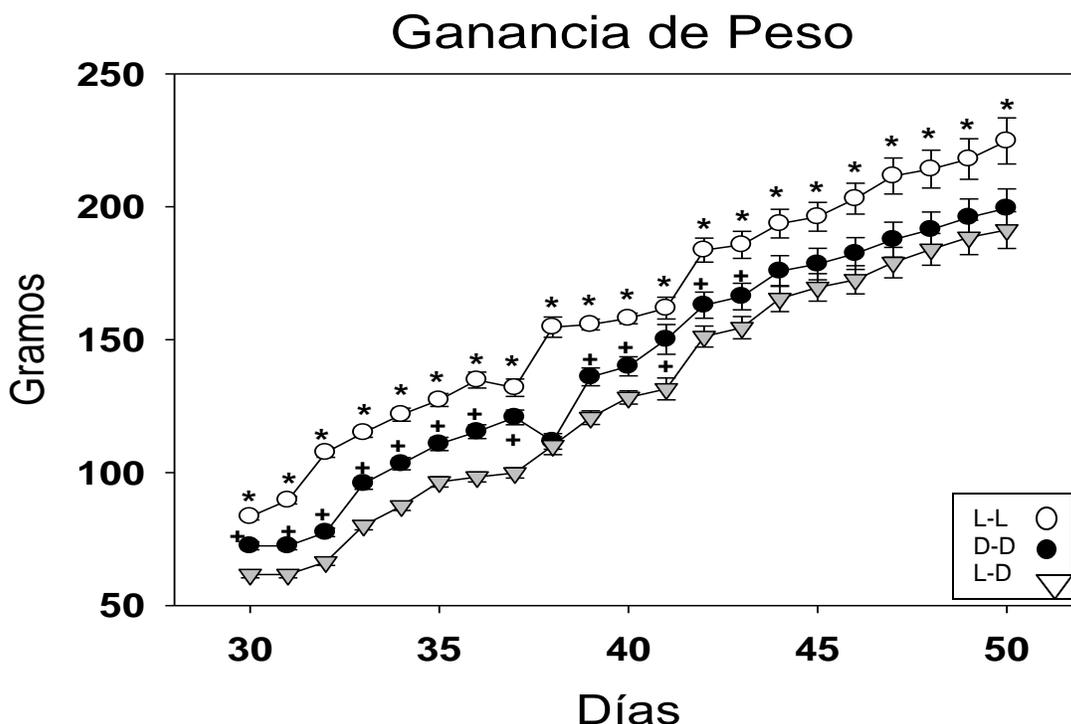


Figura 6a. Últimos 20 días que se registró el peso corporal de las ratas. Después de la fase de amamantamiento el aumento de peso en el grupo experimental L-L se mantuvo hasta el último día de registro. (*) Representa la diferencia estadística entre el grupo LL vs DD y LD ($p < 0.001$). El signo (+) representa la diferencia estadística entre el grupo DD vs LD ($p < 0.001$).

Las diferencias entre los tres grupos se mantuvieron hasta el día P42 aproximadamente (*Figura 6b*), el análisis estadístico del peso corporal para el día 50 presenta diferencias significativas entre los tres grupos ($F_{(2,51)}=5.15; P<0.009$).

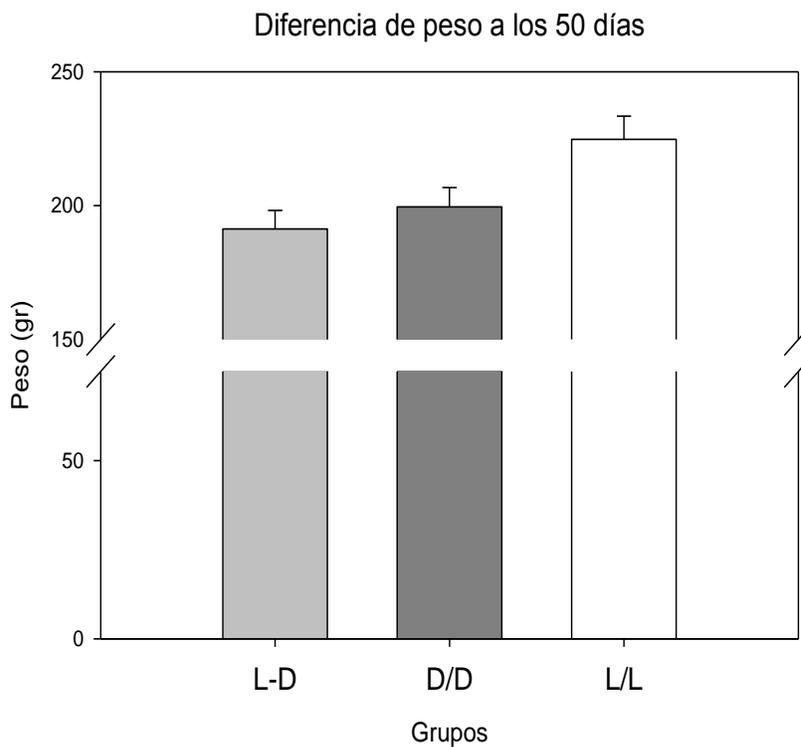


Figura6b. El grupo experimental L-L tuvo un aumento significativo de peso respecto al grupo control L-D hasta el último día del registro de peso.

6.1.3 CONSUMO DE ALIMENTO.

Con el fin de saber si existían diferencias en la ingesta de consumo de alimento en cada uno de los grupos después de la fase de amamantamiento se pesó la comida que consumía cada grupo desde P23 hasta P50.

Posteriormente se obtuvo el promedio de lo que consumía cada uno de los grupos por día y la comparación estadística del promedio entre los tres grupos. La Anova mostro diferencias significativas al comparar el grupo L-D y los grupos D-D y L-L ($F_{(2,1094)}=26.2740$; $P<0.001$). En la figura 6c. Se puede observar que el grupo experimental D-D ingiere mayor comparados con el grupo control L-D, además el grupo experimental D-D es diferente significativamente con respecto al grupo L-D y al grupo experimental L-L. El grupo D-D tuvo un consumo promedio de 170grsmos por día, el grupo L-D tuvo un consumo promedio de 145 gramos por día y el grupo L-L tuvo un consumo promedio de 138 gramos por día.

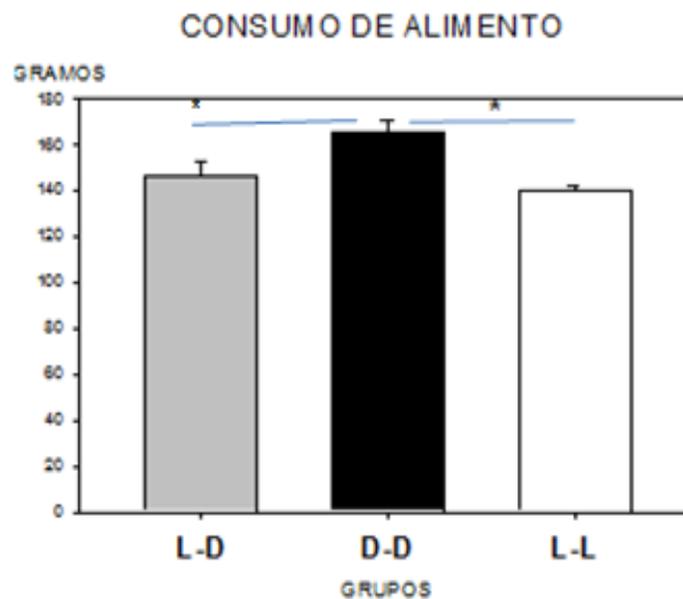


Figura 6c. Consumo de alimento diario después del día del destete (p23). El grupo experimental D-D es diferente a los grupos L-L y L-D. (*)Representa la diferencia estadística entre el grupo experimental D-D con respecto al grupo control L-D y grupo experimental L-L ($p<0.000$).

6.2. CANTIDAD DE TEJIDO GRASO.

Con el fin de tener una medición adicional del crecimiento de las ratas y particularmente analizar si el incremento en el peso corporal se ve acompañado por un incremento en la cantidad de grasa corporal, se realizó un registro de la grasa peritoneal de todos los sujetos. Al día 50 cada animal fue perfundido y posteriormente se realizó una incisión en el abdomen para obtener la grasa peritoneal. Una vez extraída y pesada la grasa corporal, se obtuvo el promedio de esta para cada uno de los grupos, el grupo L-D presentó en promedio 6.2 ± 0.05 gramos de grasa peritoneal, el grupo D-D presentó 4.1 ± 0.05 gramos y el grupo L-L 7.0 ± 0.05 gramos. En la comparación estadística entre los tres grupos la Anova mostró diferencias significativas al comparar el grupo control y los grupos experimentales ($F_{(2,15)}=7.67$; $P<0.005$). En la figura 7 se muestra la cantidad entre el grupo L-L y L-D y entre el grupo L-D y D-D.

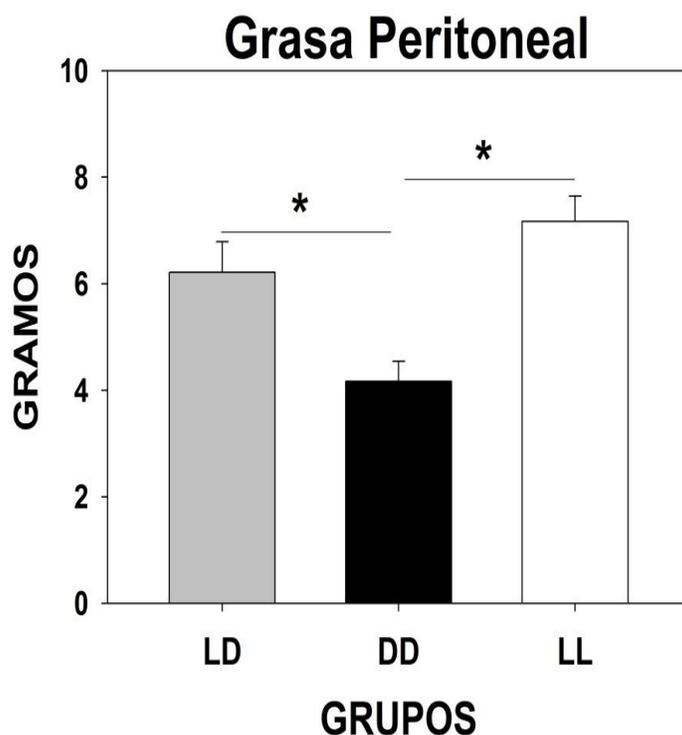


Figura 7. El grupo con menor cantidad de grasa peritoneal fue el grupo D-D. El grupo experimental D-D es diferentes ambos grupos (L-L y L-D). Mientras que L-L y L-D son diferentes entre ellos. (*)Representa la diferencia estadística entre el grupo grupos experimentales ($p<0.005$).

6.3. Actividad Locomotora.

Para analizar el patrón circadiano de la conducta locomotora, se utilizó un sistema de registro conductual automatizado. Se registró la actividad locomotora para cada una de las condiciones L-D, L-L y D-D. La organización de la actividad diaria se muestra en forma actogramas el promedio del grupo y de los días de locomoción en doble representación para poder observar mejor el resultado. Obtuvimos 2 fases de registro conductual: durante el amamantamiento y post- amamantamiento.

6.3.1 Fase de actividad locomotora durante el amamantamiento.

La primera fase (23 días) es un registro de la actividad locomotora de las ratas neonatas junto con la rata madre lactante. En esta fase es evidente que el actograma mejor organizado es el que pertenece al grupo bajo el ciclo L-D, donde se aprecia que la actividad locomotora incrementa durante la noche y disminuye durante el día, considerándose como el ritmo normal en un animal de hábitos nocturnos (Figura 8A). El registro conductual del grupo D-D muestra un incremento en la cantidad de actividad durante las 24 horas con un patrón aparentemente arrítmico. En los perfiles de actividad las ratas bajo el ciclo L-D muestran una mayor concentración de actividad locomotora durante la fase de oscuridad, confirmando lo observado en actogramas. (Figura 8B.) Cabe mencionar que en los perfiles de actividad el eje de las Y representa el número de cuentas con el promedio de la actividad diaria de cada individuo y en eje X el tiempo donde ZT0=6:30 am. Cada punto representa la actividad acumulada en 15 minutos.

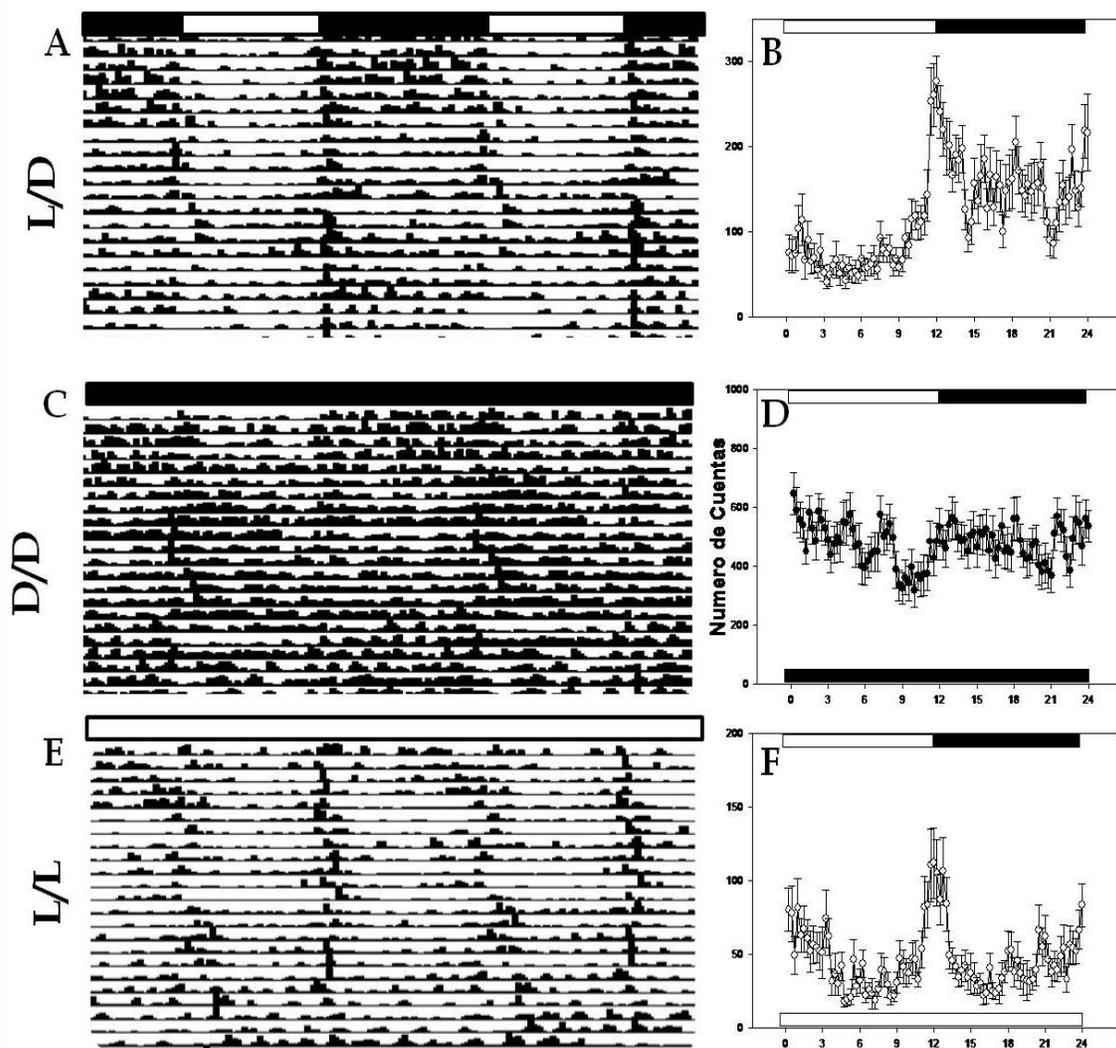


Figura 8. En la parte de la izquierda aparecen los Actogramas y en la parte derecha los Perfiles de actividad de los primeros 23 días. En los perfiles de actividad el grupo L-D es el grupo mejor organizado. Las barras en los actogramas indican el ciclo de iluminación en el que se encontraban los animales, en los perfiles de actividad las barras superiores indican el ciclo de luz/oscuridad en el que debieran encontrarse las crías (L-D) y las barras inferiores el ciclo real bajo el que se encontraban las crías. Cabe señalar que en los perfiles de actividad la escala de las gráficas se ajustó para que cada una de las condiciones fuera visible, en L-D el número de cuentas va de 0 a 300, en D-D como la actividad aumenta el número de cuentas va de 0 a 1000 y en L-L como la actividad disminuye el número de cuentas va de 0 a 200.

6.3.2 Fase de actividad locomotora Post-amamantamiento.

En la segunda fase las crías se mantuvieron en cajas individuales. No aparece una organización locomotora de los D-D y L-L. Mientras que la actividad locomotora bajo un ciclo luz/oscuridad sigue mostrando una organización asociada al ciclo L-D. (Figura 9.)

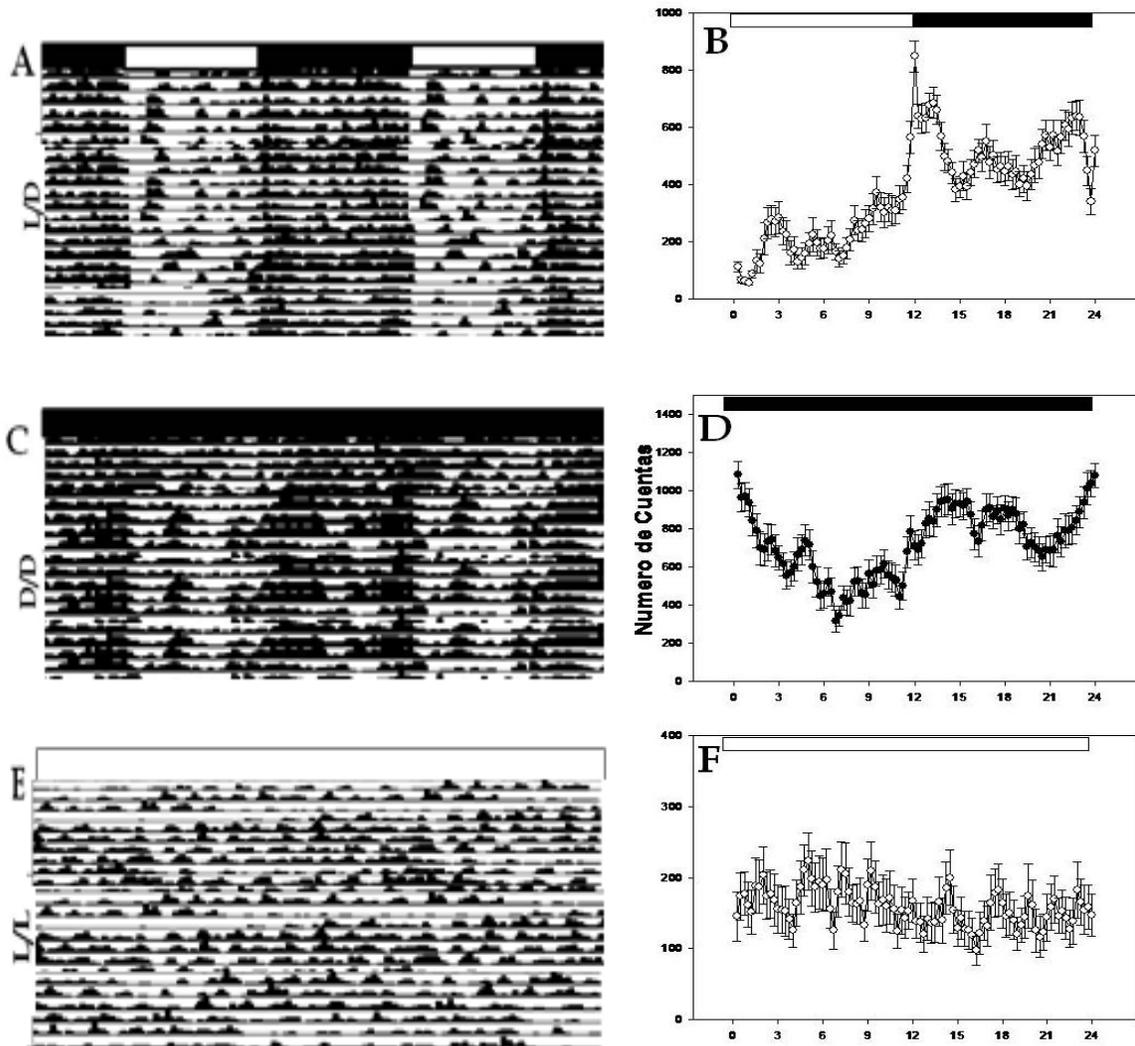


Figura 9. Actogramas y perfil de actividad de las crías solas. En L-L se aprecia una baja actividad locomotora, esta es mayor en D-D y sólo se muestra organizada bajo el ciclo L-D. Cabe señalar que en los perfiles de actividad la escala de las gráficas se ajustó para que cada una de las condiciones fuera visible, en L-D el número de cuentas va de 0 a 1000, en D-D como la actividad aumenta el número de cuentas va de 0 a 1400 y en L-L como la actividad disminuye el número de cuentas va de 0 a 400.

6.4. ANÀLISIS HISTOLÒGICO.

Con el fin de observar si existían modificaciones en las retinas de nuestros animales, el día 50 las retinas se extrajeron y se post-fijaron durante 2 horas. Posteriormente fueron crioprotectados y congelados a -19°C para su corte en secciones de $10\ \mu\text{m}$ con un criostato. Las secciones obtenidas con el criostato se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados y se utilizó la técnica hematoxilina-eosina.

En los resultados la retina que pertenece al grupo bajo L-D no muestra alteraciones en las capas. La capa de fotorreceptores (conos y bastones) se muestra morfológicamente uniforme, la membrana limitante externa no muestra cambios estructurales; la capa nuclear externa muestra un grosor adecuado y con células heterogéneas; la capa plexiforme externa muestra capilares y una correcta alineación; la capa nuclear interna muestra núcleos definidos con algunos capilares entre ellos, la capa plexiforme interna muestra un grosor uniforme y finalmente las células ganglionares muestran heterogeneidad en el tamaño de los núcleos. (Figura 11).

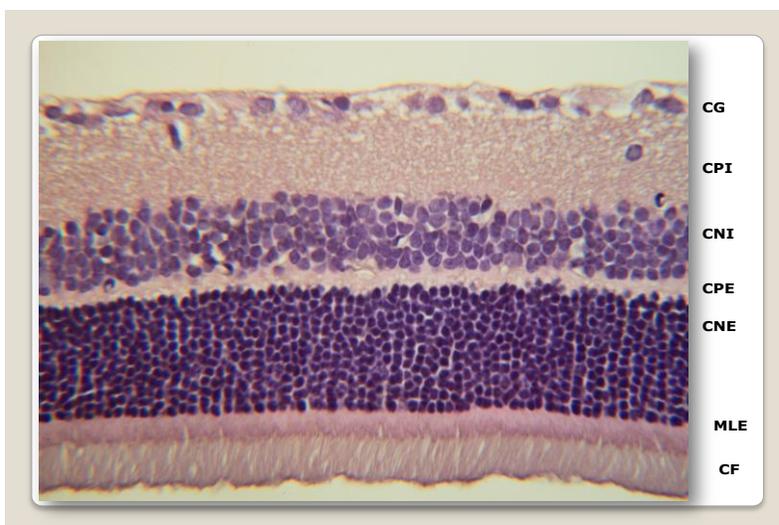


Figura 11. Fotomicrografía transversal de retina de rata del grupo L-D desde el día P0 hasta el día P50. Las capas de la retina (**CF**: capa fotorreceptora, **MLE**: membrana limitante externa, **CNE**: capa nuclear externa, **CPE**: capa plexiforme externa, **CNI**: capa nuclear interna, **CPI**: capa plexiforme interna, **CG**: células ganglionares.) se muestran normales y heterogéneas.

La retina del grupo D-D muestra menor heterogeneidad. La capa de fotorreceptores (conos y bastones) se muestra más amplia que el grupo L-D; la membrana limitante externa no muestra modificaciones estructurales; la capa nuclear externa muestra mayor espacio intercelular a diferencia del grupo control L-D pero con un grosor normal; la capa plexiforme externa muestra capilares definidos; la capa nuclear interna muestra núcleos más grandes y menos teñidos, hay también mayor espacio intercelular a diferencia del grupo control, la capa plexiforme interna muestra un grosor normal y finalmente las células ganglionares muestran heterogeneidad en el tamaño de los núcleos. Igual que en el grupo L-D (Figura 12).

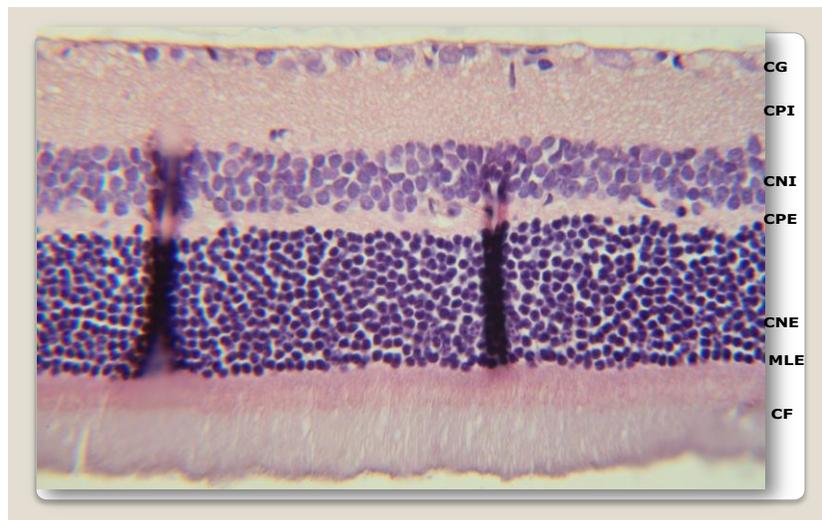


Figura 12. Fotomicrografía transversal de retina de rata del grupo D-D desde el día P0 hasta el día P50. Las capas de la retina son: **CF**: capa fotorreceptora, **MLE**: membrana limitante externa, **CNE**: capa nuclear externa, **CPE**: capa plexiforme externa, **CNI**: capa nuclear interna, **CPI**: capa plexiforme interna, **CG**: células ganglionares. La única diferencia se encuentra en CNE y CNI mostrando mayor espacio intercelular y menos capilares en CPE. *Las líneas negras son dobleces del tejido.

La retina de las ratas del grupo L-L muestra una pérdida o muerte notable de la capa de fotorreceptores (conos y bastones) a diferencias de los grupos L-D y D-D; hay un adelgazamiento de la membrana limitante externa, además de un desplazamiento de la capa; la capa nuclear externa muestra un grosor anormal, vacuolización y menor cantidad de células; la capa plexiforme externa muestra vacuolización y edema; la capa nuclear interna muestra pérdida de núcleos y kariorexis; la capa plexiforme interna se muestra menos eosinofílica y con desorganización comparado con D-D y L-D además de gliosis a expensas de microglía, finalmente las celulares ganglionares reflejan desorganización, degeneración y pignosis además de proliferación de astrocitos. (Figura13).

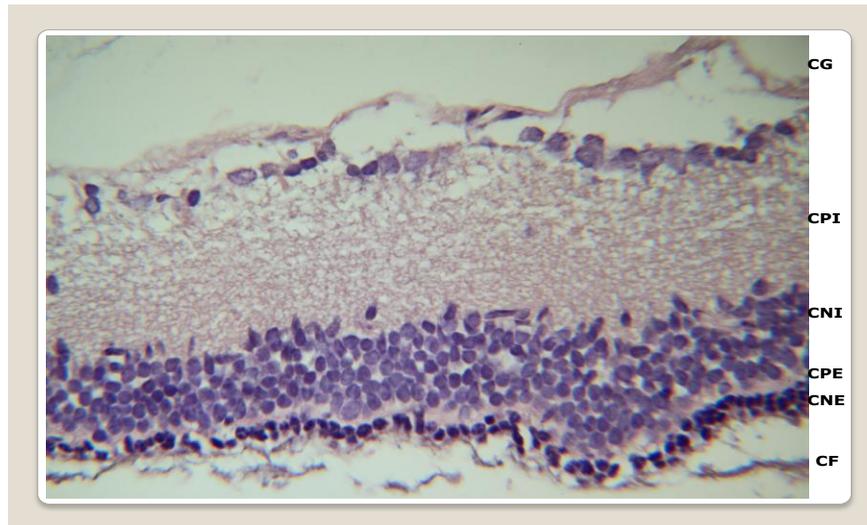


Figura 13. Fotomicrografía de retina de rata del grupo L-L desde el día P0 hasta el día P50. Las capas de la retina que aparecen son: **CF**: capa fotorreceptora, **CNE**: capa nuclear externa, **CPE**, capa plexiforme externa **CNI**: capa nuclear interna, **CPI**: capa plexiforme interna, **CG**: células ganglionares. Puede observarse una degeneración de retina comparado con los grupos L-D y D-D.

Con el fin de tener una medición adicional de las capas de la retina se midió la longitud de cada capa de la retina para cada una de las condiciones.

La comparación estadística entre los tres grupos mostró diferencias significativas en la capa de células fotorreceptoras al comparar los grupos L-D, D-D y L-L ($F_{(2,15)}=9.30$; $P<0.001$), en la capa nuclear externa ($F_{(2,15)}=109.94$; $P<0.001$), en la capa plexiforme externa ($F_{(2,15)}=4.71$; $P<0.025$), en la capa nuclear interna ($F_{(2,15)}=8.86$; $P<0.002$), en la capa plexiforme interna ($F_{(2,15)}=5.23$; $P<0.001$) y en la capa de células ganglionares ($F_{(2,15)}=3.61$; $P<0.005$). En la figura 14 se muestran las diferencias entre el grupo control L-D y los grupos L-L y D-D.

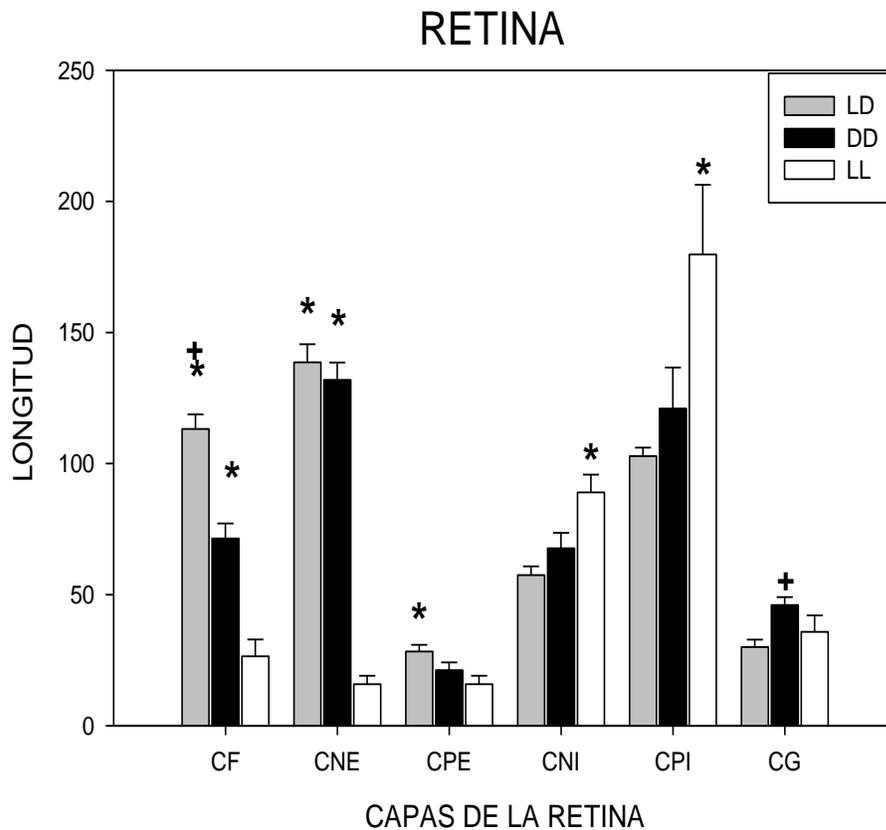


Figura 14. Longitud de las capas de la retina **CF** (células fotorreceptoras), **CNE** (capa nuclear externa), **CPE** (capa plexiforme externa), **CNI** (capa nuclear interna), **CPI** (capa plexiforme interna) y **CG** (células ganglionares) bajo las condiciones L-D, D-D y L-L el día 50. (-) Representa la diferencia estadística entre el grupo LL vs DD y LD ($p<0.001$). El signo (+) representa la diferencia estadística entre el grupo DD vs LD ($p<0.001$).

7. DISCUSIÓN.

7.1. Peso corporal.

De acuerdo a nuestra hipótesis, las ratas mantenidas bajo condiciones de L-L presentarían menor cantidad peso corporal al compararla con los grupos control L-D y D-D.

Los resultados obtenidos de la medición y análisis de la ganancia de peso corporal sugieren que las condiciones ambientales como lo es L-L, tienen efectos diferentes a los esperados, por lo tanto aceptamos la hipótesis nula y rechazamos la hipótesis de investigación.

Nuestros hallazgos no son comparables con los resultados de las investigaciones en humanos; el peso corporal en los neonatos humanos disminuye bajo condiciones L-L, en nuestra investigación a partir de P7 hay un aumento de peso en las ratas bajo condiciones de L-L y esta es significativamente diferente al compararla con los grupos L-D y D-D. Este aumento en las ratas puede deberse a la disponibilidad de la rata lactante para las crías, las ratas lactantes antes de llegar a amamantar a las crías del grupo L-L pasaron 12 horas “activas” con el grupo D-D, por lo que su fase de reposo la pasan con el grupo L-L y este es su periodo natural de “inactividad”. Este amamantamiento no es brindado a los bebés humanos por sus madres, aunque son alimentados cada tres horas al estar en las UCIN.

La mayoría de los estudios que se han hecho para describir aumento de peso en animales, utilizan una dieta alta en calorías y grasas. En un estudio con ratones jóvenes (de entre 4 y 5 semanas después del nacimiento) se evaluó la ingesta de alimento y el peso corporal de los ratones. Los resultados mostraron que los animales ingieren mayor cantidad de alimento alto en calorías bajo la fase de luz bajo que bajo la fase de oscuridad, esta en esta investigación se utiliza una dieta alta en calorías y es por ello que los ratones incrementan de peso (Arble y Cols. 2009). En nuestro estudio las ratas estuvieron bajo la influencia de L-L desde el momento del nacimiento y tienen una diferencia de peso significativa comparada con los grupos L-D y D-D lo que implica mayor cantidad de grasa corporal y el tener una mayor cantidad de grasa corporal convierte a los animales (y a los humanos)

en propensos para adquirir otro tipo de enfermedades como diabetes tipo II y síndrome metabólico.

El que en nuestro estudio las ratas incrementen su peso bajo L-L, pudiera deberse a la modificación de su sistema circadiano natural e incluso pudieran tener alteraciones hormonales, las ratas no pasaron por su fase natural de inactividad, y como se ha mostrado en estudios anteriores la presencia de la hormona melatonina sólo se presenta bajo las primeras horas de oscuridad (Asai y Cols, 2010), este desajuste en el ritmo de melatonina puede estar relacionado con el aumento de peso pero no es comprobable en nuestra investigación.

Por otro lado la ganancia de peso puede ser el resultado de una manifestación indirecta de un proceso de desincronización externa, como sucede en trabajadores nocturnos donde existe una pérdida de la relación de fase estable de los ritmos circadianos y una alimentación durante la fase de reposo (fase de luz), provoca un incremento del peso corporal (Salgado-Delgado 2010).

7.1.1 Cantidad de tejido graso.

Para conocer si las crías tenían una diferencia de grasa corporal y esta coincidían con el aumento de peso, analizamos la cantidad de tejido graso de las ratas mantenidas bajo condiciones experimentales de L-L y las comparamos con los grupos control L-D y D-D.

Las crías muestran un aumento significativo de tejido graso al compararlas con el grupo L-D y D-D, así como peso corporal, sin embargo muestran un menor consumo de alimento promedio.

En estudios previos Amaya y Escobar (datos no publicados) proponen que la relación de peso y talla se mantiene hasta la edad adulta. Lo anterior nos hace sugerir que crías con un porcentaje alto de grasa corporal tienen mayor probabilidad de ser ratas adultas obesas y al ser obesas incrementa la probabilidad de adquirir malestares gastrointestinales, enfermedades cardiovasculares, diabetes y síndrome metabólico.

7.2 Actividad locomotora.

De acuerdo a otra de nuestras variables independientes de nuestra primera hipótesis, las ratas mantenidas bajo condiciones experimentales de L-L presentarían cambios en la actividad locomotora al compararse con los grupos control L-D y D-D. Los resultados obtenidos de la actividad locomotora muestran que bajo un ciclo de L-D la mayor actividad en las ratas se presenta durante la fase de oscuridad tanto con la presencia de la rata lactante como después del amamantamiento, esto quiere decir que su sistema circadiano funciona adecuadamente, como lo muestran los antecedentes.

Durante el ciclo D-D las ratas tienen mayor actividad locomotora tanto en la fase de amamantamiento como en la fase de post- amamantamiento cuando se compara con el grupo L-D y L-L. Los resultados nos ayudan a confirmar que las ratas al estar en actividad constante necesitan y consumen mayor cantidad de alimento sin embargo tienen una menor cantidad de grasa corporal al ser comparadas con el grupo bajo condiciones L-L.

La condición de L-L produce en las ratas mayor desorganización y menor actividad conductual, estos resultados coinciden con estudios previos donde crías bajo luz constante presentan una desorganización circadiana y conforme pasa el tiempo las ratas entran en la fase llamada corrimiento libre (Hidenobu, 2006) y aunque la luz es la fase de "inactividad" de las ratas no es probable que las 24 horas las ratas estén durmiendo ya que las ratas en los actogramas siguen mostrando actividad conductual.

El que los actogramas bajo L-D, muestren diferencias al compararlos con los actogramas de L-L y D-D, nos hace sugerir que hay un desacoplamiento del NSQ; nuestros resultados coinciden con los de Hidenobu en 2006 donde las ratas neonatas bajo condiciones de L-L muestran arritmicidad y disminuye su actividad locomotora, sin embargo no coinciden con los de Mirmiriam en el 2000, donde los neonatos bajo condiciones de L-L aumentan su actividad locomotora; lo anterior puede deberse a que se invierten las condiciones ya que en condiciones naturales la rata es un animal nocturno y el humano es diurno.

7.3 Histología.

De acuerdo a nuestra segunda hipótesis, las ratas mantenidas bajo condiciones experimentales de L-L presentarían cambios en el análisis histológico al compararse con los grupos control L-D y D-D.

Las condiciones de L-L a las que los animales están expuestos influyen en el sistema circadiano. Nuestros resultados no muestran diferencias importantes o significativas si se comparan las retinas de los grupos L-D con el D-D, sin embargo las retinas del grupo experimental L-L nos indica que la luz puede tener un efecto dañino en el desarrollo de un sistema visual inmaduro.

Se conoce que la miosis (contracción pupilar como respuesta normal del organismo ante el aumento de luz) en respuesta a la luz brillante provoca condiciones constantes de estrés (Bastías 2007).

El ciclo de L-L puede inducir estrés y la degeneración de las capas de la retina, pero en especial de la capa de FR (que tienen conexiones verticales y horizontales con las CG) y de CG que son la vía de entrada del sistema circadiano.

Nuestros resultados son importantes porque Salazar y Cols., en 2006 describieron que para que haya una adecuada sincronización y producción de melatonina los FR (conos y bastones) deben ser funcionales, y nuestros resultados de retinas bajo condiciones L-L muestran degeneración en ellos.

Se ha documentado que los bastones segregan un factor de supervivencia para los conos (Leveillard y Cols. 2004), que la pérdida de bastones causa un daño oxidativo a los conos (Stone y Cols., 1999) y que los bastones en degeneración generan una toxina que llega a los conos mediante las uniones de gap e induce la degeneración de estos (Ripps, 2002).

Además se sabe que la degeneración de FR es sólo el principio de una serie de eventos que tienen lugar por toda la retina y cuyo final es la muerte de retina interna y una remodelación del circuito neuronal (Marc y Cols., 2008). Hay una serie de cambios anatómicos. En enfermedades como la retinitis del prematuro se produce una pérdida de visión por degeneración, pero en especial por la pérdida de los conos que ocurre secundariamente a la pérdida de bastones y el ciclo L-L acelera la degeneración de los conos en esta enfermedad.(Shelley y Cols. 2009).

Se ha propuesto que la degeneración retiniana tiene tres fases distintas: 1) Estrés del EP y degeneración de los FR 2) Muerte de FR, actividad de la microglia, alteraciones de las células bipolares y de las células de Müller y 3) sinaptogenesis y neuritogenesis aberrantes. Se cree que cuando se ha llegado a la fase 3 los eventos patológicos transcurren tan rápido como en las degeneraciones hereditarias más severas y además existe migración de distintos tipos celulares hacia una parte del ojo que se llama coroides comprometiendo la vascularización de la zona (Tanito y Cols., 2007). La degeneración de los FR conduce a la compresión de los axones de las células ganglionares de la retina provocando la posterior muerte de estas (Ayuso, 2011).

Además el daño fótico de los FR y las CG, puede deberse al producto del estrés oxidativo provocado por las radiaciones lumínicas, durante el cual, especies reactivas del O₂ reaccionan con componentes moleculares de las células (Kandel, 2000).

8. CONCLUSIONES.

Nuestros resultados muestran que condiciones ambientales extremas no son adecuadas para el desarrollo de las crías recién nacidas.

Respetar el ritmo entre el ciclo luz-oscuridad es vital para el buen desarrollo postnatal durante los primeros días de vida, para el adecuado orden temporal interno y por lo tanto para el buen desarrollo del sistema circadiano.

El estilo de vida del hombre moderno propicia alteraciones en los ritmos biológicos y las UCIN no son la excepción, consideramos se deben de reducir los ambientes luminosos y brillantes y optar por utilizar un ciclo natural de luz- oscuridad.

Por lo anterior sugerimos que un ciclo L-D, puede ayudar a la protección y desarrollo del sistema circadiano ya que L-L produce al menos en la vía de entrada del sistema circadiano un efecto de deterioro y arritmicidad en las ratas, bajo el ciclo de D-D también hay arritmicidad, demostrando así que se necesita la periodicidad entre la luz y la oscuridad desde las primeras etapas de vida.

La vía visual es un modelo experimental idóneo para el estudio de enfermedades degenerativas del sistema nervioso central ya que en este caso se provoca la muerte de las capas mediante L-L.

La L-L podría incluso acelerar la degeneración de enfermedades retinianas como la retinopatía del prematuro o la Amaurosis Congénita de Leber (donde los FR se desarrollan de forma anormal y en ocasiones cuando el humano nace ya no presenta ni conos ni bastones) (Drija y Cols. 1990)

Si se entiende el proceso de muerte de las capas retinianas se pueden tener algunas ventajas sobre lo que debe hacerse en los modelos animales y en este caso variar la severidad de la degeneración en función de la intensidad o duración de la fotoexposición, además de conocer la patogenia de las enfermedades vasculares de la retina.

Dado que nuestros animales estuvieron hasta el día 50, en este modelo se pueden estudiar los eventos celulares y moleculares similares a los que ocurren durante enfermedades degenerativas humanas (Degeneración Macular Senil y retinitis pigmentosa). .

Expectativas.

Conocer si es posible la re-sincronización en las ratas bajo condiciones D-D y L-L al cambiarlas a condiciones de L-D.

Evaluar las células ganglionares y el nervio óptico bajo este paradigma.

Determinar si la degeneración de retina aparece desde el momento del destete (P23) y continúa avanzando hasta el día 50.

Saber si existen modificaciones en el NSQ estando bajo las condiciones L-L y D-D durante los primeros 50 días de vida de las ratas y lo que sucede con las vías de salida.

9. BIBLIOGRAFÍA.

1. Aguilar, R.R., García, H., Aguilar, R., Arankowsky, S.G., Drucker, C.R., (1986). Suprachiasmatic nucleus transplants function as an endogenous oscillator only in constant darkness. *Neuroscience Letters* **69**:47-52.
2. Aguilar, R. R., Morin, L.P., Moore, R.Y. (1994). Morphological correlates of circadian rhythm restoration induced by transplantation of the suprachiasmatic nucleus hamsters. *Experimental neurobiology* **130**(2):250-60.
3. Aldana, GJ., (1992). Influencia de los factores durante el primer mes de vida. Tesis Doctoral, Universidad de Valladolid.
4. Als, H., Lawhon, G., Brown, E., Gibes, R., Duffy, F.H., McAnulty, G., (1986) Individualized behavioral and environmental care for the very low birth weight preterm infant at high risk for bronchopulmonary dysplasia: neonatal intensive care unit and developmental outcome. *Pediatrics* **78**:1123-32.
5. Anders, T. F. (1982) Biologic rhythms in development. *Psychosomatic Medicine* **1**; (44): 61-72.
6. Ángeles, C.M., (2004). Identificación de un sustrato anatómico en el sistema nervioso central que responde a la sincronización por alimento. Tesis doctoral en ciencias biomédicas UNAM.
7. Ángeles, C.M., Rodríguez, K., Salgado, R., Escobar, C. (2007) Cronobiología médica. Fisiología y fisiopatología de los ritmos biológicos. *Revista Facultad de Medicina UNAM*. Vol.50 No.6.
8. Antle, M.C., Silver, R. (2005). Orchestrating time: arrangements of the brain circadian clock. *Trends in Neurosciences*. **28**(3):145:51.
9. Amaya, F.J.M.A., (2009). Diferencias en poblaciones celulares hipotalámicas relacionadas con la conducta alimenticia entres sujetos con alto y bajo peso. Tesis de Licenciatura en Psicología, UNAM.
10. Arble, D., Bass, J., Laposky, D.A., Vitaterna, M.H., Turek, F., (2009). Circadian timing of food intake contributes to weight gain. *Obesity* 17-11, 2100-2102.
11. Asai, M., Valdés-Tovar, M., Matamoros-Trejo, G., García, D. (2010) La melatonina induce la síntesis y liberación de las encefalinas en el cerebro de la rata. *Salud Mental*, vol.33, núm. 2, marzo-abril, pp.123-131.
12. Aschoff, J. (1981). A survey on biological Rhythms. *Biological Rhythms*; Vol. 4 of *Handbook of Behavioral Neurobiology*, edited by Aschoff Jürgen. Plenum Press, New York: 3-11.
13. Ayuso, D. (2011). Estudio del efecto de la degeneración de los fotorreceptores en la población de células ganglionares de la retina. Universidad de Murcia. Tesis Doctoral.
14. Bastías, R. (2007). Rol del Kinesiólogo Neonatal en Promoción de Cuidados del Desarrollo. *Revista Kinesiología*; 26:16-22.
15. Blackburn, S. (1998) Environmental impact of the NICU on developmental outcomes. *Journal of Pediatric Nursing* **13**:279-89.
16. Buijs, R., Kreir, F. (2008) ¿Participa el reloj biológico en el síndrome metabólico? *Ciencia. Revista de la Universidad Nacional Autónoma de México*. **59**: 1: 39-47.

17. Cardinalli, D., Golombek, D., y Rey, R., (1992) Relojes y calendarios biológicos. La sincronía del hombre con el medio ambiente. Buenos Aires. Fondo de Cultura Económica.
18. Caponi, G. (2001). Claude Bernard y los límites de la fisiología experimental". *Historia. Ciencias, Saùde-Manguinhos* **8**:375-406.
19. Cassone, V.M., Warren, W.S., Brooks, D.S., Lu, J. (1993) Melatonin, the pineal gland, and circadian rhythms. *Journal Biology Rhythms*. 8 Suppl: 573-81.
20. Collin, J.P., Voisin, P., Falcon, J., Faure, J.P., Brisson, P., Detaye, J.R. (1989) Pineal transducers in the course of evolution: molecular organization, rhythmic metabolic activity and role. *Archives' of histology an cytology*. S2 Suppl:441-9.
21. Depress-Brumer, P., Levi, F., Metzger, F., Touitou, Y., (1995) Light-induced suppression of the rat circadian system. *American Journal Phisiology*. **268**:R1111-R1116.
22. Díez, A., Cambras, T., Vilaplana, J., Casamitjana, (1996) Text-guia: *Cronobiología*. Publicaciones Universidad de Barcelona.
23. Dryja, T., McGee, T., Reichel, E, Hahn, L., Cowley, G., Yandell, D., Sandberg, M., Berson, E., (1990) A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature*. **343**:364-366.
24. Dowling, J. (1987) The retina. An approachable part of the brain. The Belknap Press of Harvared University Press. Cambridge (Massachusets) and London (England).
25. Dunlap, J.C., Loros, J.J., De Coursey, P.J. (2004) *Chronobiology: Biological Timekeeping*. Sinauer Associates.
26. Escobar, C., Martínez, M.T., Ángeles, C.M., Mendoza, J. (2001). El alimento como sincronizador de los ritmos biológicos: su relevancia para la identificación de un reloj circadiano. *Revista Facultad de Medicina UNAM*. Vol.44 No.2.
27. Escobar, C., Martínez, M.T., Ángeles, C.M., Mendoza, J., y Parra, G.L. (2001). Los otros osciladores circadianos del mamífero, en Javier Velásquez Moctezuma (editor), *Temas selectos de neurociencias II*, capítulo 2, pp.17-36.
28. Escobar, C., Aguilar, R. (2002). *Motivación y Conducta: sus bases biológicas*. Manual Moderno, México, D.F.
29. Eastman, C., Rechtschaffen, A., (1983) Circadian temperature and wake rhythms of rats exposed to prolonged continuous illumination. *Physiology and Behavior*. **4**:417-27.
30. Golombek, D., Yannielli, P.C. (1996) Chronoliterature: biological rhythms in Argentine fiction. *Chronobiology International*. 13(6):487-6.
31. Golombek, D. (2002) *Cronobiología humana. Ritmos y relojes biológicos en la salud y en la enfermedad*. Universidad Nacional de Quilmes.
32. Gottfried, A. (1985) Environmental neonatology. In: Gottfried A, Gaiter J, editors. *Infant stress under intensive care*. Baltimore (MD): University Park Press: p. 252-257.
33. Gruart, A., Delgado, J.M., Escobar, C., Aguilar, R.R. (2002) Los relojes que gobiernan la vida. *La ciencia para todos*. Vol.188. Fondo de Cultura Económica. México. D.F.
34. Halberg, F. (1959). Physiologic 24-hour periodicity; general and procedure considerations with reference to the adrenal cycle. *Internationale Zeitschrift für Vitaminforsch Beiheft* **10**:225-96.

35. Hannibal, J. (2002). Pituitary adenylate cyclase-activating in the rat central nervous system: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *The Journal of Comparative Neurology* **25**;453(4):389-417.
36. Hastings, M.H., Reddy, A.B. y Maywood, E.S. (2003). A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience* **4**(8), 649-661.
37. Hinedobu, O., Amanda, C., Mitchel, Douglas, G. M. (2006) Constant Light disrupts the developing mouse biological clock. *Pediatric Research*. Vol. 60. No.3.
38. Hendrickson, A.E., Wagoner, N., Cowan, W.M. (1972) An autoradiographic and electron microscopic study on retino-hipotalamic connections. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische anatomie* **135**(1)-z6.
39. Janes, R., Bounds, G. (1955) The blood vessels of the rat eye's. *American Journal Anatomy*. **96**: 357-373.
40. Kandel, E., Schwartz, J., Jessell, (2000) T. *Principles of Neural Science*. 4^o Edition. McGraw Hill.
41. Leveillard, T., Mohand-Said, S., Lorentz, O., Hicks, D., Fintz, A., Clérin, E., Simonutti, M., Forster, V., Cavusoglu, N., Chalmel, F., Dollè, P., Poch, O., Lambrou, G., Sahel, J. (2004) Identification and characterization of rod derived cone viability factor. *Natural Genetic*. **36**:755-759.
42. Mann, N.P., Haddow, R., Stokes, L., Goodley, S., Rutter, N. (1986) Effect of night and day on preterm infants in a newborn infants: randomized trial. *BMJ*; **293**:1265.
43. Marc, R., Jones, B., Watt, C., Vazquez- Chona, F., Vaughan, D., Organisciak, D. (2008) Extreme retinal remodeling triggered by light damage: implications for age related macular degeneration. *Molecular Visual*. **14**: 782-806.
44. Marqués, N., Menna, B. L. (2003) *Cronobiología. Principios y Aplicaciones*. EDUSP. Sao Paulo.
45. Madrid, J.A., Rol de Lama, M.A. (2006) *Cronobiología Básica y Clínica*. Editec@red, Madrid.
46. Meijer, J.H. (2001) Photic Entrainment in Mammals. *Circadian Clocks*, Vol. 12 of *Handbook of Behavioral Neurobiology*, edited by Stakahaschi, Turek, Moore. Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York. Pp. 183-222.
47. Mendoza, J., Ángeles, C.M. y Escobar, C. (2004.) Differential role of the accumbens Shell and Core subterritories in food-entrained rhythms of rats. *Behavioral Brain Research* **158**:133-142.
48. Miller, C.L., White, R., Whitman, T.L. (1995) The effect of cycled versus non cycled lighting on the growth and development of preterm infants. *Infant Behavior and development*. **18**:95-16.
49. Miller, J.D., Morin, L.P., Schwartz, W.J. y Moore, R.Y. (1996) New insight into the mammalian circadian clock. *Sleep*. **19**, 641-667.
50. Mirmiran M, Ariagno R.L. (2000) Influence of light in the NICU on the development of circadian rhythms in preterm infant. *Seminars in Perinatology* **24**:247-257.
51. Moore RY, Eichler ME. (1972). Loss of circadian corticosterone rhythm following supraquiasmatic lesions in the rat. *Brain Research* **42**:201-206.

52. Moore, R.Y. y Leen, N.J. (1972). A retinohypothalamic projection in the rat. *The journal of comparative neurology* **146** (1):1-14.
53. Mrosovsky, N. (1996). Locomotor activity and non-photoc influences on circadian clocks. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **171**(3):343-372.
54. Pittendrigh, C.S. (1981) Circadian Systems: Entrainment. *Biological Rhythms*, Vol.4 of *Handbook of Behavioral Neurobiology*, edited by Aschoff, J. Plenum Press, New York. Pp. 95-125.
55. Publio Ovidio Nason. Traducción 2008. Libros I-IV. Editorial Gredo.
56. Shelley, E., Madigan, M., Natoli, R., Penfold, P., Provis, J. (2009) Cone degeneration in aging- related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology* **127**:483-492
57. Stone, J., Maslim, J., Valter, K., Mervin, K., Bowers, F., Chu, Y., Barnett, N., Provis, J., Lewis, G., Fisher, S., Bisti, S., Gargini, C., Cervetto, L., Merin, S., Pèer, J., (1999) Mechanisms of photoreceptor death and survival in mammalian retina. *Prog. Retin Eye Res.* **18**:689-735.
58. Rodríguez, G, K. (2007). Caracterización del patrón conductual y de la actividad neuronal en ratas sincronizadas por alimento regular y apetitoso. Tesis de Licenciatura en Psicología, UNAM.
59. Rollag MD., Berson DM., Provencio I. (2003) Melanopsin, ganglion cell, and mammalian photoentrainment. *Journal of Biological Rhythms* **18** (3):227-34.
60. Roenneberg T. Daan S, Mrosovsky M. (2003) The art of entrainment. *Journal of biological rhythms* **18**(3):183-94.
61. La Vaill, M., Unoki, K., Yasumura, D.M., Mathes, M, Yancopoulos, G., Steinberg, R.(1992) Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **1**; 89 (23):11249-53.
62. Lamberg, L. (2000) *Bodyrhythms. Chronobiology and Peak performance.* Paperback.
63. Salazar, J.A., Parra, G.L., Barbosa, M.S., Leff, P., Anton, B. (2007). Las bases neuronales del proceso de enmascaramiento. Segunda Parte. *Salud Mental*, vol. 30 No. 1 Enero-Febrero.
64. Saravia, M. (2007). *Revista Medico Oftalmólogo.* Pág.: 32-36
65. Shettleworth, S.J. (1998). *Timing and Counting. Cognition, Evolution and Behavior*, -Oxford. USA, New York. Pp.333-378.
66. Stephan, F.K, Zucker, I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **69**(6):1583-6.
67. Tanito M., Kaidzu, S., Anderson R., (2007) Delayed loss of cone and remaining rod photoreceptor cells due to impairment of choroidal circulation after acute light exposure in rats. *Investigation Ophthalmology Visual Sciences.* **48**-1864-1872.
68. Touitou, Y., Haus, E. (1994) *Biologic Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine.* Springer Verlag, Berlin.

69. Yannielli P, Harrington ME (2004) Let there be "more" light: enhancement of light actions on the circadian system through non-photic pathways. *Progress in Neurobiology* **74**(1):59-76.