



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

CONSECUENCIAS DE LA PRIVACIÓN DEL CUIDADO MATERNO SOBRE EL
RITMO CIRCADIANO DE ACTIVIDAD-REPOSO E INGESTIÓN DE ALCOHOL EN
RATAS MACHO

TESIS

Que para obtener el título de

Licenciada en Psicología

PRESENTA

Karina Reyes Santiago

DIRECTOR: Dr. Óscar Prospero García

REVISORA: Dra. Alejandra Evelyn Ruiz Contreras

SINODALES: Dra. Irma Yolanda Del Río Portilla

Dra. María Guadalupe Flores Cruz

Dra. Pilar Duran Hernández



Ciudad Universitaria, CD.MX., 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Canabinoides, dirigido por el Dr. Óscar Prospero García, en la facultad de medicina, del Departamento de Fisiología, de la Universidad Nacional Autónoma de México, con los donativos 817843 del Sistema Nacional de Investigadores (Dr. Oscar Prospero García, SNI III) otorgado a Karina Reyes Santiago y el Donativo IN215218 de DGAPA-PAPITT, UNAM otorgado a OPG.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Óscar Prospero, por darme la oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Canabinoides y de desarrollar este proyecto. Por mostrarme que un sueño puede comenzar con una idea impresa en una hoja papel. Por compartir conmigo su conocimiento y pasión por la investigación, por no juzgar mis tropiezos. Agradezco todo el apoyo que me dio en diferentes formas, las risas compartidas, los enojos, los momentos tristes, las bromas, las pláticas, las enseñanzas, las llamadas de atención, las frustraciones, las nuevas ideas, la confianza. Por dejarme ver que se debe saber más para servir mejor. Gracias por creer en mí, por todo el crecimiento académico y personal.

A los miembros del Laboratorio de cannabinoides, a la Dra. Mónica, Ale Ruíz, Alfonso, Ricardo, Rodolfo, Dianita, Eli, Yali, Lore, Brendita. Agradezco los comentarios y sugerencias en este proyecto, así como el apoyo personal y momentos compartidos.

A mi revisora, Ale Ruiz. Gracias por la paciencia y el tiempo dedicado a mi trabajo, observaciones, sugerencias y asesoría en estadística. Por su apoyo en momentos difíciles personales y académicos, por la confianza, por escucharme, darme ánimo y alentarme con este trabajo.

A las Dras. Yolanda, Guadalupe y Pilar, por todos los comentarios, sugerencias, aportes, paciencia y tiempo dedicado para mejorar mi trabajo, por compartir su conocimiento conmigo, y ayudarme a resaltar este proyecto.

A Francis y Hugo, por su apoyo y ser parte de la familia.

A mis amigos, a Hilda, mi confidente de años; Carlos, mi compañero de rarezas, mi cómplice; Enrique Valderrama, que ha sido parte de mis cambios, miedos, alegrías, que ha estado para escucharme y apoyarme en los momentos más difíciles, gracias por ser parte de mi vida. A Dulce Bolaños, Angélica Amador, Ángel Bahena, Susan Morales, Ale Salazar, Eunice Vega, Brenda Garduño, por su cariño, apoyo y aventuras compartidas. A Giby, por hacerme parte de su vida, por ser parte de la mía, por sus charlas, apoyo, confianza, regaños y aliento en mi vida. A Andrés Darío por ser parte en mis inicios dentro de la investigación, por los momentos compartidos, por las charlas, alegrías, miedos y búsquedas.

A mi robotsito Nadja, y a Myndi por ser mis primeras amigas en la facultad, por creer en mí, por su apoyo y cariño. Andy Vega, Sandy y Beto, Eli Nájera, Brenda, gracias por las aventuras compartidas en las clases, y fuera de ellas, por la confianza y cariño.

A Fernando Gonzáles, por ser mi compañero de laboratorio, mi compañero, mi amigo, por todo su apoyo, por creer en mí, por darme su confianza, por conocerme, por las galletas, las risas, los enojos, las distancias, por ser parte de mi vida y dejarme entrar a la suya. A Iza y Eli, mis negritas, mis compañeras de aventuras, gracias por su confianza, cariño y apoyo.

A Yali por su bondad jaja, y Lore, mis confidentes de laboratorio, por la comida compartida, los días de doritos, de pan, por las alegrías, enojos, frustraciones, y aliento y conocimiento compartido, el apoyo y tiempo invertido en mi proyecto, por volverse más que mis compañeras de laboratorio y ser parte de mi vida académica y personal.

A Alma y Jenny por ser mis cómplices, por compartir su vida conmigo y ayudarme a crecer, por estar siempre para alentarme, por aconsejarme y hacerme persistir ante mis sueños, por ser mi apoyo incondicional, por todo el cariño, por caminar conmigo.

DEDICATORIA

A mi familia

Por ser mi mayor apoyo en la vida, por todo el amor, por el cuidado, por ser mi motor en la vida, por hacerme creer en mí, por estar siempre conmigo.

A mi madre, mi mayor amor.

A mí hermana Miriam por ser la hermana mayor, por cuidar de toda la familia, por estar siempre al pendiente, por ser un ejemplo para todos. Por su cariño y fortaleza para guiarme y apoyarme.

A mi hermana Verónica por su carácter fuerte, noble y risueño para aconsejarme, alentarme, por enseñarme a arriesgarme y luchar por lo que quiero. Por apoyarme siempre, por ser un ejemplo.

A mi hermano Manuel, por mostrarme la rebeldía para enfrentar la vida, por ser un ejemplo.

A mi hermano Alejandro, mi compañero de juegos, por enseñarme a usar una resortera, por enseñarme a multiplicar, por mostrarme el camino a la preparatoria, por enseñarme que los sueños pueden sumarse o cambiar, por todo el apoyo y cariño, por ser un ejemplo.

A mis sobrinos Paulina, Ángel, Manuelito, Alexis y Alejandro, por motivarme a crecer, por alegrar mis días con sus sonrisas, con un abrazo.

UN SUEÑO

Que los unos, no encuentren en las drogas, lo que puede ofrecer: el amor de los otros, los frutos de los árboles, las obras de los artistas y los arcoíris de los cielos. Que los otros, miren más allá del “adicto” y vean a una persona, que siente, que sufre, que los ama.

Que los muchos, comprendan, busquen y se apasionen por contribuir al tema de las adicciones, que se corten un brazo antes de desistir.

ÍNDICE

TABLAS Y FIGURAS.....	1
GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	2
GLOSARIO DE TÉRMINOS	3
RESUMEN.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.2 DESARROLLO DE LOS ROEDORES	7
1.2.1 CUIDADO MATERNO Y ABUSO DE SUSTANCIAS.....	10
1.3 LOS RITMOS BIOLÓGICOS.....	12
1.3.1 RITMO CIRCADIANO	14
1.3.2 RITMO ENDÓGENO: FACTORES INTERNOS Y EXTERNOS QUE LO GENERAN	16
1.3.3 SINCRONIZACIÓN POR LUZ.....	18
1.4 FUNCIONAMIENTO DEL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO Y EL SISTEMA DE RECOMPENSA	19
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
2.1 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	23
3. HIPÓTESIS GENERAL.....	23
3.1 HIPÓTESIS PARTICULARES	23
4. OBJETIVO GENERAL	23
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES	24
5. MATERIALES Y MÉTODO	24
5.1 SUJETOS.....	24
5.2 EQUIPO Y MATERIALES.....	24
5.3 ALIMENTO Y LÍQUIDOS.....	26

6. PROCEDIMIENTO.....	27
6.1 PROTOCOLO DE PRIVACIÓN DE CUIDADO MATERNO (PCM)	28
6.2 PROTOCOLO PARA EL REGISTRO DE RITMOS CIRCADIANOS	29
7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
8. RESULTADOS	33
8.1 RESULTADOS DE LA INGESTA DE COMIDA, AGUA Y ALCOHOL	40
8.2 RESULTADOS DEL RITMO CIRCADIANO DE INGESTA	43
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIÓN.....	59
REFERENCIAS	60

TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Desarrollo cerebral de las ratas..	9
Figura 2. Componentes de una oscilación rítmica.....	14
Figura 3. Interacción entre el sistema circadiano y el sistema de recompensa..	20
Figura 4. Equipo para el registro del ritmo circadiano ingesta de líquido.....	26
Figura 5. Esquema de los Procedimientos.....	30
Figura 6. Ejemplo de actogramas en tres condiciones experimentales..	32
Figura 7. Actograma representativo de un sujeto SPCM, corresponde a la ingesta de agua.	36
Figura 8. Actograma representativo de un sujeto SPCM, corresponde a la ingesta de alcohol.	37
Figura 9. Actograma representativo de un sujeto PCM, corresponde a la ingesta de agua.	38
Figura 10. Actograma representativo de un sujeto PCM, corresponde a la ingesta de alcohol.	39
Figura 11. Índice de la ingesta de comida.....	40
Figura 12. Índice de la ingesta de líquido.....	41
Figura 13. Índice de la ingesta de alcohol.	42
Figura 14. Duración del periodo en minutos.....	43
Figura 15. Días transitorios para la resincronización.....	44
Figura 16. Actividad total durante el último día de las 3 condiciones sincronizadas..	45
Figura 17. Perfiles de actividad del último día de cada condición sincronizada.....	46
Figura 18. Cantidad de actividad durante las últimas 48 horas en la condición de oscuridad constante (O-O).....	47
Figura 19. Perfil de actividad durante las últimas 48 h en la condición de oscuridad constante (O-O).....	47
Figura 20. Índice de preferencia entre la cantidad de eventos registrados durante la ingesta de agua y la ingesta de alcohol en el día 9 y el día 19.....	49
Figura 21. Perfiles de actividad registrados durante la ingesta de agua y la ingesta de alcohol en el día 9 y 19 de la condición de acceso a alcohol..	50

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ATV- Área Tegmental Ventral

CLO 12:12 - Ciclo luz-oscuridad, 12 horas de iluminación y 12 horas de oscuridad

CPF- Corteza Prefrontal

DPN - Día postnatal

HL- Hipotálamo Lateral

HPA - Eje Hipotalámico de la Pituitaria Adrenal

NAc- Núcleo Accumbens

NSQ- Núcleo Supraquiasmático

PCM- Privación de cuidado materno

PCD- Periodo crítico del Desarrollo

RC - Ritmo circadiano

RCAR- Ritmo Circadiano de Actividad-Reposo

RCI- Ritmo Circadiano de Ingesta

REAR- Ritmo Endógeno de Actividad-Reposo

SPCM- Sin privación de cuidado materno

TUS- Trastorno por Uso de Sustancias

TUA- Trastorno por Uso del Alcohol

GLOSARIO DE TÉRMINOS

RITMO CIRCADIANO: Oscilación de una variable biológica con un periodo aproximado a 24 horas, que es generado endógenamente.

SINCRONIZACIÓN: Proceso mediante el cual un ritmo circadiano se ajusta o acopla a los cambios ambientales luz-oscuridad.

RELOJ CIRCADIANO: Sistema neuronal cuyos mecanismos moleculares estiman el tiempo y asignan la temporalidad de ocurrencia a diversas funciones fisiológicas, en ritmos ultradianos, circadianos o infradianos.

OSCILADOR: Un sistema cuyos componentes interactúan para producir un ritmo con una duración de periodo definible.

NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO: Núcleo hipotalámico del cerebro que se encuentra en la parte superior del quiasma óptico en la región anteroventral del hipotálamo. Los 2 núcleos bilaterales que comprenden el NSQ contienen entre 8,000 y 10,000 células, cada uno y funcionan como el reloj maestro en los mamíferos.

CRONOTIPO: Variaciones de los ritmos endógenos de un individuo para iniciar su sueño a una hora particular de las 24h del día. Por ejemplo, el cronotipo de fase avanzada puede iniciar su sueño a las 7-8 de la noche, pero despertarse a las 4 o 5 de la mañana (también se le conoce como cronotipo matutino o tipo alondra). El cronotipo de fase retrasada inicia su sueño a la 1 o 2 de la mañana, pero se despierta a las 10-11 de la mañana (También se le conoce como cronotipo vespertino o tipo búho). El cronotipo más frecuente y por lo mismo se le considera el silvestre o *normal*, inicia el sueño entre 10-11 de la noche y se despierta entre 6 y 7 de la mañana

(Bell-Pedersen et al., 2005 & Dictionary of circadian physiology, 2005)

RESUMEN

El trastorno por uso de sustancias (TUS) es multifactorial, incluyendo factores genéticos, ambientales y epigenéticos (interacción genoma-medio ambiente). En algunos pacientes que sufren TUS se ha observado que presentan cronotipos de fase retrasada. Esta condición puede deberse a una mutación genética o a un cambio epigenético. Con todo, afecta los patrones de consumo de drogas. En este contexto el modelo de PCM en ratas macho Wistar, permite aumentar la información sobre los factores que vulneran a un sujeto para padecer TUS. El modelo PCM consiste en separar a las crías de su madre durante 3 horas diarias del día posnatal 2 al día postnatal 15 (PN2-PN15); permitiendo evaluar cambios cerebrales y/o conductuales en etapas posteriores del desarrollo. Se desconoce si la separación materna tiene efectos sobre la homeostasis del ritmo circadiano de ingesta (RCI) y si estos potenciales efectos sobre el RCI, pueden influir en el consumo de alcohol. El objetivo del presente trabajo fue conocer si la PCM modifica el RCI y el consumo de alcohol en ratas juveniles. Se emplearon 20 ratas macho Wistar, la mitad de los sujetos fue sometida al protocolo de PCM, la otra mitad se utilizó como grupo control (permaneció todo el tiempo con su madre, hasta el día del destete, DPN21, SPCM). A partir del DPN 60, se evaluó el RCI. Para ello, se colocaron 2 botellas de agua en la caja habitación de las ratas, durante 10 días en el ciclo luz-oscuridad 12:12 (CLO, luces encendidas a las 8 am), seguido de 2 semanas en oscuridad constante (O-O), para evaluar el ritmo endógeno. Durante 2 semanas más regresaron al CLO (para evaluar los días transitorios de re-sincronización). En los 19 días (CLO) siguientes se sometieron al consumo voluntario de alcohol (1 botella con 10% de alcohol y la otra de agua). Los resultados mostraron que la PCM no modificó la cantidad de actividad del RCI, la duración del periodo, ni el número de días transitorios para la resincronización. La PCM no modificó el consumo de alcohol. Sugiriendo que los eventos estresantes en la vida temprana no impactan en la homeostasis circadiana de ratas juveniles Wistar macho.

Palabras clave: cuidado materno, ritmo circadiano, ritmo endógeno, resincronización, ingesta de alcohol.

1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo al National Institute on Drug Abuse (NIDA) en 2108 define a la adicción como “una enfermedad crónica caracterizada por la búsqueda y el uso compulsivo e incontrolable de una droga, a pesar de las consecuencias”. La dependencia a sustancias, incluyendo la generada por el alcohol que es de interés en el presente estudio, menciona como criterios para su diagnóstico presentar tres o más de las siguientes características en algún momento, de un período continuado de 12 meses: tolerancia, síndrome de abstinencia, consumo de la sustancia en cantidades mayores o durante un período más largo de lo que se pretendía inicialmente, esfuerzos infructuosos de controlar el consumo de la sustancia o para reponerse de sus efectos, invertir mucho tiempo en actividades relacionadas con la obtención de la sustancia, reducción de actividades sociales, laborales o recreativas debido al consumo de la sustancia, continuar el consumo de la sustancia a pesar de tener conciencia de problemas psicológicos o físicos que le ocasiona al sujeto dicho consumo (American Psychiatric Association, 2013). En México, la Encuesta Nacional de Consumo Drogas, Alcohol y Tabaco 2016-2017 (ENCODAT) reportó que el 2.2% de la muestra entrevistada de entre 12 y 65 años de edad presentó una posible dependencia al consumo alcohol.

No está claro por qué algunas personas desarrollan dependencia a alguna sustancia de abuso y otras no. Prospero-García (2014) menciona que los factores genéticos y ambientales participan en el desarrollo del Trastorno por Uso del Alcohol (TUA). Con respecto a los primeros, que los consideramos una vulnerabilidad del sujeto, se habla de un aumento del 50% de probabilidad de que un sujeto con algún progenitor que padece alcoholismo herede genes que lo vulneren a un TUA. La relevancia de dichos genes que codifican, por ejemplo, para las enzimas que participan en la biotransformación del OH- en el metabolismo del alcohol, entre ellas la deshidrogenasa de alcohol y la deshidrogenasa de aldehídos, es que generan isoformas de dichas enzimas que

presentan mayor o menor actividad para metabolizar el alcohol. También se menciona que el estrés en etapas tempranas de la vida (v.gr., inducido por negligencia física y afectiva, abandono y/o abuso sexual) puede predisponer a un sujeto a un consumo excesivo de alcohol en etapas posteriores, en comparación de quienes no experimenten dicho estrés. A esta afección se la llama fragilidad social en contraste de la vulnerabilidad genética.

El cuidado materno deficiente en la vida temprana puede generar cambios neurobiológicos que perduren en etapas posteriores, que hacen vulnerable al sujeto al consumo de alcohol. Por ejemplo, Romano-López et al. (2016) reportaron que las ratas macho separadas de su madre durante seis horas diarias (9:00-12:00 y 14:00-17:00) del DPN 2 al DPN 15, muestran en la edad adulta un aumento en la expresión del receptor D2 en el núcleo *accumbens* (NAc) y una disminución del receptor D3 en la corteza prefrontal (CPF). Asimismo, disminución de las enzimas amida hidrolasa de ácidos grasos (FAAH) y lipasa del monoacilglicerol (MAGL) en el NAc, enzimas que participan en la degradación de cannabinoides. También se reportaron cambios en la longitud dendrítica neuronal en ambas regiones CPF y NAc. Estos cambios muestran una alteración en la microestructura neuronal y en los sistemas cannabinoide y dopaminérgico, mismos que se ha demostrado, se encuentran afectados en los adictos.

Siguiendo en línea con el protocolo de privación de cuidado materno (PCM) es interesante describir los cambios que ocurren con respecto a los ritmos circadianos. Prieto et al. (2012) mostraron que las ratas sometidas PCM, durante tres horas diarias en los primeros 14 días posnatales, presentan reducción de la cantidad de sueño sin movimientos oculares rápidos (NMOR) y sueño MOR y aumentada la cantidad de vigilia en comparación con el grupo control, sin privación de cuidado materno (SPCM). En este contexto, es importante conocer si la separación materna puede generar cambios en los ritmos circadianos endógenos, v.gr. ritmo endógeno de actividad y reposo (REAR).

En el presente estudio, se busca dar respuesta a la pregunta antes mencionada, sobre factores de fragilidad social que pudieran predisponer a un

sujeto al consumo de drogas, específicamente de alcohol, elucidando si la PCM, experiencia estresante a temprana edad, puede generar cambios en el REAR, y contribuir a predisponer a un sujeto a generar adicciones en etapas posteriores de la vida.

La importancia de esta investigación radica en aportar conocimientos sobre la PCM como posible factor que induce vulnerabilidad para padecer alcoholismo.

1.2 DESARROLLO DE LOS ROEDORES

Durante el desarrollo de un sujeto, existen momentos particulares en los que el cerebro presenta una mayor tasa de un evento específico, por ejemplo, la migración y diferenciación celular. La neurogénesis hipocámpica alcanza su máximo pico en la segunda semana de vida en los roedores y en el segundo mes en los humanos (Fenoglio, Brunson & Baram, 2006). Se les conoce como periodos críticos del desarrollo (PCD). En estos periodos el organismo es más susceptible a sufrir ciertas modificaciones propiciadas por el ambiente, positivas o negativas, que pueden perdurar en etapas posteriores (Smart, 1991). En la figura 1 se muestra una curva comparativa de las tasas de los principales eventos en el desarrollo del SNC en las ratas y los seres humanos, y un esquema del desarrollo de la organización celular en mamíferos.

En los roedores, un factor crítico para su desarrollo, es la nutrición balanceada durante el periodo de gestación y/o lactancia. En ratas se ha llevado a cabo protocolos de desnutrición durante los periodos mencionados y se ha visto que los sujetos malnutridos tienden a tener cerebros pequeños con respecto a la edad y peso corporal que presentan, cambios en la expresión de enzimas y en el tamaño de algunas estructuras cerebrales, por ejemplo, el cerebelo (Dobbing & Sands, 1971; Dobbing, 1972).

Anteriormente se mencionó que el ensamble cerebral no es un proceso pasivo, por el contrario, el encéfalo es sensible al ambiente. Condiciones hostiles para las ratas puede producirles distintos efectos, de acuerdo a la magnitud, tipo y momento del desarrollo en que el sujeto lo experimente. Por ejemplo, se ha descrito, en los roedores, diferentes patrones de comportamiento social en la edad adulta, que resultan de la exposición a diferentes tipos de factores estresantes, en diferentes puntos temporales de desarrollo. El estrés prenatal y neonatal (privación de cuidado materno) disminuyó las interacciones sociales en la adultez, en comparación con ratas que experimentaron estrés (aislamiento social) en edad juvenil. Por otro lado, el estrés prenatal en roedores reduce las conductas de agresividad en edad adulta, mientras que el estrés por privación de cuidado materno suele aumentarlas. El estrés impacta diversas estructuras y funciones cerebrales (particularmente la amígdala, la corteza prefrontal, hipocampo y sistema mesolímbico), de acuerdo al momento del desarrollo en que se experimente (Sandi & Haller, 2015).

El modelo de estrés por privación de cuidado materno (PCM), no solo tiene repercusiones en el eje hipotálamo-hipofisario. También se ha reportado que las crías que experimentaron PCM durante 360 minutos mostraron alteraciones en las vocalizaciones ultrasónicas durante este periodo, en comparación a las crías con PCM de 15 minutos (Ploj, Roman, & Nylander, 2003) . Además, la mayoría de los sujetos, PCM y SPCM, abrieron sus ojos entre los DPN 14-15. Sin embargo, el 20% de los sujetos PCM de 360 minutos abrieron los ojos en los DPN 16-17; en comparación con el 3% de los sujetos SPCM (Ploj, Roman & Nylander, 2002). En ninguno de los 2 estudios se reportaron diferencias entre los grupos, con respecto al peso corporal. No se conoce el mecanismo exacto por el cual la PCM ejerce efectos sobre el desarrollo de un sujeto; sin embargo se ha propuesto una serie de hipótesis y posibles efectos. En el siguiente capítulo se abordara de forma más específica el paradigma de PCM.

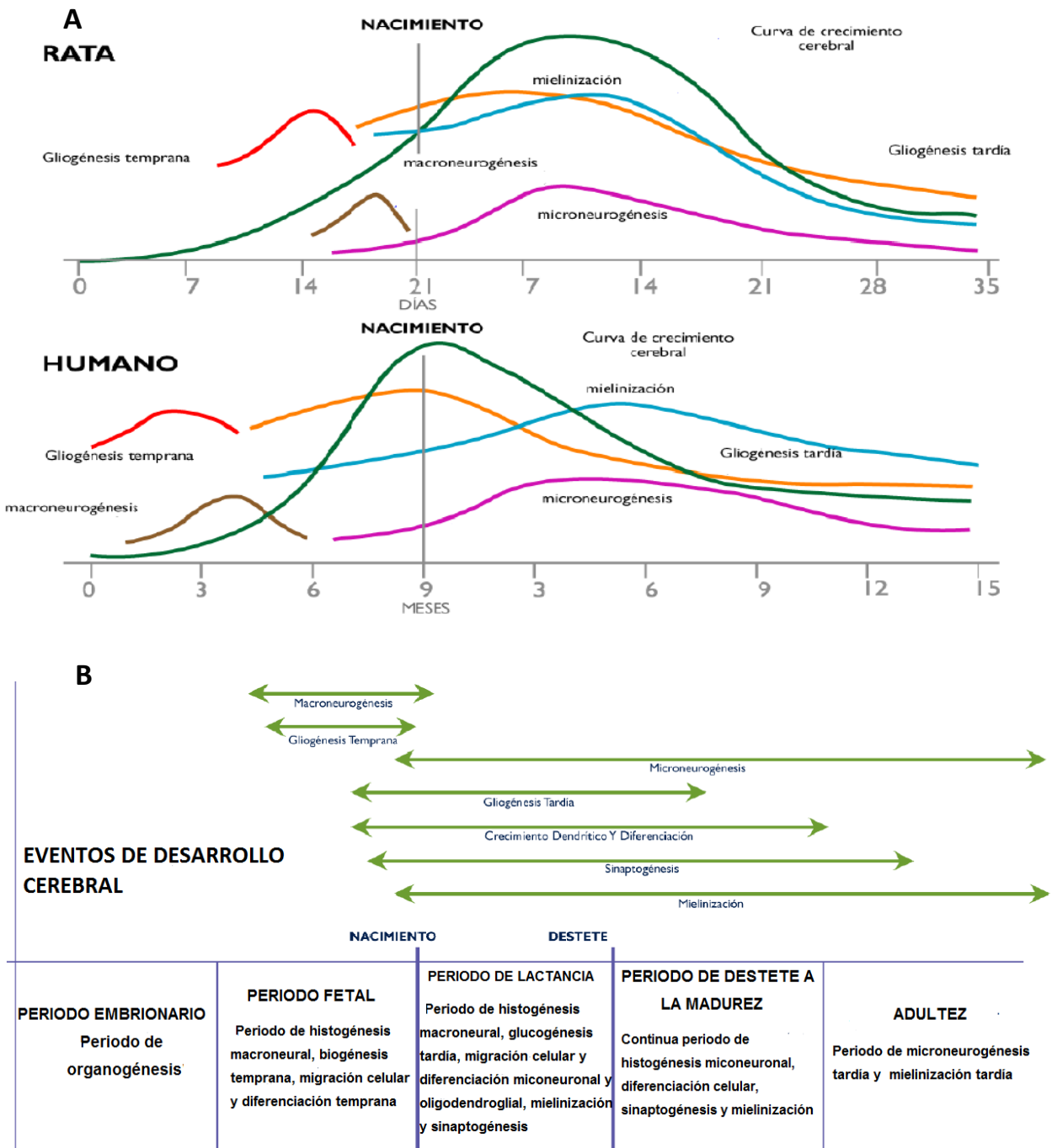


Figura 1. Desarrollo cerebral de las ratas. A) Curva comparativa de las tasas en las que se presentan los principales eventos en el desarrollo del SNC en ratas y humanos. Los picos en las curvas representan los PCD. B) Esquema de la organización celular que ocurre a lo largo del desarrollo de los mamíferos. Tomado y modificado de (Romero, 2010 & Morgane, et al., 1993).

1.2.1 CUIDADO MATERNO Y ABUSO DE SUSTANCIAS

El paradigma de privación de cuidado materno (PCM) se define como “una ruptura en la continuidad de la relación madre-hijo después de que la relación es establecida” (Delavari et al., 2016, p.108). La PCM en roedores consiste en la separación de las crías de su madre, lo cual es posible al trasladar a las crías o a la madre a una caja distinta a la que viven.

Existen diversos modelos experimentales de PCM en los roedores que se han propuesto para producir condiciones hostiles durante la infancia de las crías, permitiendo evaluar diversos cambios cerebrales y/o conductuales en etapas posteriores del desarrollo. De manera general, lo que consideran dichos modelos es el tiempo, frecuencia, hora de separación (momento del CLO) y condiciones con que separan a las crías de su madre, Con relación a lo primero, puede ser un solo día (24 horas) o 60 a 360 minutos diarios en un periodo desde 13 a 21 días. La separación de las crías puede ser individual o por camada, es decir, mantener juntas a las crías o separar a cada miembro de la camada. Es importante mencionar que también existen variaciones con respecto al grupo control del paradigma mencionado, que puede permanecer todo el tiempo con su madre o puede tener una separación y manipulación corta, de 15 minutos, por parte del experimentador (Nylander & Roman, 2013).

En algunos estudios con roedores se ha mostrado que la expresión de la proteína c-Fos aumenta en algunas estructuras cerebrales a consecuencia de la PCM. Por ejemplo, Horii-Hayashi et al. (2013) mostraron mayor expresión de c-Fos después de llevar a cabo la PCM del DPN 1 al DPN 14 durante tres horas diarias o PCM en el DPN 14 durante 3 horas, en comparación con el grupo control (SPCM). La mayor expresión de c-Fos se observó en el área preoptica medial, núcleo paraventricular del hipotálamo, órgano subfornical, núcleo hipotalámico dorsomedial, corteza prelímbica, corteza orbital medial, septum lateral, corteza cingulada, núcleo del lecho de la estría terminal, área hipocámpica CA1 y CA3, núcleo amigdalino lateral y basolateral y la corteza piriforme. Al evaluar los niveles

de corticosterona también fueron significativamente mayores que los del grupo SPCM. El estudio nos sugiere que la PCM afecta diversas áreas cerebrales, algunas relacionadas con la ansiedad y el miedo. Hasta el momento no se conocen con exactitud los mecanismos y de qué forma la PCM los impacta a temprana edad; aunque de manera general en los humanos, se ha relacionado con un impacto negativo en etapas posteriores de la vida, como la proclividad a desarrollar trastornos neuropsiquiátricos, trastornos alimenticios y dependencia a sustancias (Nishi, Horii-Hayashi & Sasagawa, 2014).

En ratas, la PCM a temprana edad, puede generar conductas tipo depresivas en la edad adulta. Dimatelis, Stein & Russell, (2012) llevaron a cabo el protocolo de separación materna en ratas macho, que consistió en separar a las crías de su madre durante tres horas diarias en las dos primeras semanas de vida, y encontraron que estos sujetos en la adultez mostraban conductas tipo depresivas, presentando mayor tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado, incremento en el número de vocalizaciones de 22 KHz que son asociadas a un estado negativo en los roedores, en comparación con el grupo SPCM.

Algunos autores consideran la PCM como un modelo de estrés en roedores debido a que el protocolo es llevado a cabo dentro de las dos primeras semanas postnatales, mismas que son consideradas como el periodo de hipo-respuesta al estrés, que en ratas comprende el DPN 4-14 (Levine, 2001). Se ha reportado un incremento en los niveles del factor liberador de corticotropina (CRF), (hormona implicada en la respuesta de estrés) en las crías que fueron separadas una hora diaria de su madre y de sus pares, del DPN 2-9 (McCormick, Kehoe & Kovacs, 1998). Estos incrementos en los niveles de corticosterona pueden ser mantenidos hasta la adultez a consecuencia de un período de separación materna de tres horas diarias del DPN 2-15, en comparación con ratas que fueron separadas durante 15 minutos o sin privación de cuidado materno (SPCM) (Plotsky & Meaney, 1993).

Anteriormente se mencionó que los eventos que ocurren en las etapas tempranas del desarrollo de un sujeto pueden tener un impacto positivo o negativo

en las etapas posteriores. Con relación a lo primero (Venebra-Muñoz et al., 2014) mostraron que ratas macho alojadas en un ambiente enriquecido, (en una caja con dos niveles, rampas, tubos de plástico, juguetes, cajas y túneles) durante 60 días después del destete, presentaron menor consumo de nicotina a una concentración de 0.006 % diluida en agua, en la edad adulta, comparados con los roedores que crecieron sin ambientes enriquecidos (caja estándar). Además, los sujetos que crecieron con ambiente enriquecido presentaron mayor activación en el NAc y en la corteza prefrontal comparados con los sujetos que crecieron en condiciones estándar.

En ratones, la PCM del DPN 1-14, durante tres horas diarias, produce un aumento en el consumo de alcohol en la edad adulta, en el paradigma de autoadministración y en la prueba de tres botellas (sacarosa, alcohol al 6% y al 10% diluido en agua) en comparación con sujetos SPCM (Cruz, Quadros, Planeta & Miczek, 2008). Se ha descrito ampliamente un mayor consumo de alcohol en sujetos que experimentaron PCM en comparación de sujetos SPCM; (Ploj et al., 2003; Odeon, Yamauchi, Grosman & Acosta, 2017; Portero-Tresserra et al., 2018). También se ha asociado este modelo con un mayor consumo de otras sustancias, entre ellas, opiáceos (Vazquez, Giros & Daugé, 2006; Vázquez et al., 2005); cocaína (Moffett et al., 2006); metanfetamina (Lewis, Staudinger, Scheck & Olive, 2013). Sin embargo, no se ha evaluado si la PCM tiene un efecto sobre la homeostasis del ritmo circadiano de ingesta (RCI).

1.3 LOS RITMOS BIOLÓGICOS

Un ritmo biológico es definido como la recurrencia de un evento dentro de un sistema biológico a intervalos regulares (Aschoff, 1981). Los ritmos biológicos pueden ser de origen endógeno: intrínsecos al organismo e independientes de influencias ambientales; o exógenos: su aparición está dada por la interacción con señales fuera del organismo (dependientes del ambiente). En condiciones de ausencia de señales externas se manifiestan los ritmos en libre curso o

endógenos, de un organismo. Estos pueden ser clasificados de acuerdo a su frecuencia (Mas & Blanch, 2007; Cardinali et al., 1994):

- Ritmos de frecuencia alta (periodo en curso libre < 30 min.). Por ejemplo: latido cardiaco y la frecuencia respiratoria.

- Ritmos de frecuencia media (periodo en curso libre entre 30 min. y 6 días):
 - Ritmos ultradianos (entre 30 min. y 20 h). Como las fases del sueño de ondas lentas y sueño paradójico.
 - Ritmos circamareales (aproximadamente de 12 hrs). La actividad de las especies costeras.
 - Ritmos circadianos (20-28 h). El ciclo sueño-vigilia, la actividad motora, la liberación de melatonina y la temperatura.
 - Ritmos infradianos (28h-6 días). Por ejemplo, la liberación de las hormonas de la glándula suprarrenal.

- Ritmos de frecuencia baja (periodo en curso libre > 6 días)
 - Ritmos circalunares (aproximadamente 29 días). La menstruación y la reproducción en animales de zona intermareal.
 - Ritmos circanuales (aproximadamente 365 días). La migración, la reproducción en especies de reproducción estacional, la hibernación.

Los estudios de investigación plantean que los relojes biológicos confieren dos ventajas a los organismos, una de origen intrínseco en la que se establece determinado orden temporal entre diversos procesos fisiológicos dentro de un organismo. Otra ventaja es de origen extrínseco que permite ajustar los ritmos biológicos a variaciones cíclicas del ambiente. De acuerdo a lo anterior, se ha considerado que los ritmos biológicos ayudan a un organismo a adaptarse a su ambiente, permitiendo la organización temporal de sus procesos conductuales y fisiológicos de acuerdo a los requerimientos ambientales, la anticipación de los cambios en su entorno para planear cómo contender con él, y la creación de

barreras temporales que ayuden a la supervivencia, permitiendo a las especies cohabitar en el mismo ecosistema pero en un momento temporal distinto (Esteller, 2009; Nikhil & Vijay, 2017).

1.3.1 RITMO CIRCADIANO

Un ritmo circadiano (RC) es un evento que presenta un organismo de forma continua, cuyo periodo en curso libre es de 24 horas. Los RC han sido descritos a nivel fisiológico, químico, celular y conductual, en mamíferos, aves, y numerosas especies de invertebrados. Se hipotetiza que surgieron en el transcurso de la evolución en respuesta a los cambios ambientales cíclicos como los son el ciclo luz-oscuridad (CLO) y la variación de la temperatura, dados por eventos geofísicos, como la rotación de la tierra y la traslación, permitiendo la adaptación del organismo al ambiente (Hastings, 1997; Wollnik, 1989). En la siguiente figura se ilustran los componentes de un RC.

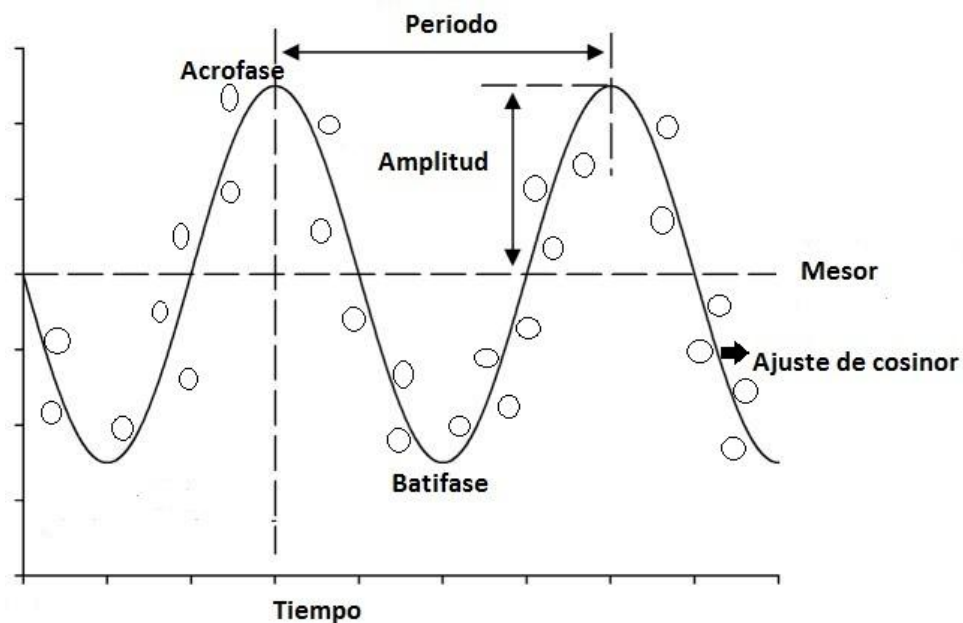


Figura 2. Componentes de una oscilación rítmica. Se muestran los parámetros de un ritmo circadiano utilizando un ajuste de Cosinor. El periodo es el tiempo requerido para completar un ciclo, es decir, la distancia de un pico a otro. El mesor representa el punto medio de la curva. La Acrofase es el momento en que se produce el pico del ritmo. La Amplitud es la distancia que hay desde el valor del mesor hasta la acrofase. Mientras que la batifase es la distancia que hay entre el mesor y el nivel mínimo de la oscilación. Tomado y modificado de (Refinetti, Lissen & Halberg, 2007; Wilking, Ndiaye, Mukhtar & Ahmad, 2013).

De acuerdo a Pittendrigh (1960) los RC presentan las siguientes características: 1) Son ubicuos en los sistemas vivientes (puede observarse de forma superficial a través de la locomoción o a nivel de la síntesis del ADN). 2) El periodo en curso libre se aproxima al periodo de la rotación de la tierra. 3) Son endógenos en los sistemas vivientes. 4) Son oscilaciones auto-sostenidas. 5) Se producen de forma autónoma a nivel celular y en organismos completos. 6) La duración del periodo de un ritmo en curso libre, se caracteriza por una muy pequeña variación del tiempo en la secuencia de ciclos. 7) El periodo de un ritmo en curso libre no es una característica fija e inalterable de un organismo; es susceptible a cambios espontáneos e inducidos dentro de un rango de valores. 8) Algunas especies (nocturnas, diurnas) difieren claramente de otras en sus rangos de periodo en curso libre 9). El periodo en curso libre puede mostrar la historia previa de sincronización, o post-efecto del *zeitgeber* (sincronizador). 10) El periodo en curso libre es prácticamente independiente de la temperatura, en condiciones ambientales constantes el organismo compensa cambios en la temperatura. Con ciertas excepciones que serán mencionadas más adelante. 11) El periodo en libre curso es dependiente de la intensidad lumínica. Regla de Aschoff: ritmo endógeno en iluminación constante (TLL) > Ritmo endógeno en oscuridad constante en animales nocturnos (TDD); TLL < TDD en animales diurnos. 12) La fase de un RC en libre curso puede ser modificada por una sola perturbación de un *zeitgeber* externo (luz, temperatura). La magnitud del cambio de fase no solo depende de la intensidad y duración de la señal perturbadora sino de la fase en la que fue perturbado el RC. 13) El alcance de un nuevo estado estable, luego de un cambio de fase del *zeitgeber*, siempre es precedido por reajustes transitorios o graduales del periodo. 14) Los RC son ajustables por un conjunto restringido de periodicidades ambientales “los organismos perciben las variaciones ambientales”, la temperatura y la luz son los dos agentes más poderosos que suelen ser denominados *zeitgebers* (sincronizadores), que serán descritos más adelante.

1.3.2 RITMO ENDÓGENO: FACTORES INTERNOS Y EXTERNOS QUE LO GENERAN

Anteriormente se mencionó una propiedad esencial de los ritmos circadianos, su persistencia en ausencia de señales externas y bajo condiciones ambientales constantes de humedad, temperatura y luz. Por ejemplo, al mantener a un organismo en oscuridad constante se manifestara su RC con una desviación cercana a las 24 hrs, que es conocido como ritmo en curso libre o endógeno. El rango de desviación de la duración del periodo depende de la especie, de factores intrínsecos (correspondientes al individuo y su estado fisiológico) y de las condiciones ambientales (Aschoff, 1979). El ritmo circadiano de los organismos se compone por una fase de actividad llamada alfa (α) y una fase de reposo conocida como rho (ρ), al sumarse muestran el total de la duración del periodo (Dann & Aschoff, 1975).

En condiciones constantes existen tres posibles formas en las que se puede manifestar un ritmo: a) la periodicidad cesa repentinamente, mostrando que el ritmo manifestado no es endógeno ni exógeno, posiblemente las condiciones ambientales no son las adecuadas, problemas de temperatura o de iluminación (muy brillante o muy oscuro); b) la periodicidad se manifiesta con una duración de 24 hrs exactamente, algún factor ambiental podría estar actuando como sincronizador, se excluye que el ritmo presentado sea endógeno debido a la fase y frecuencia inalterada; c) cuando la periodicidad continua con una desviación en un rango cercano a las 24 hrs, mostrándose en curso libre se puede hablar de un ritmo endógeno, el cual debe ser medido por al menos 5-7 periodos (Aschoff, 1960).

Entre los factores externos que tienen impacto sobre el ritmo en curso libre se encuentra la luz y su intensidad, la duración del periodo puede variar si las condiciones constantes de iluminación corresponden a luz u oscuridad constante (la duración del periodo puede ser más corta o larga); o al incrementar la

intensidad de la luz, por ejemplo, macacos que fueron mantenidos en luz constante con 0.1 luxes o 0.03 luxes presentaron un periodo de 23.20 y 22.74, respectivamente. Intensidades altas de luz pueden provocar un estado arrítmico (Aschoff, 1981). Una ventaja que confiere la oscuridad constante sobre la luz constante, al estudiar el ritmo en curso libre, es la reducción de la variabilidad del periodo que podría ser ocasionada por diversas intensidades de luz. La frecuencia natural del sistema circadiano, puede observarse con mayor precisión durante la condición de oscuridad constante (Aschoff, 1979).

Se han reportado tres formas en las que la historia de sincronización previa influye en la duración del periodo de un organismo: a) la proporción en horas de luz y oscuridad, b) por el periodo del sincronizador, c) si el ritmo ha sido sometido a otras condiciones constantes y sincronizado a través de avances o retrasos de fase (Aschoff, 1979).

El fenómeno de compensación de la temperatura se refiere a la capacidad que tienen los organismos para mantener un balance homeostático en sus ritmos circadianos ante diferentes temperaturas constantes (Q10). Esta regla se ha obtenido de experimentos donde se mide un ritmo en libre curso conocido, por ejemplo, actividad locomotora, ritmos de expresión de proteínas o genes, entre ellas (PER2::LUC) a diferentes temperaturas constantes (29°-37°) y el periodo obtenido no difiere significativamente (Reyes, Pendergast & Yamazaki, 2008). También se ha reportado que cambios en la temperatura pueden generar adelantos o atrasos de fase; remarcando la importancia de mantener condiciones constantes en experimentos circadianos (Zimmerman, Pittendrigh & Pavlidis, 1968).

Entre los factores internos que influyen en la duración del periodo se encuentran las características inherentes a los sujetos; sexo, edad, especie-cepa, actividad de forrajeo diurna o nocturna (Wollnik, 1989). Influencia hormonal; en ratones macho que han sido castrados, la duración del periodo se alarga y al

administrarles testosterona se reduce (Daan, Damassa, Pittendrigh & Smith, 1975).

1.3.3 SINCRONIZACIÓN POR LUZ

Se conoce como sincronización a la capacidad del ritmo circadiano en curso libre para ajustarse a un ciclo ambiental de 24 hrs y presentar un periodo exactamente de 24 horas (Wollnik, 1989). Por lo tanto, un *zeitgeber* (término en alemán que significa dador de tiempo) o sincronizador es aquella señal externa y periódica capaz de sincronizar un ritmo en curso libre (Daan & Aschoff, 2001).

Los sincronizadores deben presentar las siguientes características: sincronizar a varios individuos de la misma especie manteniéndolos en la misma fase, sincronizar a diferentes relojes circadianos en un mismo organismo (si el organismo presenta más de uno), el sincronizador debe influir en el patrón circadiano. Para que un sincronizador sea efectivo se debe tomar en cuenta la forma en que se presenta, puede ser una señal de corta duración cada 24 horas, por ejemplo, los pulsos de luz; puede cambiar continuamente como las transiciones de la temperatura o puede presentarse en condiciones estables y alternas, por ejemplo, el ciclo luz oscuridad (Aschoff, 1960).

Existen diversas señales ambientales que funcionan como sincronizadores, entre ellos: a) El acceso a la comida, los organismos suelen ingerir alimento en su fase de actividad, el sistema circadiano regula el comportamiento alimenticio y la hora de consumo de alimento influye en el sistema circadiano (Escobar et al., 2011). b) El ejercicio o actividad física de acuerdo en el momento en que se realice, ejerce diferentes efectos en los ritmos, logrando adelantarlos o retrasarlos (Yamanaka et al., 2015). c) Las interacciones sociales, ya que en diversas especies de mamíferos estas influyen en el momento de dormir, comer, hacer ejercicio y en general, actividades reguladas por el tiempo, por lo tanto los

estímulos sociales han demostrado su capacidad como sincronizadores (Mistlberger & Skene 2004). d) La temperatura y sonido-ruido ambiental también son sincronizadores de los ritmos (Kurosawa, Fujioka, Koinuma, Mochizuki & Shigeyoshi, 2017 & Goel, 2005). e) Las hormonas, entre ellos la melatonina (Lockley et al., 2000). f) Las sustancias de abuso (Kosobud et al., 2007).

La sincronización por señales luminosas se ha descrito como el principal sincronizador, debido a que los ritmos endógenos son sincronizados principalmente con el tiempo geográfico en que se encuentren los organismos, regulando sus patrones de actividad y reposo por influencia del ciclo ambiental de la luz. Aunado a lo anterior, el reloj maestro llamado núcleo supraquiasmático (NSQ) recibe información a partir de las señales fóticas para llevar a cabo la regulación y comunicación con diversas estructuras dentro del cerebro y poder llevar a cabo las diversas funciones que requiere el individuo (Yan, Smale & Nunez, 2018). En el presente estudio se llevará a cabo la sincronización por luz.

1.4 FUNCIONAMIENTO DEL NÚCLEO SUPRAQUIASMÁTICO Y EL SISTEMA DE RECOMPENSA

En el hipotálamo anterior del cerebro de los mamíferos, se encuentra el reloj maestro conformado por una estructura bilateral llamada núcleo supraquiasmático, cada parte bilateral contiene alrededor de 10,000 neuronas interconectadas (Sollars & Pickard, 2015 & Mendoza, 2009). La información fótica es captada por células ganglionares de la retina que sintetizan melanopsina, y se transmite a través del tracto retino hipotalámico al NSQ; éste se comunica a través de señales neuronales y humorales con otras zonas cerebrales para generar diversos ritmos moleculares y conductuales (Covassin, Singh & Somers, 2016; Kwon, Choe, Son & Kim, 2011).

El NSQ se comunica bidireccionalmente con el sistema de recompensa que está compuesto por el área ventral tegmental (AVT), el núcleo *accumbens* (NAc),

la amígdala (Amy) y la Corteza Prefrontal (CPF), como se muestra en la figura 1 (Gulick & Gamsby, 2018). Estas conexiones sugieren una interacción entre los ritmos circadianos y las conductas reforzantes. Diversos estudios han propuesto que modificaciones en los ritmos circadianos afectan la salud de un organismo, incluyendo la proclividad al consumo de sustancias de abuso, e inversamente, el uso de sustancias de abuso causa cambios en los ritmos circadianos que comprometen la salud de un individuo (Logan, Williams & McClung, 2014; Damaggio & Gorman, 2014).

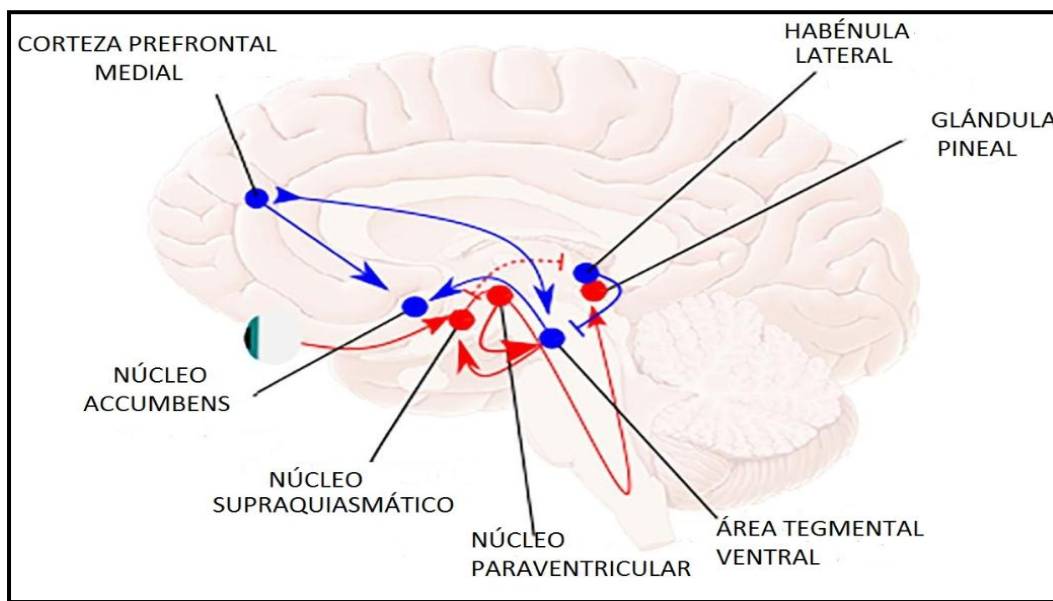


Figura 3. Interacción entre el sistema circadiano y el sistema de recompensa. Durante la sincronización por luz (flechas rojas), la información fótica se transmite desde la retina al Núcleo Supraquiasmático (NSQ), que envía señales inhibitorias al Núcleo paraventricular, previniendo de esta manera la liberación de melatonina de la glándula pineal. El Núcleo paraventricular también afecta directamente al sistema de recompensa a través del Área tegmental ventral y el Núcleo *accumbens* (NAc), mientras que la ritmicidad en el NSQ está afectada por las entradas provenientes del Área tegmental ventral. El NSQ también tiene una señalización inhibitoria recíproca con la habénula lateral para controlar la ritmicidad. Estas conexiones regulan la señalización de recompensa del área tegmental ventral y la señalización inhibitoria de la corteza prefrontal, cambiando los ritmos del comportamiento de búsqueda de drogas que es controlado por el NAc. Tomado y modificado de (Gulick & Gamsbv. 2018).

Bainier, Mateo, Felder-Schmittbuhl & Mendoza (2017) reportaron que la cepa de ratones macho C57BL/6J tiene preferencia por el consumo de una solución calórica (sacarosa) dependiendo de la hora del día, con un aumento en el consumo por la noche, también mostraron diferencias en la expresión de los genes reloj *Per1* y *Per2*, que participan en la generación de ritmos circadianos a lo largo del día, en el NAc, corteza cingulada, caudado putamen y NSQ. También se ha reportado en ratas, diferencias dependientes de la hora del día para la autoadministración de cocaína (Bass, Jansen & Roberts, 2010). En humanos se ha relacionado al cronotipo vespertino (personas con mayor rendimiento para realizar actividades durante la noche) con un mayor consumo de alcohol, comparados con los cronotipos matutinos (personas con mayor rendimiento por la mañana) (Watson, Buchwald, & Harden, 2013).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, la Encuesta Nacional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco 2016-2017 (ENCODAT) indica que, en la población de 12 a 65 años, el 71% ha consumido alcohol alguna vez en la vida, que el 2.2% (1.8 millones) tiene una posible dependencia al alcohol, y un aumento del 13.9% en el 2011 a 22.1% en el 2016, del consumo excesivo de alcohol en el último mes (beber cinco copas o más en los hombres y cuatro o más copas en las mujeres, en una sola ocasión). No está claro por qué algunos sujetos desarrollan una dependencia al consumo de alcohol y otros se mantienen como consumidores sin desarrollar dependencia. Este trabajo es un acercamiento a identificar posibles factores de riesgo.

Se ha descrito que las experiencias infantiles adversas (abuso sexual, violencia familiar, cuidado negligente, maltrato infantil, abuso de sustancias por parte de la familia, delincuencia familiar) pueden predisponer a una persona a desarrollar adicción al alcohol, en etapas posteriores de la vida (Felitti et al., 1998; Van der Vegt et al., 2009; Mersky, Topitzes & Reynolds, 2013; Lee & Chen, 2017 & Dube et al., 2003). También se ha documentado que las experiencias infantiles

adversas están relacionadas con alteraciones en el ciclo sueño-vigilia (Koskenvuo, Hublin, Partinen, Paunio & Koskenvuo, 2010; Chapman et al., 2011 & Kajeepeeta, Gelaye, Jackson & Williams, 2015).

En el presente texto se ha mencionado que en ratas la PCM, durante las 2 primeras semanas posnatales, puede conducir a cambios en el cerebro de un individuo y predisponerlo al consumo de alcohol, tal como lo reportaron Romano-López, Méndez-Díaz, Ruiz-Contreras, Carrisoza & Prospéro-García, (2012), que tras un protocolo PCM de 6 horas diarias en ratas, del DPN 2-14, los sujetos mostraron en la adultez un mayor consumo de alcohol en comparación del grupo control SPCM, además se encontró un aumento del receptor CB1 en el estriado ventral y una reducción en la CP, estructuras que se hipotetiza participan para generar abuso de sustancias.

Rosenwasser et al. (2005) mostraron que existe una relación entre los ritmos circadianos y el consumo de alcohol, a través de la evaluación del ritmo endógeno medido por la actividad de la rueda de ejercicio, en ratas de las cepas *Prefering (P)* y *Hight Alcohol Drinking (HAD2)*, que han sido seleccionadas mendelianamente para un mayor consumo de alcohol, y sus respectivos controles, *Non preferring (NP)* y *Low alcohol Drinking (LAD2)*. Encontraron una disminución de la duración del periodo endógeno en ambas cepas con preferencia por el etanol, en comparación a los grupos control.

La evidencia publicada en la literatura científica indica que la PCM induce una mayor ingestión de alcohol en ratas. Asimismo, las evidencias experimentales muestran que las ratas altas consumidoras de alcohol (*P* y *HAD2*) tienen ritmos circadianos diferentes a sus grupos controles. Sin embargo, se desconoce el impacto de la PCM sobre la homeostasis endógena del ritmo circadiano de ingesta de agua, en ratas macho de 60 a 117 días de vida.

2.1 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿La PCM modifica el ritmo circadiano de ingesta? ¿La PCM contribuye a aumentar el consumo de alcohol en la edad adulta de ratas Wistar macho?

3. HIPÓTESIS GENERAL

La privación de cuidado materno modifica el ritmo circadiano de ingesta y aumenta el consumo de alcohol en la edad adulta de ratas Wistar macho.

3.1 HIPÓTESIS PARTICULARES

La privación de cuidado materno modifica la expresión de la actividad de ratas macho en relación al ciclo luz-oscuridad.

La privación de cuidado materno afecta los días transitorios de re-sincronización en ratas macho.

El ciclo de actividad-reposo está afectado en las ratas PCM en relación a las ratas sin PCM que tienen acceso a alcohol en una condición sincronizada.

La privación de cuidado materno afecta la cantidad de agua, comida y alcohol que las ratas consumen.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar si la privación de cuidado materno modifica el ritmo circadiano de ingesta y el consumo de alcohol en ratas adultas macho.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar si la PCM modifica la cantidad de actividad en la fase de actividad y en la fase de reposo, durante una condición sincronizada por luz en ratas macho.
2. Determinar si la PCM modifica la cantidad de actividad, en la fase de actividad y en la fase de reposo, del ritmo circadiano endógeno en ratas macho.
3. Determinar si la PCM afecta los días transitorios de re-sincronización.
4. Determinar si existen diferencias en la cantidad de actividad, en la fase de actividad y en la fase de reposo en sujetos con PCM y sin PCM que tienen acceso a alcohol en una condición sincronizada.
5. Determinar si la PCM afecta la ingesta de agua, comida y alcohol.

5. MATERIALES Y MÉTODO

5.1 SUJETOS

Se emplearon 6 ratas hembras gestantes a término, de la cepa Wistar, provenientes del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM, para obtener una muestra de 20 sujetos machos. Las gestantes se alojaron individualmente en cajas de policarbonato, en el laboratorio de Cannabinoides, bajo un ciclo invertido luz-oscuridad 12 h, las luces fueron encendidas a las 20:00 h. El alimento y agua estuvieron disponible *ad libitum* durante todo el experimento.

Todos los sujetos fueron manipulados bajo los criterios del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

5.2 EQUIPO Y MATERIALES

-Para la crianza:

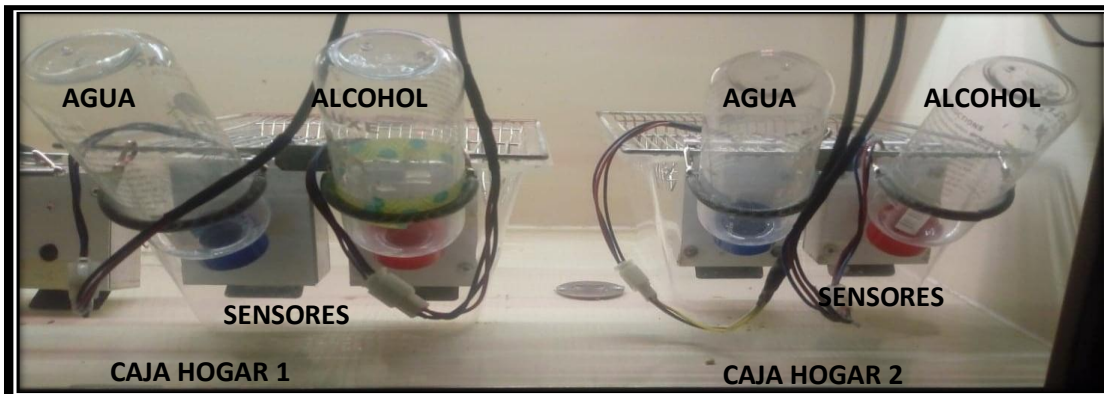
Las hembras gestantes se colocaron individualmente, en cajas Jumbo transparentes de policarbonato de 43x53x20 cm (ancho x largo x alto). Las crías macho fueron alojadas en cajas con las mismas dimensiones, del DPN 21-60 en grupos de 3 o 4 integrantes.

-Para el registro del ritmo circadiano de ingesta de líquido (agua/alcohol):

En el DPN 60 los sujetos fueron alojados en cajas individuales de acrílico transparente [plexiglass] de 25x37x20 cm (ancho x largo x alto). La iluminación se controló por un temporizador en ciclos 12-12, encendiendo la luz a las 8:00 h, en esta fase cada caja recibió 600 luxes. Para aislar el experimento, las cajas se colocaron en un gabinete metálico con ventilación e iluminación controlada. La ventilación permitió el recambio del aire 35 veces por hora. Para el registro de los ritmos de la ingesta de líquidos, usamos el sistema SPAD9 de Omniaiva (www.omniaiva.com, Estado de México, México).

Al interior de cada caja hogar se colocaron dos sensores por separado, cada uno con una abertura por el centro que permitía a la rata meter el hocico y beber de la boquilla de una botella. La capacidad de cada botella fue de 500 ml que permitió almacenar agua o alcohol (de acuerdo a la condición experimental). Cada sensor tuvo una resolución temporal de 0.25 segundos, donde el sistema registro si el sujeto estuvo presente, si esto sucedía, se consideraba como un evento. Todos los sensores se conectaron a una interfaz de registro la cual envía los datos a una computadora personal. A través del sistema SPAD y el programa MATLAB se obtuvo el número de eventos diarios en bloques de 15 minutos, correspondientes a las botellas por separado de cada sujeto. Adicionalmente, el programa MATLAB permitió visualizar los eventos registrados diariamente en cada botella, a través de la construcción de actogramas. En el eje de las ordenadas al origen se representan las horas y en el eje de las abscisas se muestran los días. La altura de cada barra del actograma representa el número de eventos registrados, en bloques de 15 minutos. En la figura 4 se ilustra el equipo de registro para el protocolo de ritmos circadianos.

A



B



Figura 4. Equipo para el registro del ritmo circadiano ingesta de líquido. A) Muestra dos cajas hogar, cada una contiene por dentro dos sensores independientes, con una abertura por el centro, permitiendo ingresar externamente la boquilla de una botella para que el sujeto pueda beber de ella. B) Se observa el gabinete metálico sonoamortiguado en el que se colocan las cajas hogar, y la computadora de registro en la que se almacenan los datos provenientes de los sensores.

La medición del peso corporal, consumo de comida y líquidos se realizó con una báscula electrónica Ohaus.

5.3 ALIMENTO Y LÍQUIDOS

Los sujetos fueron alimentados *ad libitum* con dieta estándar (Purina Rat Chow, Brentwood MO). El alcohol se obtuvo de PUREX (DF, México), y se usó a una dilución del 10% en agua.

6. PROCEDIMIENTO

Las ratas gestantes a término (dos semanas antes del nacimiento de las crías) fueron alojadas individualmente en cajas de policarbonato con cama de aserrín, en el bioterio del Laboratorio de Cannabinoides de la Facultad de Medicina, con humedad del $60\% \pm 10\%$ y temperatura de $21^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$, se les mantuvo en un ciclo invertido luz-oscuridad 12:12 h (la luz se encendió a las 20:00 h y se apagó a las 8:00 h), para poder llevar a cabo el protocolo de PCM en la fase de actividad. Una vez que las crías nacieron (incluidos machos y hembras), se mantuvieron en la misma caja con su madre y se llevaron a cabo los protocolos de PCM o SPCM que se detallan más adelante. Cada madre con su camada, fue asignada aleatoriamente a alguno de los protocolos PCM o SPCM. Las camadas se conformaron considerando solo hermanos y de máximo 10 sujetos, cuando el número de crías fue mayor se sacrificaron en el DPN 2, esto se hizo con la finalidad de homogeneizar la lactancia para las crías y evitar posible desnutrición.

Las crías se mantuvieron en las mismas condiciones que las gestantes, hasta el día del destete (DPN 21), con la única modificación de cambio de bioterio con un CLO estándar 12:12 horas (la luz se encendió a las 8:00 h y se apagó a las 20:00 h). Esta manipulación se llevó a cabo para que coincidiera la fase de luz para las crías y el experimentador, y facilitar el cambio de aserrín, alimento y líquidos. En el DPN 21 los sujetos se alojaron en grupos de acuerdo a su sexo, en este estudio solo se consideraron machos, las hembras fueron utilizadas para otro experimento, en este día las madres fueron sacrificadas. La muestra final se

conformó por 20 ratas machos, diez conformaron el grupo experimental, provenientes de dos camadas (4 y 6 sujetos respectivamente) y fueron sometidos al protocolo de PCM. La mitad restante se utilizó como grupo control SPCM y estuvo conformada por sujetos provenientes de 3 camadas (5, 3 y 2 respectivamente). Todos los sujetos fueron sometidos al protocolo de ritmo circadiano medido a través de la ingesta de líquido, con acceso a alcohol al final del experimento.

6.1 PROTOCOLO DE PRIVACIÓN DE CUIDADO MATERNO (PCM)

Se revisó diariamente a las gestantes para registrar el día de nacimiento de las crías el cual fue considerado como día posnatal 0 (DPN 0), y no se hizo ninguna otra manipulación hasta el DPN 2; este día comenzó la privación de cuidado materno, finalizando el DPN 15. El procedimiento consistió en separar a la madre de la camada por tres horas diarias, de las 8:30 a.m. a las 11:30 a.m., se separó de manera cuidadosa a la madre (procurando la mínima manipulación de las crías) y fue colocada en una nueva caja con aserrín limpio y del proveniente, al finalizar las 3 hrs la madre fue regresada a la caja con sus crías. Después de este periodo de 14 días de PCM, las crías y la madre no fueron manipuladas más que por los cuidados propios de limpieza. Las crías permanecieron con la madre hasta el DPN 21, momento en que termina la lactancia (destete). A partir de ese momento se separó permanentemente a las crías de la madre y se formaron grupos de 3-4 sujetos hasta el DPN 60.

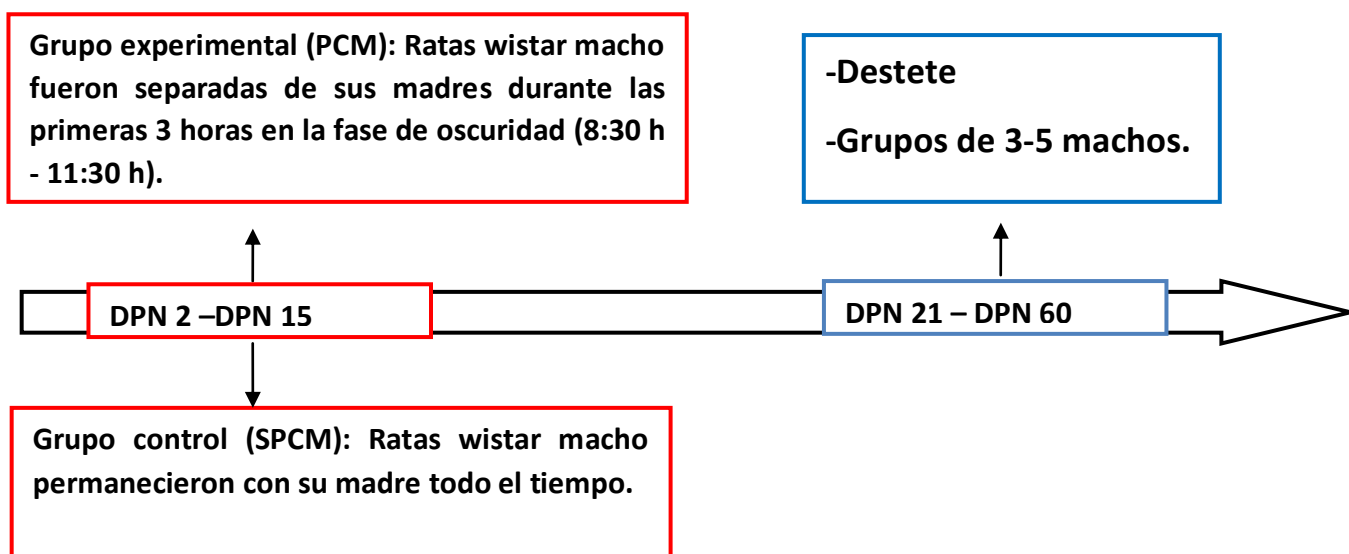
El grupo control (SPCM), se mantuvo bajo las mismas condiciones que el grupo PCM con excepción de la privación de cuidado materno, las crías permanecieron todo el tiempo y todos los días con su madre y se manipularon únicamente para cuidados de limpieza, los cuales se llevaron a cabo los mismos días y a la misma hora que en el grupo PCM, es decir, lunes, miércoles y viernes a las 11:30 hrs. También estuvieron en el bioterio de ciclo invertido hasta el DPN21, luego fueron trasladadas al bioterio con ciclo estándar y fueron alojados en grupos de 3-4 sujetos hasta el DPN 60.

6.2 PROTOCOLO PARA EL REGISTRO DE RITMOS CIRCADIANOS

En el DPN 60 las ratas se colocaron en cajas individuales en el equipo automatizado descrito previamente, dentro de un compartimento con capacidad para ocho sujetos, se colocaron de forma alterna, es decir un sujeto control, un sujeto experimental y así sucesivamente. Dicho equipo registró el ritmo de la ingesta de líquidos (los sensores detectaron cada 0.25 de segundo si el sujeto se acercó a la botella). Se instalaron 2 botellas de agua durante 10 días en el CLO, 12:12, luces encendidas a las 8:00 h, para registrar la línea base; seguido de 2 semanas en oscuridad constante (O-O), para evaluar el ritmo endógeno. Durante 2 semanas más regresaron al CLO para evaluar el tiempo que tomaron en re-sincronizarse. En los 19 días de CLO siguientes se sometieron al consumo voluntario de alcohol (1 botella con 10 % de alcohol en agua y la otra de agua). Las botellas que contuvieron alcohol fueron seleccionadas aleatoriamente. Diariamente, se registró manualmente a las 8:30 h el consumo de alimento, alcohol y/o agua (*ad libitum* durante todo el experimento) y peso corporal.

PROCEDIMIENTO

A) PROTOCOLO DE CUIDADO MATERNO



B) PROTOCOLO PARA EL REGISTRO DEL RC DE INGESTA

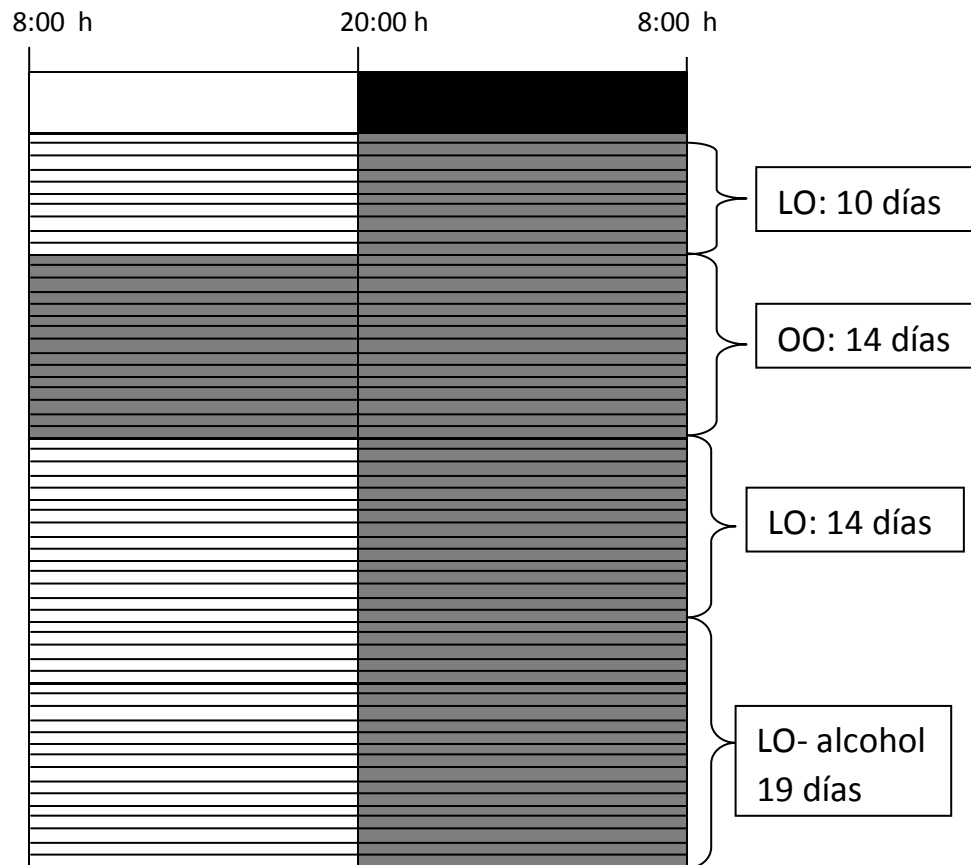


Figura 5. Esquema de los Procedimientos. **A)** muestra los protocolos de cuidado materno (PCM y SPCM). **B)** Muestra el protocolo para el registro del RC de ingesta: Línea base (LO-10 días), las luces fueron encendidas a las 8:00 h. Oscuridad continua (OO-14 días). Resincronización (LO-14 días). Acceso a alcohol voluntario (LO-alcohol 19 días) los sujetos tienen acceso a una botella con alcohol al 10%, y otra botella de agua. Los alimentos y líquidos estuvieron disponibles *ad libitum*.

NOTA: Durante el protocolo de ritmos circadianos, el consumo de líquidos, comida y peso corporal fue medido manualmente a las 8:30 h todos los días, con excepción de la condición de oscuridad constante.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El consumo de comida y alcohol de cada sujeto fue obtenido a través de un índice, que refleja la cantidad que el sujeto consume de acuerdo con su peso corporal; $(g. \text{ de alimento} / \text{ peso corporal}) * 100$ y $(g. \text{ de alcohol} / \text{ peso corporal}) * 100$. El consumo de agua también se obtuvo a través de un índice $(ml \text{ de agua} / \text{ peso corporal}) * 100$ y durante la fase de alcohol se consideró el volumen total del líquido $(ml \text{ de agua} + ml \text{ de alcohol}) / \text{ peso corporal} * 100$. Estos datos se registraron diariamente, y el análisis estadístico se hizo considerando las mediciones por condición, a excepción de la fase de oscuridad constante donde no se registraron datos de los consumos. Los datos se representan como media \pm error estándar.

Los datos de los ritmos circadianos fueron obtenidos a través del sistema SPAD9 de Omnia y visualizados con el programa MATLAB. Para conocer la duración del periodo circadiano en minutos se generaron actogramas con una resolución de 15 minutos. Los actogramas son representaciones gráficas con el ordenamiento consecutivo de eventos a lo largo de un día (en este caso acercamiento a la botella por parte del sujeto) durante n días, para una mejor visualización, los días se grafican doblemente. Adicionalmente, se obtuvo por cada botella la cantidad de actividad (número de eventos), a través de una hoja de texto, que muestra el número de eventos diarios divididos en bloques de 15 minutos.

Los actogramas fueron analizados como lo reporta Vega (1993). El periodo se obtuvo al sumar la duración de la actividad más la del reposo, lo cual es posible a través del programa MATLAB, marcando el momento (minuto) en que inicia y termina cada fase, ver figura 6A. En condiciones de oscuridad constante se trazó una pendiente como se muestra en la figura 6B. La duración del periodo obtenida de esta forma coincidió con la duración del periodo obtenida al realizar un análisis de periodo en el sistema SPAD9 y MATLAB.

Para saber cuántos días tardaban en re-sincronizarse los sujetos (después de haber pasado por oscuridad constante), se trazaron dos líneas conforme la actividad del sujeto se ajustaba a la hora de apagado de las luces y se consideró como sincronización el momento en que la fase de actividad se ajustó al sincronizador, y el periodo duró 24 h ver figura 6C.

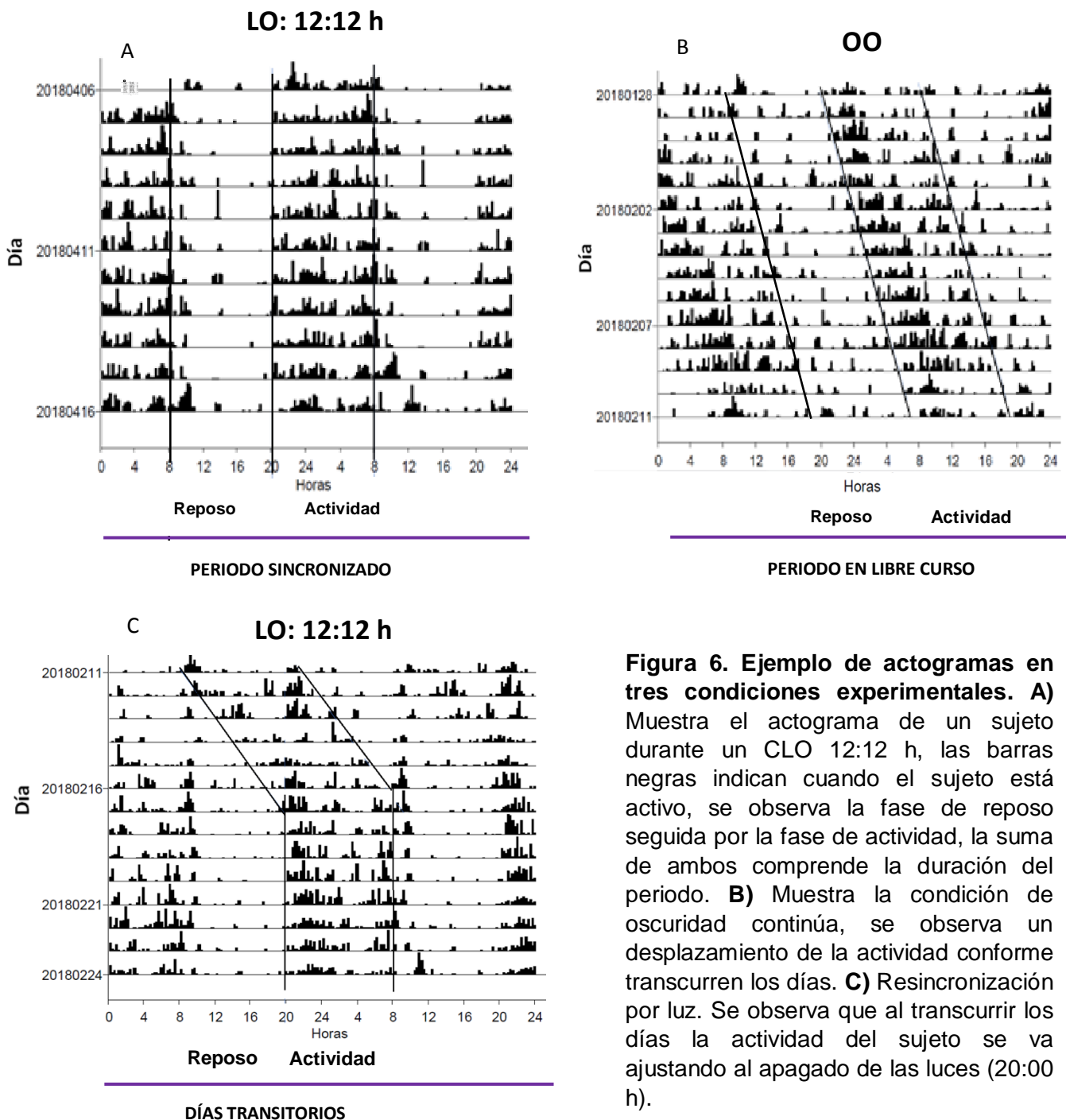


Figura 6. Ejemplo de actogramas en tres condiciones experimentales. A) Muestra el actograma de un sujeto durante un CLO 12:12 h, las barras negras indican cuando el sujeto está activo, se observa la fase de reposo seguida por la fase de actividad, la suma de ambos comprende la duración del periodo. **B)** Muestra la condición de oscuridad continua, se observa un desplazamiento de la actividad conforme transcurren los días. **C)** Resincronización por luz. Se observa que al transcurrir los días la actividad del sujeto se va ajustando al apagado de las luces (20:00 h).

Como se mencionó anteriormente, los sensores del sistema registran cada 250 ms de segundo, si el sujeto se encuentra presente en el sensor que recubre la boquilla (registros independientes por botella), de ser el caso se registra como un evento, permitiendo delinear un perfil diario del ritmo de ingesta. En el presente trabajo también fue de interés conocer la cantidad de actividad (suma de los eventos) que presentan los grupos experimentales durante la fase de actividad y la fase de reposo del CLO, en el último día de cada condición experimental. Se trazó un perfil de actividad y se determinó la cantidad de actividad total en cada fase. El interés de medir el ritmo circadiano de ingesta fue conocer el perfil de ingesta de alcohol entre ratas SPCM y PCM.

En el caso del perfil de actividad en la condición de oscuridad constante se consideraron las últimas 48 horas, debido a que el ritmo se encuentra en libre curso y para poder observarlo se requiere de más de 24.8 de hora (duración aproximada del periodo endógeno), además de que no existe un patrón claro del momento en que se encuentra en actividad y en reposo. Por lo que el análisis estadístico se llevó a cabo como la suma total de actividad durante 48 horas, sin dividirlo por fase de actividad y fase de reposo como sucede en condiciones sincronizadas. Se escogió el último día de cada condición experimental considerando que el perfil circadiano se ha establecido.

Los sujetos que tuvieron algún sensor dañado fueron descartados para el análisis estadístico, al final se consideraron 8 sujetos por grupo. Los datos se analizaron con el programa STATISTICA, versión 12.

Para conocer posibles diferencias del consumo de comida, agua, duración del periodo y cantidad de actividad a lo largo de las condiciones experimentales (línea base, oscuridad constante, resincronización, fase de alcohol) se utilizó un Análisis de Varianza (ANOVA) de medidas repetidas, teniendo como factores el grupo y la condición experimental. El nivel de significancia utilizado fue $p < 0.05$. Si los resultados indicaron diferencias estadísticamente significativas, se llevaron a

cabo pruebas *post hoc* Tukey. El consumo de alcohol, así como la latencia de resincronización y la cantidad de actividad en la fase de oscuridad se analizó con una prueba t de Student para muestras independientes. En el caso de los análisis de la cantidad de actividad, los datos se obtuvieron de la suma de los eventos en las 2 botellas de agua, en la condición de alcohol se sumaron los eventos de la ingesta de agua más los eventos de la ingesta de alcohol para poder obtener la cantidad de actividad total, adicionalmente se hicieron análisis de las botellas por separado. Durante la fase de alcohol se consideró una medición en el día 9 (mitad de la condición) y otra en el último día (día 19), para poder observar posibles cambios en la cantidad de actividad, debidos al tiempo (en días) de exposición al alcohol.

Adicionalmente, en la condición de alcohol se llevaron a cabo análisis por separado, para conocer si existían diferencias entre los grupos con respecto a la cantidad de actividad (eventos) que presentaron durante la ingesta de agua y alcohol. Para conocer la estabilidad del perfil de ingesta de alcohol se seleccionó un día intermedio en la condición y el último día, es decir, el día 9 y el día 19. Se llevó a cabo un índice de preferencia (eventos registrados para la ingesta de agua - eventos para la ingesta de alcohol/ total de eventos). Si los valores tienden a 1, se registró más actividad durante la ingesta de agua; si tienden a -1 se registró más actividad durante la ingesta de alcohol, y si tienden a 0 no existe preferencia entre la actividad registrada durante la ingesta de agua y la de alcohol. Estos datos se analizaron con un ANOVA para medidas repetidas.

8. RESULTADOS

En las figuras 7 y 8 se muestran los actogramas representativos de un sujeto control (SPCM). En las figuras 9 y 10 se muestran los actogramas correspondientes a un sujeto experimental (PCM).

En las figuras 7 (SPCM) y 9 (PCM), se observa los actogramas de ingesta de agua (durante todo el experimento), las líneas horizontales indican el inicio de cada condición. Los primeros 10 días corresponden a la línea base CLO 12 h, se observa menor cantidad de actividad durante la fase de reposo, con un incremento de la actividad durante la fase oscuridad, entre las 20:00 h y 8:00 h. La siguiente condición fue de 14 días en oscuridad constante (O-O), se observa que la actividad de los sujetos se va desplazando hacia la derecha cada día, es decir se muestra un ritmo en curso libre. Durante los siguientes 14 días, los sujetos se mantuvieron en un CLO 12h, se observa que al transcurrir los días, los sujetos ajustan su actividad al *zeitgeber*, es decir, se sincronizan. En los últimos 19 días, los sujetos tuvieron acceso a alcohol en otra botella. El registro de la ingesta de agua no se modificó por la presencia del alcohol, se observa claramente la fase de reposo y la de actividad.

En las figuras 8 (SPCM) y 10 (PCM), se muestra los actogramas de la ingesta de alcohol, en los últimos 19 días del experimento. Antes del acceso a alcohol, la actividad de ambos sujetos, PCM y SPCM, es similar a la de ingesta de agua, anteriormente descrita. Durante la condición de alcohol, el sujeto PCM (figura 10) parece mantener una cantidad de actividad similar en ambas fases del CLO, no se observa claramente la fase de reposo y la fase de actividad.

INGESTA DE AGUA- SPCM

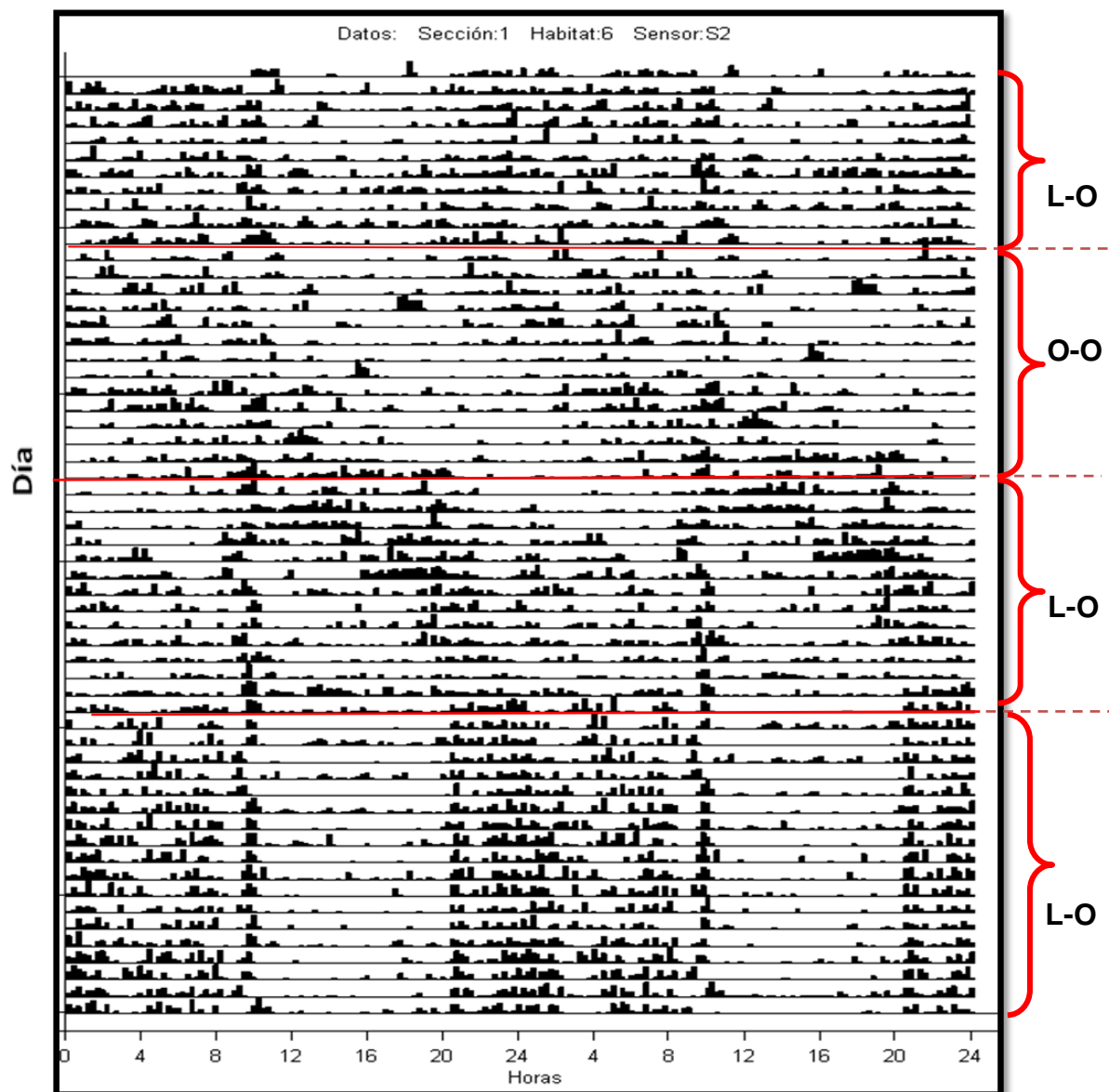


Figura 7. Actograma representativo de un sujeto SPCM, corresponde a la ingestión de agua. En el eje de ordenadas se muestran los días y en el eje de abscisas las horas. Las líneas horizontales y los corchetes en color rojo indican las condiciones. En la primera parte se observa 10 días de línea base, con las fases de reposo y actividad marcadas por un CLO 12:12 h. En la segunda parte se observa el ritmo en curso libre, 14 días en oscuridad continua. En la condición de resincronización, la actividad del sujeto se ajusta al CLO 12:12 h, 14 días. En los últimos 19 días el sujeto tiene acceso a otra botella con alcohol, este registro corresponde a la ingestión de agua. En las condiciones sincronizadas, a las 8:30 h aproximadamente, se observa una barra de actividad constante, debido a que en esta hora se llevaron a cabo las mediciones de consumos de alimento y peso de los sujetos.

INGESTA DE ALCOHOL- SPCM

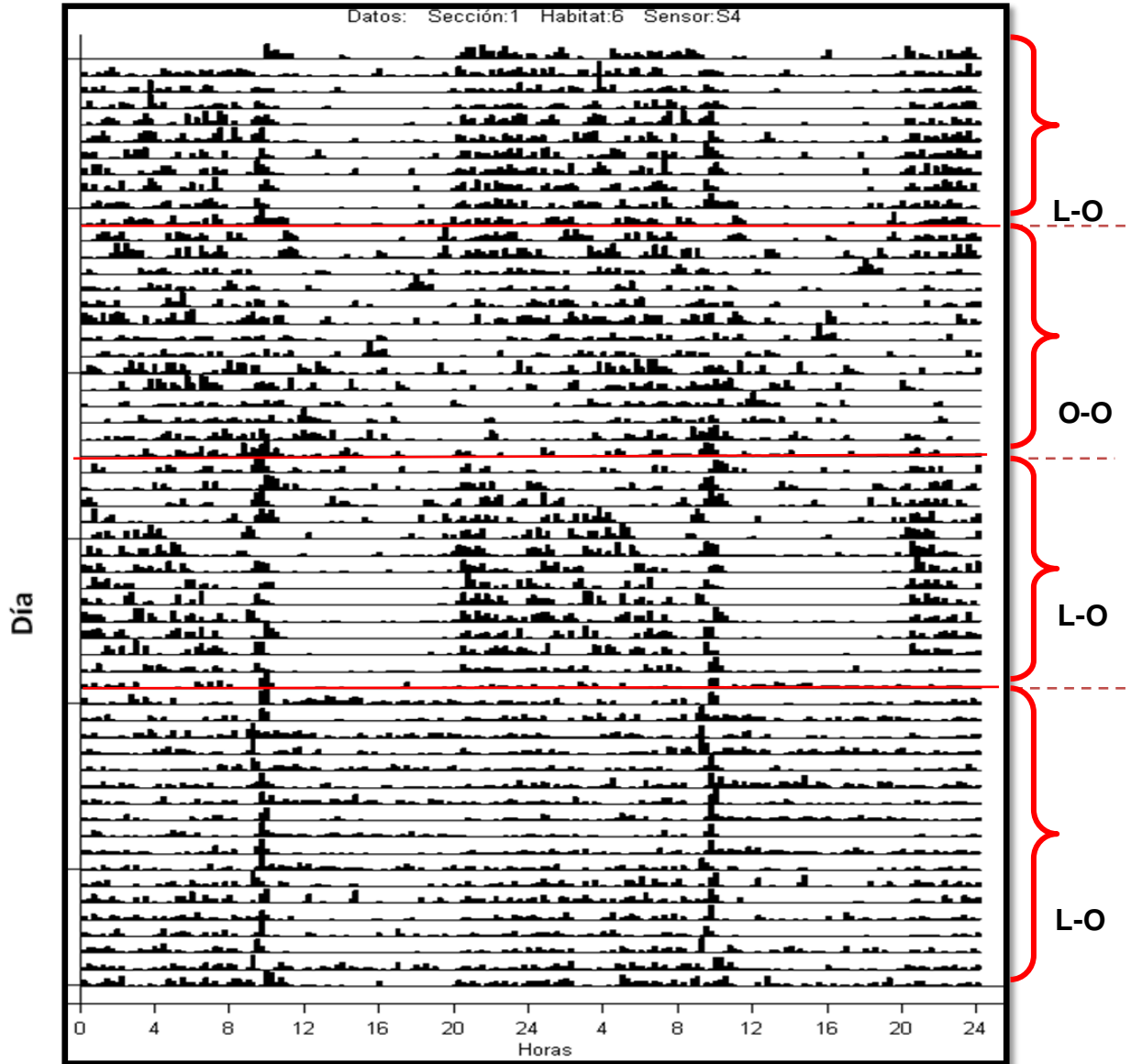


Figura 8. Actograma representativo de un sujeto SPCM, corresponde a la ingesta de alcohol. En el eje de ordenadas se muestran los días y en el eje de abscisas las horas. Las líneas horizontales en color rojo, indican el día que comenzó una nueva condición. En la primera parte se observa 10 días de línea base, con las fases de reposo y actividad marcadas por un CLO 12:12 h. En la segunda parte se observa el ritmo en curso libre, 14 días en oscuridad continúa. En la condición de resincronización, la actividad del sujeto se ajusta al CLO 12:12 h, 14 días. En los últimos 19 días el sujeto tiene acceso a una botella de agua y otra de alcohol. Este registro corresponde a la botella de alcohol, se observa que el sujeto presenta un perfil de actividad similar en ambas fases del CLO. En las condiciones sincronizadas, a las 8:30 h aproximadamente, se observa una barra de actividad constante, debido a que en esta hora se llevaron a cabo las mediciones de consumos de alimento y peso de los sujetos.

INGESTA DE AGUA- PCM

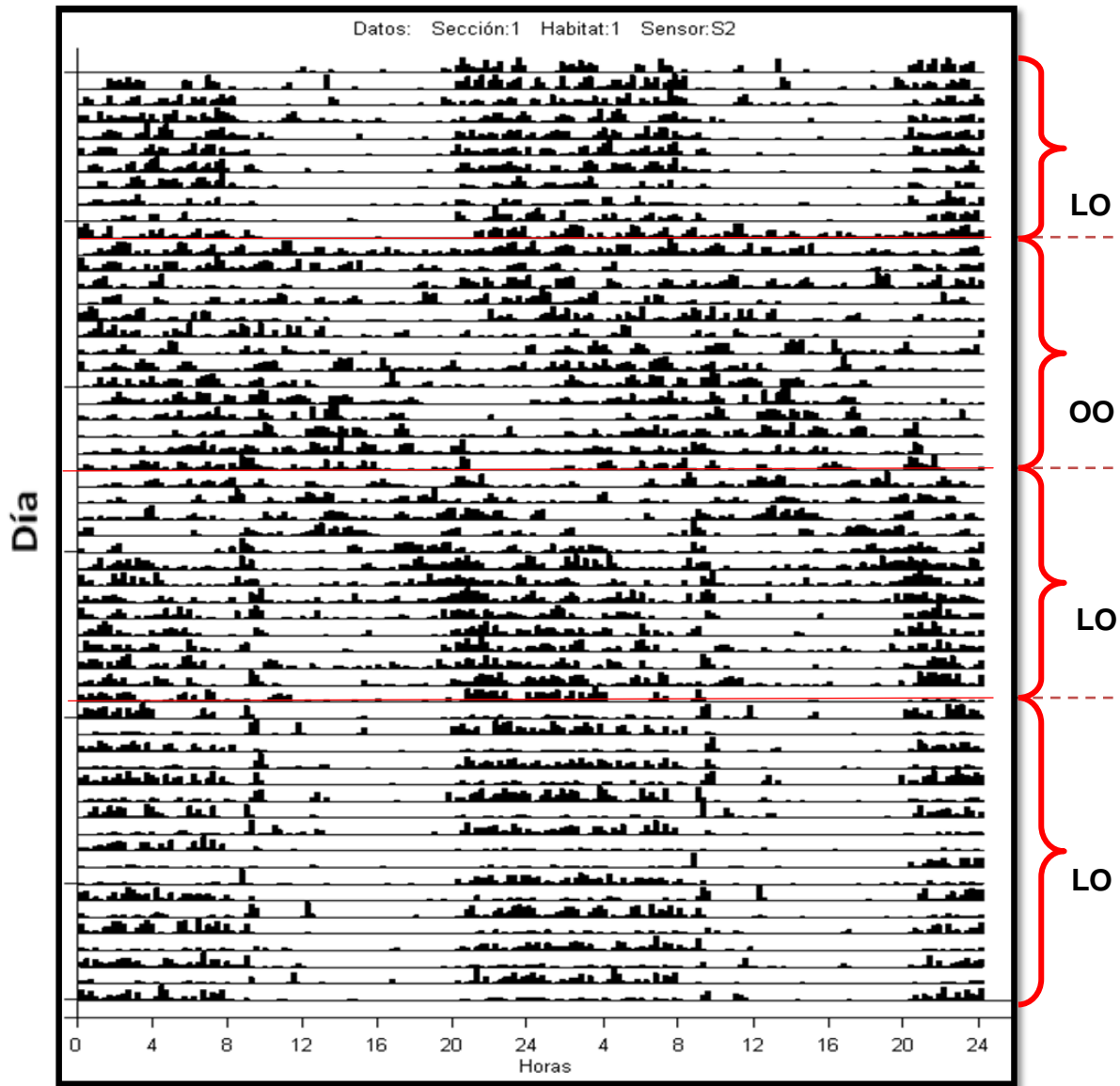


Figura 9. Actograma representativo de un sujeto PCM, corresponde a la ingesta de agua. En el eje de ordenadas se muestran los días y en el eje de abscisas las horas. Las líneas horizontales en color rojo, indican el día que comenzó una nueva condición. En la primera parte se observa 10 días de línea base, con las fases de reposo y actividad marcadas por un CLO 12:12 h. En la segunda parte se observa el ritmo en curso libre, 14 días en oscuridad continúa. En la condición de resincronización, la actividad del sujeto se ajusta al CLO 12:12 h, 14 días. En los últimos 19 días el sujeto tiene acceso a otra botella con alcohol, este registro corresponde a la botella de agua. En las condiciones sincronizadas, a las 8:30 h aproximadamente, se observa una barra de actividad constante, debido a que en esta hora se llevaron a cabo las mediciones de consumos de alimento y peso de los sujetos.

INGESTA DE ALCOHOL - PCM

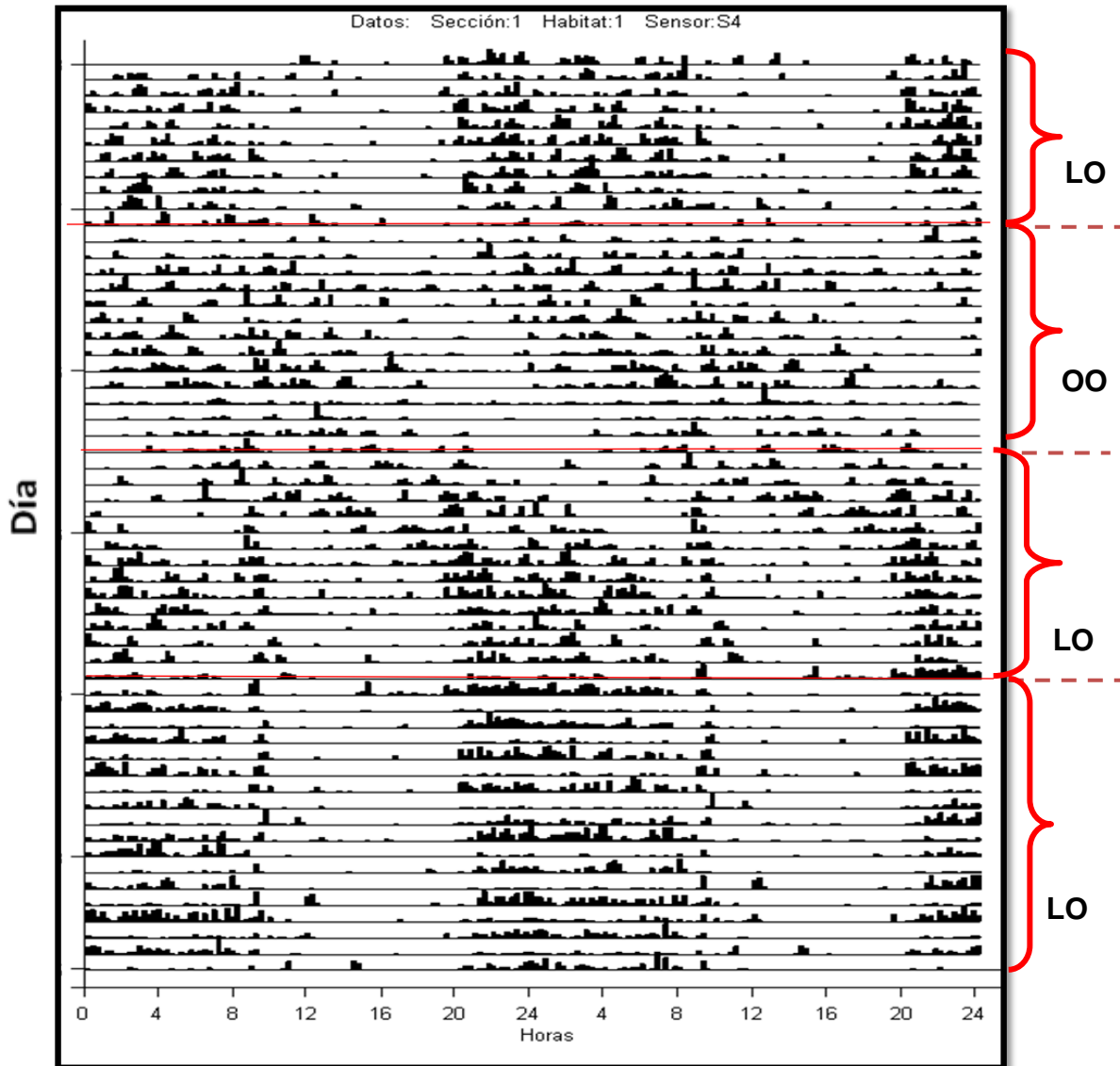


Figura 10. Actograma representativo de un sujeto PCM, corresponde a la ingestión de alcohol. En el eje de ordenadas se muestran los días y en el eje de abscisas las horas. Las líneas horizontales en color rojo, indican el día que comenzó una nueva condición. En la primera parte se observa 10 días de línea base, con las fases de reposo y actividad marcadas por un CLO 12:12 h. En la segunda parte se observa el ritmo en curso libre, 14 días en oscuridad continua. En la condición de resincronización, la actividad del sujeto se ajusta al CLO 12:12 h, 14 días. En los últimos 19 días el sujeto tiene acceso a otra botella con alcohol, este registro corresponde a la botella de alcohol. En las condiciones sincronizadas, a las 8:30 h aproximadamente, se observa una barra de actividad constante, debido a que en esta hora se llevaron a cabo las mediciones de consumos de alimento y peso de los sujetos.

8.1 RESULTADOS DE LA INGESTA DE COMIDA, AGUA Y ALCOHOL

En la comparación de consumo de comida, el ANOVA para medidas repetidas mostró que no hubo diferencias significativas entre los grupos [$p > 0.05$] ni interacción [$p > 0.05$]. Con un efecto significativo por condición [$F(2, 28) = 222.62$, $p < 0.0001$]. El análisis *post hoc* mostró que ambos grupos, SPCM y PCM consumieron menos alimento durante la condición de alcohol en comparación con la condición de línea base y resincronización; con un menor consumo durante la condición de resincronización en comparación con la condición de línea base, ver figura 11.

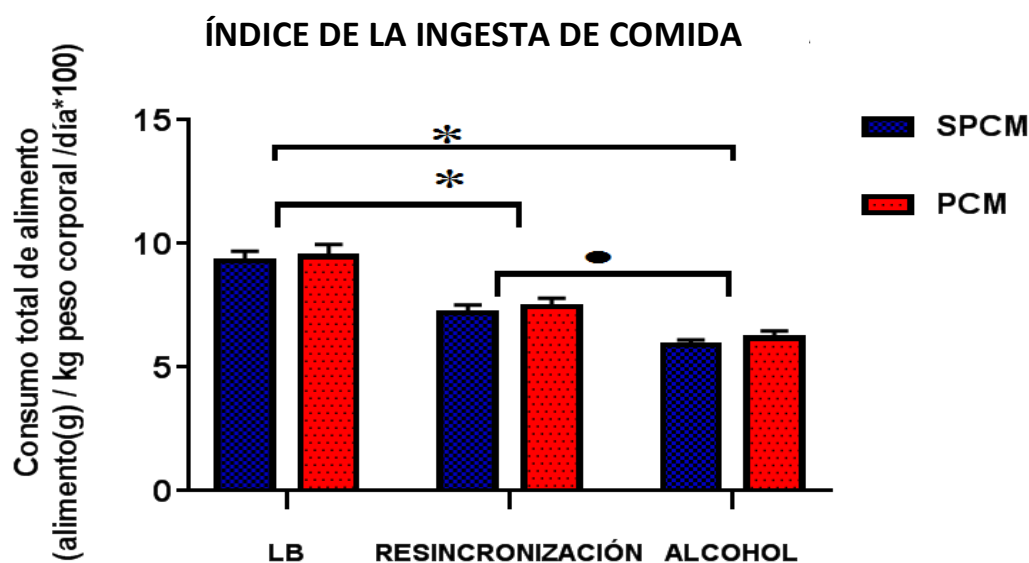


Figura 11. Índice de la ingesta de comida. Se muestran diferencias significativas por condición, ambos grupos consumen menos alimento durante la condición de alcohol y resincronización en comparación con la línea base, también consumen menos alimento durante la condición de alcohol en comparación con la de resincronización. Los datos se representan como media \pm error estándar, * $p < 0.05$ en comparación con la línea base; • $p < 0.05$ en comparación con la resincronización.

En la comparación de consumo de líquido, no se encontraron diferencias significativas entre grupos [$p > 0.05$] ni interacción significativa [$F(2, 8) = .85542, p > 0.05$]. Con un efecto estadísticamente significativo por condición [$p < 0.0001$]. La prueba *post hoc* mostró que los sujetos PCM y SPCM consumen más líquido durante la condición de línea base en comparación con las condiciones de resincronización y alcohol. Durante la condición de alcohol se consideró el volumen total de líquidos (agua+ alcohol al 10% disuelto en agua), ver figura 12.

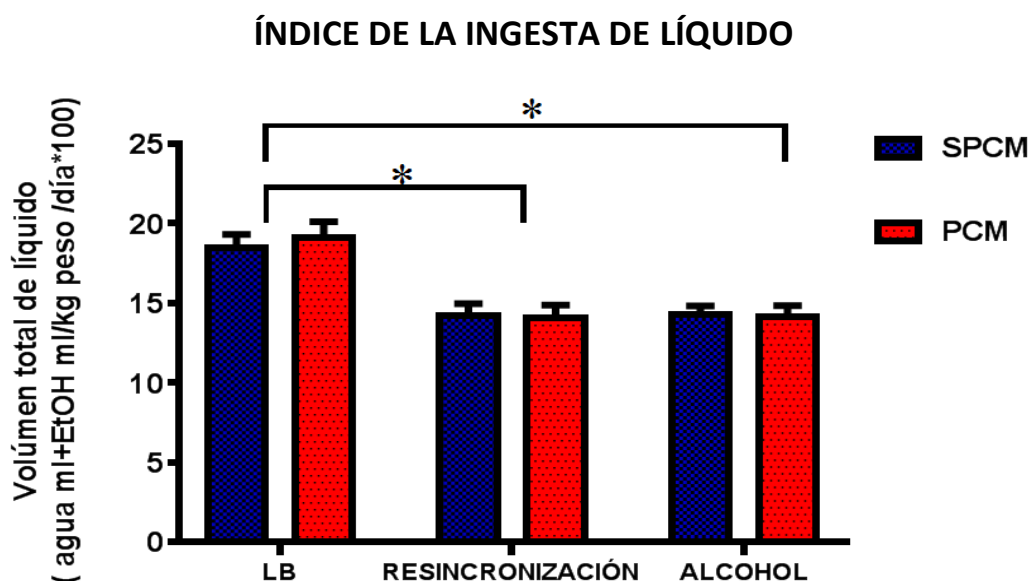


Figura 12. Índice de la ingesta de líquido. Se muestran diferencias significativas por condición, ambos grupos consumen más líquidos durante la condición de línea base en comparación con las condiciones de resincronización y alcohol. Durante la condición de alcohol se consideró el volumen total de líquidos (agua+ alcohol al 10% disuelto en agua). Los datos se representan como media \pm error estándar, * $p < 0.05$ en comparación con la línea base.

En el consumo de alcohol, no se encontró un efecto significativo entre los grupos PCM y SPCM [$t_{(14)} = 0.4079$, $p > 0.05$], ver figura 13.

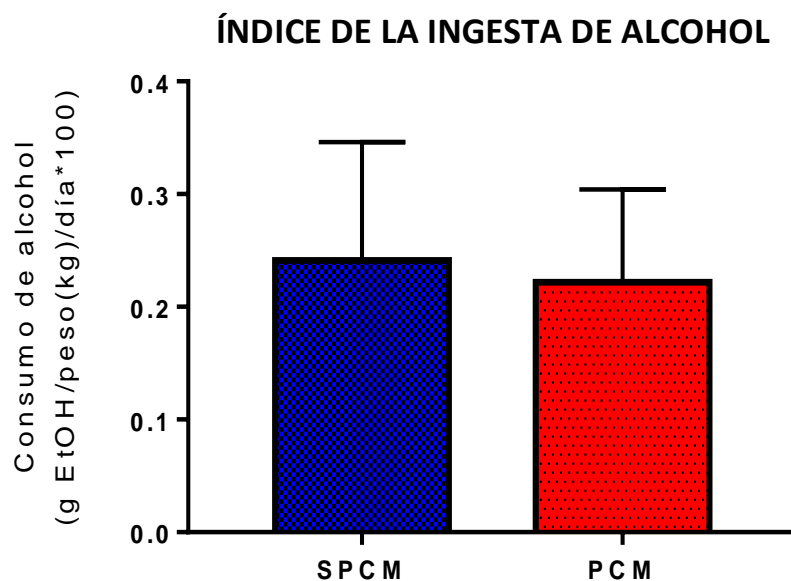


Figura 13. Índice de la ingesta de alcohol. No se encontraron diferencias significativas en el consumo de alcohol entre los grupos PCM y SPCM. Los datos se representan como $\text{media} \pm \text{error estándar}$, $p > 0.05$.

8.2 RESULTADOS DEL RITMO CIRCADIANO DE INGESTA

En la comparación de la duración del periodo, el ANOVA para medidas repetidas mostró que no hay diferencias significativas, entre grupos [$p > 0.05$] ni interacción significativa [$p > 0.05$]. Se muestra un efecto significativo por condición [$F(3, 42) = 117.03$, $p < 0.0001$]. El análisis post hoc mostró en ambos grupos, mayor duración del periodo en la condición de oscuridad constante comparado con la condición de línea base, resincronización y alcohol, ver figura 14.

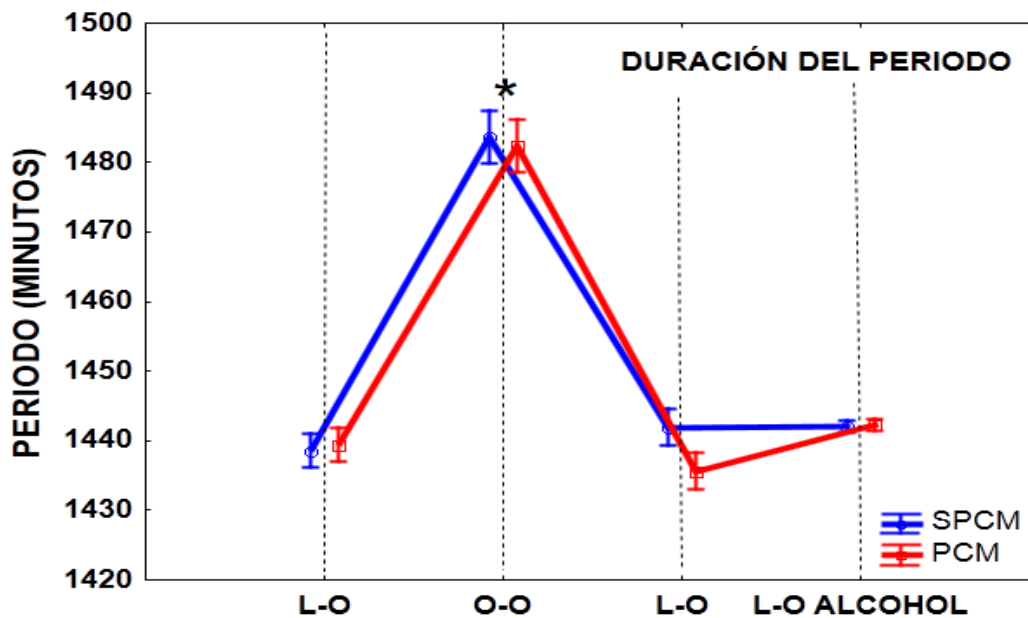


Figura 14. Duración del periodo en minutos. Muestra un efecto significativo por condición. Ambos grupos presentan mayor duración del periodo, durante la condición de oscuridad constante (O-O) en comparación con las condiciones de línea base y resincronización (L-O) y la condición de alcohol (L-O ALCOHOL). Los datos se representan como media \pm error estándar, * $p < 0.05$.

Durante los días transitorios de resincronización, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos SPCM y PCM [$p>0.05$], ver figura 15.

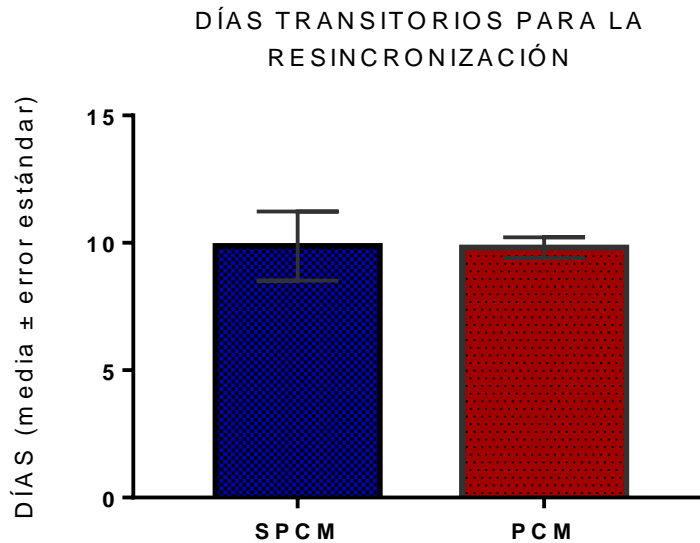


Figura 15. Días transitorios para la resincronización. Se muestra el promedio del número de días que tardan en resincronizarse los grupos SPCM y PCM. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Los datos se representan como media \pm error estándar, $p>0.05$.

El ANOVA para medidas repetidas mostró que no hay diferencias significativas en la cantidad de actividad durante el último día de la fase de reposo de las condiciones sincronizadas, sin efectos significativos por grupo [$p=0.059$] y condición [$p>0.059$]. Sin embargo, se encontraron efectos significativos por interacción [$F(3,42)=3.3415$, $p=.02807$]. Al realizar el análisis *post hoc* con la prueba de Tukey no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, ver figura 16A.

Resultados similares se encontraron en la cantidad de actividad durante el último día de la fase de actividad de las condiciones sincronizadas, sin diferencias significativas por grupo [$p>0.05$] ni interacción significativa [$F(3,42)=.54226$, $p>0.05$]. Se encontraron diferencias significativas por condición [$F(3,42)=4.7616$, $p=0.006$]. El análisis *post hoc* mostró que existe menor cantidad de actividad

durante la condición de acceso a alcohol en el día 19 en comparación con la condición de línea base, $p=0.0077$, y una tendencia de menor cantidad de actividad en el día 9, $p=0.0501$, Ver figura 16 B. En la figura 17 se muestran los perfiles de actividad durante las últimas 24 horas de cada condición.

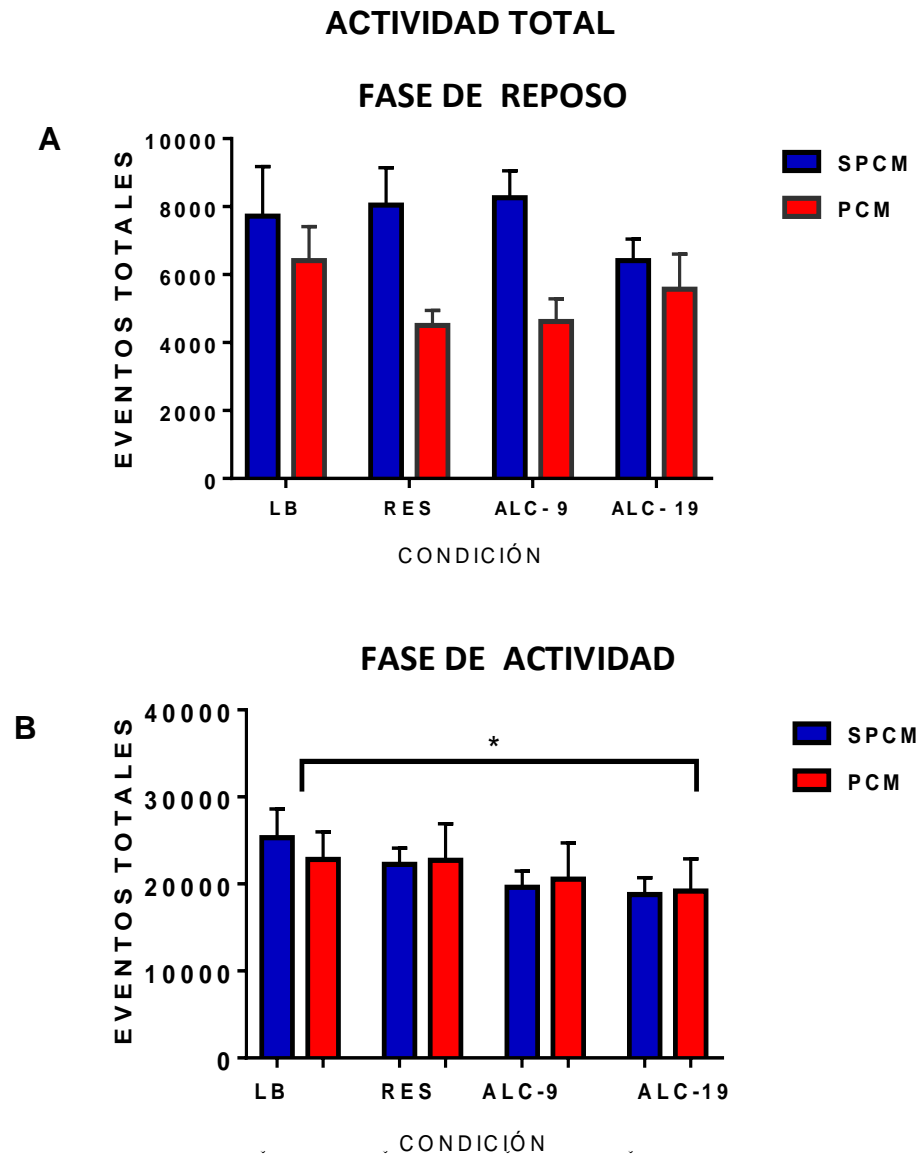


Figura 16. Actividad total durante el último día de las 3 condiciones sincronizadas. A) Muestra la cantidad de actividad durante la fase de reposo, sin diferencias significativas entre los grupos. **B)** Muestra la cantidad de actividad durante la fase de actividad, ambos grupos SPCM y PCM muestran disminución de la actividad durante la condición de alcohol en el día 19 $p<0.05$, y una tendencia de menor actividad en el día 9, $p=0.05$; en comparación con LB. Los datos se representan como media \pm error estándar, $p>0.05$.

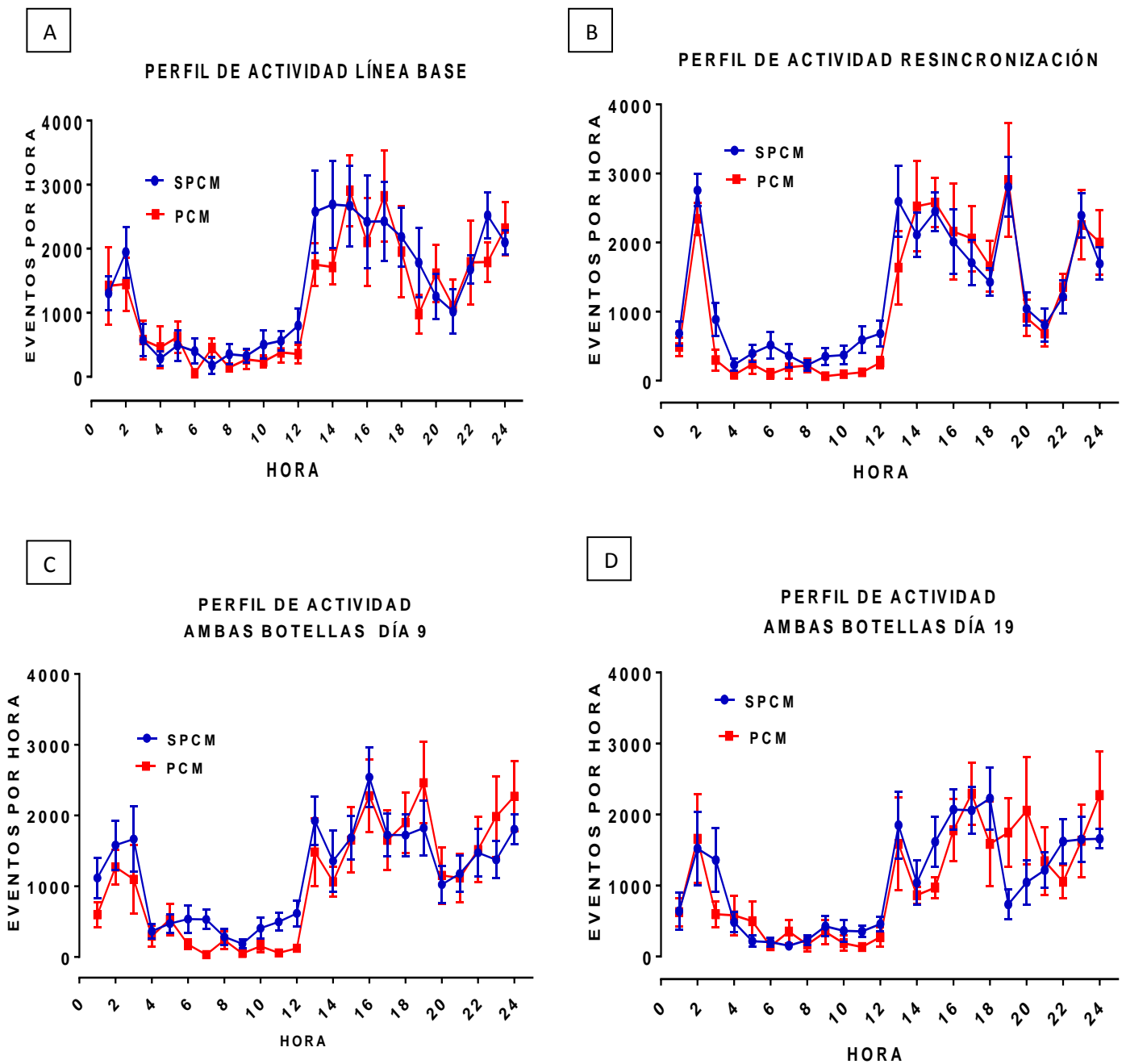


Figura 17. Perfiles de actividad del último día de cada condición sincronizada. A) Línea base, B) Resincronización, C) Alcohol día 9 y D) alcohol día 19. Los datos se representan como media \pm error estándar.

No se encontró un efecto significativo entre los grupos PCM y SPCM, en la cantidad de actividad durante las últimas 48 horas de la condición de oscuridad constante [$p > 0.05$], ver figura 18. Se muestra el perfil de actividad en la figura 19.

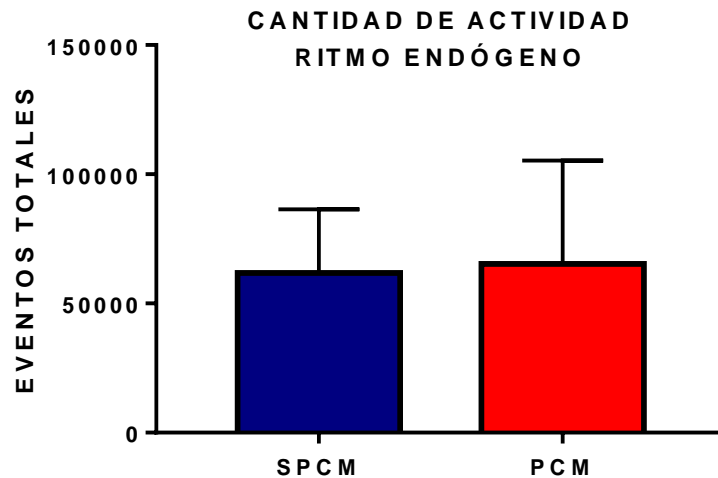


Figura 18. Cantidad de actividad durante las últimas 48 horas en la condición de oscuridad constante (O-O). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos SPCM y PCM, $p > 0.05$. Los datos se representan como media \pm error estándar.

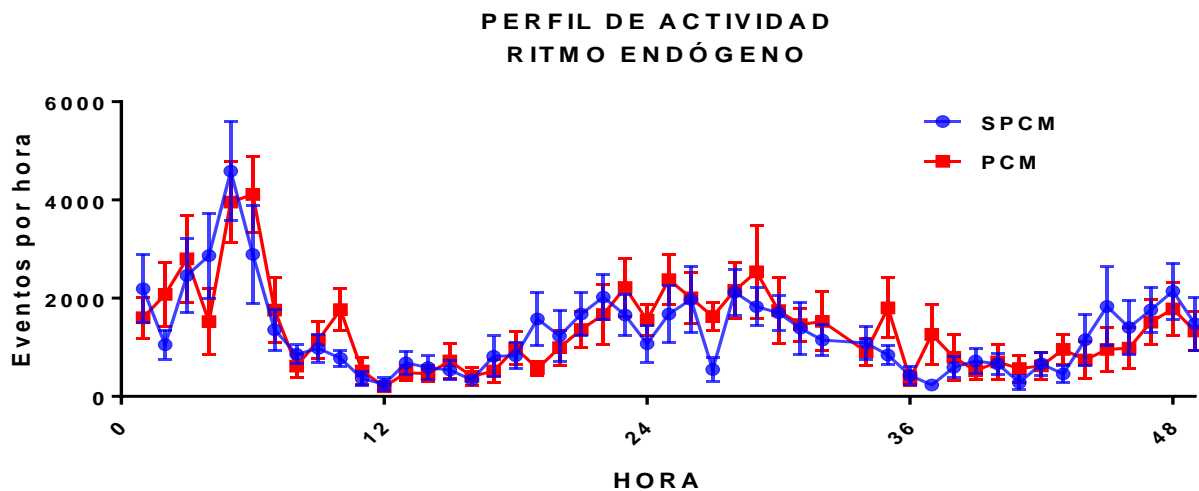
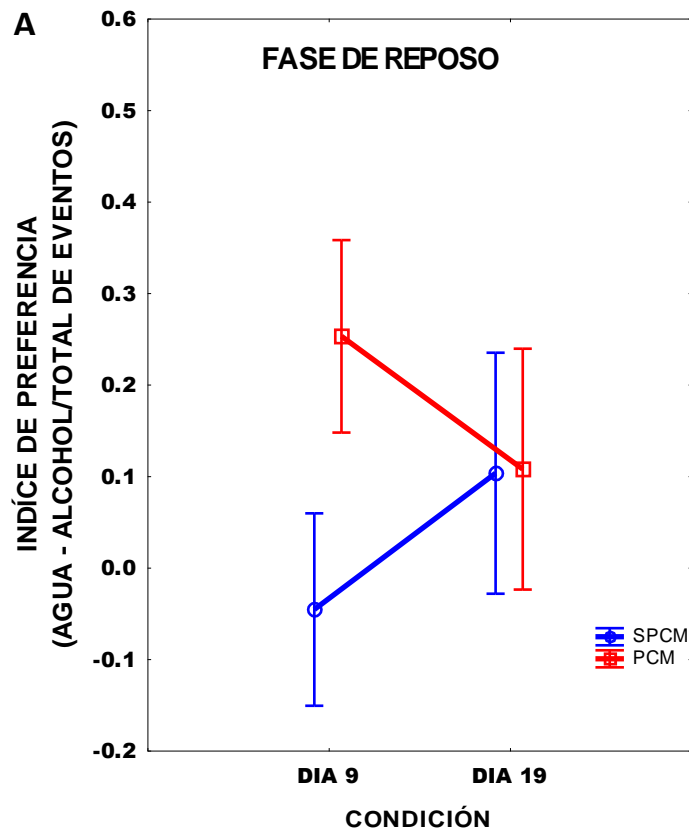


Figura 19. Perfil de actividad durante las últimas 48 h en la condición de oscuridad constante (O-O). Los datos se representan como media \pm error estándar.

Con respecto al índice de preferencia por la ingesta de alcohol o de agua, no se encontró un efecto significativo, durante la fase de reposo, entre grupos [$p > 0.05$]; condición [$p > 0.05$]; e interacción [$p > 0.05$]. Como se muestra en la figura 20 A, tampoco se encontraron diferencias significativas en el índice de preferencia durante la fase de actividad por grupo [$p > 0.05$] y condición [$p > 0.05$]. Se encontró un efecto significativo por interacción [$F(1,14) = 5.8483, p = 0.02980$]. Sin embargo, la prueba *post hoc* de Tukey no mostró diferencias significativas; sólo una tendencia $p = 0.0640$ en el día 9; el grupo SPCM tiende a tener mayor número de eventos registrados durante la ingesta de agua en comparación con el grupo PCM que no tiende a tener preferencia entre los eventos registrados durante la ingesta de agua o alcohol, ver figura 20 B. En la figura 21 se muestra los perfiles de actividad registrados durante la ingesta de agua y de alcohol en los días 9 y 19 de la condición de acceso a alcohol.

INDÍCE DE PREFERENCIA. EVENTOS REGISTRADOS DURANTE LA INGESTA DE AGUA Y ALCOHOL



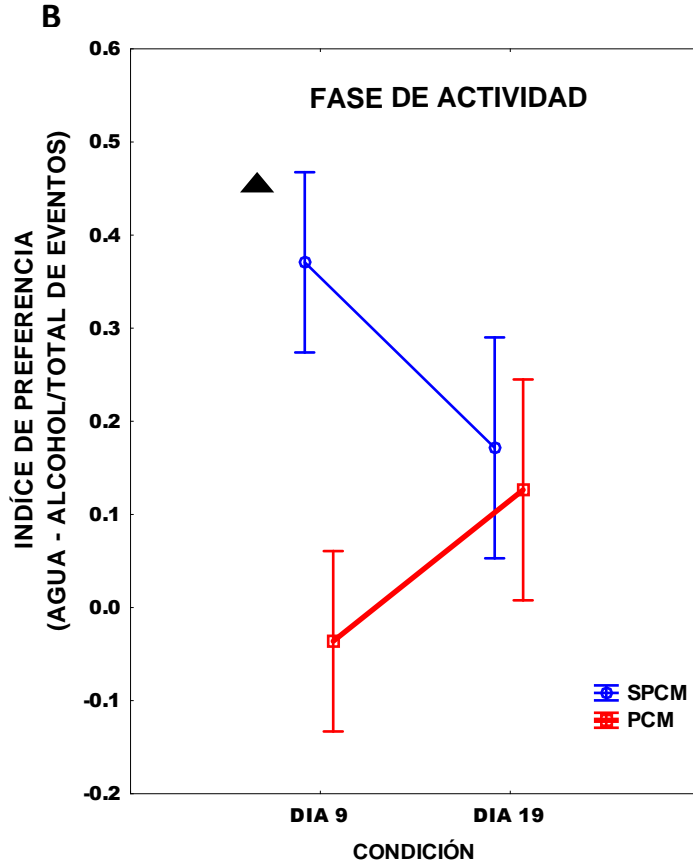


Figura 20. Índice de preferencia entre la cantidad de eventos registrados durante la ingesta agua y la ingesta de alcohol en el día 9 y el día 19. Valores en 0 indica que se registró la misma cantidad de eventos durante la ingesta de agua y la de alcohol, +1 indica más eventos registrados en durante la ingesta de agua, -1 indica más eventos registrados durante la ingesta de alcohol. **A)** Muestra los eventos registrados en la fase de reposo, sin diferencias significativas entre grupos. **B)** Muestra los eventos registrados durante la fase de actividad, con una tendencia significativa $p= 0.06$ en el día 9, el grupo SPCM tiende a tener mayor número de eventos durante la ingesta de agua, en comparación con el grupo PCM que no tiende a tener diferencia entre los eventos registrados durante la ingesta de agua o alcohol). ▲ $p= 0.06$, indica una tendencia significativa.

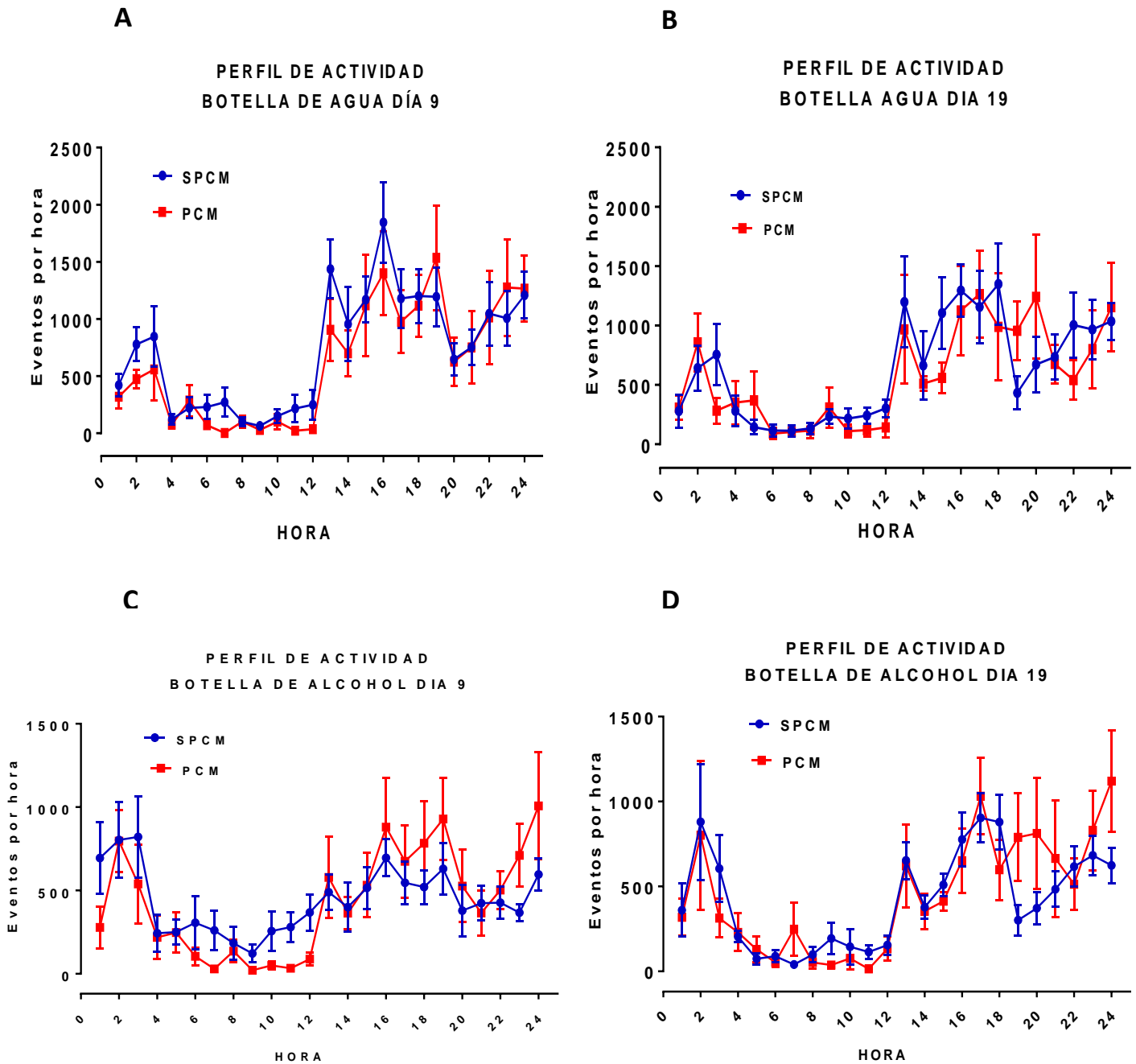


Figura 21. Perfiles de actividad durante la ingesta de agua y la ingesta de alcohol en los días 9 y 19 de la condición de acceso a alcohol. En la parte izquierda se muestran los perfiles del día 9, **A)** corresponde a la ingesta de agua y **C)** corresponde a la ingesta de alcohol. En la parte derecha se muestran los perfiles de actividad del día 19. **B)** corresponde a la ingesta de agua y **D)** corresponde a la ingesta de alcohol.

DISCUSIÓN

La pregunta central de esta investigación fue ¿La privación de cuidado materno modifica el ritmo circadiano de ingesta y el consumo de alcohol en ratas juveniles macho? Los resultados obtenidos muestran que la PCM no afecta el ritmo de ingesta ni la cantidad de alcohol ingerida en ratas Wistar macho de 60 -117 días de vida.

En este trabajo, fue de interés conocer si la PCM era capaz de modificar la duración del periodo endógeno y sincronizado, así como la cantidad de actividad. No se observaron diferencias entre los grupos SPCM y PCM con respecto a la duración del periodo endógeno y sincronizado; sin embargo, ambos grupos presentaron una mayor duración del periodo durante la condición de oscuridad constante. Ambos grupos tuvieron un perfil y cantidad de actividad similar en las últimas 48 horas de oscuridad constante. Con respecto al periodo endógeno se ha reportado que los sujetos seleccionados mendelianamente para un mayor consumo de alcohol (*high-alcohol-preferring-HAP*) en comparación con los sujetos que fueron seleccionados para un bajo consumo de alcohol (*low-alcohol-preferring- LAP*), presentan menor duración del periodo endógeno (Hofstetter, Grahame & Mayeda, 2003). Los resultados reportados en este trabajo, mostraron que la PCM no se relaciona con la expresión homeostática del ritmo circadiano de ingesta, ni el consumo de alcohol.

Se ha reportado menor cantidad de actividad locomotora, durante la condición de oscuridad constante, en cepas de ratas que fueron criadas mendelianamente para un alto consumo de alcohol *high-alcohol-drinking (HAD)* y *ethanol-preferring (P)*, en comparación con sus controles que son bajas consumidoras de alcohol *low-alcohol-drinking (LAD)* y *non-preferring (NP)*. Además el perfil de actividad que presenta la cepa *LAD* a lo largo de la condición de oscuridad constante es similar al perfil de actividad que presentaron los dos grupos de esta investigación, lo cual podría sugerir cierto tipo de organización

circadiana en los sujetos con determinada predisposición al consumo de alcohol. En ratas que se encuentran en condiciones constantes (oscuridad constante), se ha reportado un acortamiento del periodo endógeno cuando tienen acceso a alcohol o este se les retira. En este trabajo los sujetos tuvieron acceso a alcohol durante la resincronización, por lo cual la duración del periodo pudo no ser afectada, ya que como se describió anteriormente la luz es un potente sincronizador, futuros estudios podrían estudiar en que forma compiten las sustancias de abuso y los sincronizadores ambientales para sincronizar a un organismo (Rosenwasser, Fecteau, Logan et al., 2005).

Durante la fase de reposo de las condiciones sincronizadas, no se encontraron diferencias entre los grupos en la cantidad de actividad. Sin embargo, en ambos grupos se observó una disminución durante la fase de actividad, en el último día de acceso al consumo de alcohol, en comparación con la línea base, y una tendencia de menor actividad en el día 9 de acceso a alcohol. Otros trabajos con ratas también reportaron una disminución de la cantidad de actividad cuando tienen acceso a alcohol durante 6 o 4 semanas, en comparación con la línea base (sin acceso a alcohol), además de una modificación en la expresión de Per1. Adicionalmente, los perfiles de actividad que los sujetos mostraron durante la línea base son similares a los reportados en este trabajo, con menor actividad durante el periodo de reposo en comparación con la fase de actividad (Guo, Simasko & Jansen, 2016; Zhou et al., 2015). Los resultados descritos aquí apoyan la literatura que sugiere que el consumo de alcohol podría causar cambios en la maquinaria circadiana (Prosser & Glass, 2015).

Este trabajo también contribuyo a dar respuesta con respecto a si existía diferencia en los días transitorios de resincronización entre los sujetos con PCM y SPCM. Sin diferencias en el número de días que tardan en resincronizarse ambos grupos. Se ha reportado que las ratas tardan alrededor de una a dos semanas para resincronizarse a un ciclo luz-oscuridad 12:12 h, después de haber sido sometidas a un avance de fase (Rosenwasser, Clark, Fixaris, Belanger & Foster,

2010). Resultados similares se encontraron en ambos grupos de este estudio, que tardaron de 10 a 14 días para resincronizarse, lo cual nos sugiere que la PCM no influyó en el número de días transitorios para resincronizar al ritmo de ingesta.

El último objetivo de este trabajo fue evaluar si la PCM afectaba la cantidad de agua, comida y alcohol que las ratas consumieron. Con respecto al consumo de comida y agua los resultados en este trabajo mostraron diferencias por condición pero no entre grupos. La disminución del consumo de comida y agua en la etapa de resincronización comparada con la etapa de línea base puede explicarse por el factor edad, tiempo transcurrido. Reland et al. (2011) no reportaron diferencias en el consumo de agua entre los grupos con o sin separación materna en una prueba de consumo voluntario de alcohol, pero mostraron una mayor ingesta de agua en todos los grupos al comienzo del paradigma en el DPN 63-67 comparado con la tercera semana; tampoco mostraron diferencias en el consumo de comida entre los grupos.

En otro estudio también se reportó un mayor consumo de comida y agua en ratas adultas Wistar en comparación con ratas adolescentes (García, Burgos, González, Manrique & Gallo, 2009). Otros estudios tampoco han mostrado diferencias en la cantidad de líquido consumido entre los grupos cuando se tiene acceso a alcohol (Huot, Thirivikraman, Meaney & Plotsky, 2001). Como sugerencia de que si se tiene disponibilidad de alcohol y agua, los sujetos mantendrán un balance en los líquidos totales consumidos y en todo caso lo que modificarán es la cantidad que beben de agua y de alcohol. También se encontró un menor consumo de comida durante la condición de alcohol en comparación con la condición de resincronización. Esta disminución podría explicarse por un balance energético, los sujetos disminuyen el consumo de comida porque también se encuentran consumiendo alcohol, de forma que compensan la cantidad de calorías que no consumen en la comida por las consumidas en el alcohol (Benický, Nikodémová, Scsuková, Zórad & Štrbák, 2000; Nelson, Suhaidi, DeAngelis & Liang, 2016; Karlsson et al., 2016; Yeomans, Caton & Hetherington, 2003; Sirohi, Van Cleef & Davis, 2017).

No se encontraron diferencias en el consumo voluntario de alcohol entre los grupos PCM y SPCM. Resultados similares se encontraron en el análisis circadiano, sin diferencias entre grupos en el índice de preferencia entre la cantidad de eventos registrados durante la ingesta de agua y la ingesta de alcohol en el día 9 y el día 19. Otro estudio (Holloway, Miller, King & Bedingfield, 1993) mostró un perfil de hipoactividad después de inyecciones intraperitoneales de alcohol en comparación con grupos que recibieron inyecciones de salina. En el presente estudio los sujetos probablemente no consumieron cantidades suficientes de alcohol, que perturbaran la actividad circadiana, lo cual puede verse reflejado en que no hubo preferencia en los eventos registrados entre la ingesta de agua o alcohol, por parte de ninguno de los grupos.

En ratas sometidas a protocolos de PCM, se encuentran resultados controversiales con respecto al consumo de alcohol. En algunos estudios se ha mostrado un aumento en el consumo de alcohol, en sujetos que experimentaron protocolos de PCM de entre 180 a 360 minutos diarios comparados con los grupos SPCM (Gustafsson & Nylander, 2006; Jaworski, Francis, Brommer, Morgan & Kuhar, 2005; Roman & Nylander, 2005; Daoura, Haaker & Nylander, 2011).

Sin embargo, otros estudios han reportado que no hay diferencias en el consumo de alcohol tras protocolos de PCM de 180 a 360 minutos, en comparación con grupos SPCM o con una PCM menor a 15 minutos (Oreland et al., 2011; Roman, Ploj & Nylander, 2004; Marmendal, Roman, Eriksson, Nylander & Fahlke, 2004).

Algunos autores (Jaworski et al., 2005), proponen considerar varios grupos controles para esclarecer posibles mecanismos por los que diferentes duraciones y manipulaciones en los protocolos de PCM pueden tener diferente impacto. Estos autores documentaron un menor consumo de alcohol en el grupo sometido a PCM durante 15 minutos, comparado con el de PCM de 180 minutos; sin diferencia entre los grupos con separaciones de 180 minutos, 0 minutos y un grupo de bioterio, y un mayor consumo de alcohol en el grupo sin manipulación, con

respecto a todos los demás grupos. Se menciona que los resultados mostrados después de los protocolos de PCM no solo están relacionados con la duración del tiempo sino con las condiciones de crianza-manipulación de las crías y la madre, que van desde la manipulación por parte del experimentador, hasta los cuidados propios de limpieza durante el protocolo de separación. Esto puede verse reflejado, en el grupo sin manipulación que fue manipulado sólo una vez, en las dos semanas que dura el protocolo. Gallegos et al., (1990) y Lehmann & Feldon (2011) también resaltan las posibles diferencias en los resultados obtenidos, debido a las manipulaciones de las crías y la madre.

Por otra parte, los paradigmas de privación de cuidado materno podrían tener especificidad en las sustancias de abuso y no necesariamente en todas. Como lo reportado por (Vázquez et al., 2005) donde el grupo sometido a privación de cuidado materno mostró una mayor debilidad a la dependencia por morfina pero no por alcohol, metanfetamina y cocaína comparados con el grupo sin privación de cuidado materno, en este trabajo el paradigma de separación materna no produjo cambios en el consumo de alcohol.

En el presente trabajo fue de interés conocer si los eventos en etapas tempranas (PCM) protegen o debilitan a los sujetos en la forma en que contienden a su medio ambiente en etapas futuras de su desarrollo. Las conductas maternas (no observadas en este trabajo) son una posible explicación a los resultados obtenidos. Liu et al. (1997) mostraron que las crías que tuvieron más lamidas y acicalamiento de sus madres durante los primeros 10 días posnatales, presentaron en la edad adulta menores cantidades de las hormonas corticosterona y corticotropina, que participan en la respuestas de estrés, después de que se les sometió a un estresor agudo, en comparación con las crías que recibieron menor cantidad de lamidas y acicalamiento de su madre.

De forma similar Pryce, Bettschen, & Feldon (2001) mostraron que tras un protocolo de separación materna de 4 horas, las madres presentaban un aumento de lamidas y arqueado de la espalda para amamantar a las crías en comparación

con las madres sometidas a una separación de 15 minutos diarios. Estos estudios sugieren que aun cuando un evento estresante es presentado a las crías (periodos separación materna), la madre aumenta sus conductas de cuidado. En este estudio no se midieron conductas de cuidado materno que posiblemente influyeron en los resultados observados, desconociendo si los grupos tuvieron madres altas o bajas cuidadoras, que suelen clasificarse de acuerdo a la frecuencia, cantidad de las conductas emitidas hacia las crías (Champagne, Francis, Mar & Meaney, 2003); Marmendal, Eriksson & Fahlke, 2006).

Otra posibilidad, por la que la PCM no mostró relación con el ritmo de ingesta puede deberse al periodo en que el protocolo es llevado a cabo (DPN 2-DPN15) y que posiblemente el sistema circadiano no es tan sensible, se ha descrito que en las ratas los ritmos de sueño y vigilia de aproximadamente 24 horas aparecen alrededor del día postnatal 17 (Frank, Ruby, Heller & Franken, 2016).

Por otra parte, en un estudio que llevaron a cabo Rawashdeh & Dubocovich (2014) utilizando primates no humanos (*Macaca mulatta*), no se encontraron diferencias entre el grupo que fue criado con su madre (MR) y el grupo que fue criado con sus pares (PR) con respecto a la duración del periodo circadiano tras una desincronización forzada. Sin embargo, cuando fueron sometidos a una condición de oscuridad constante y se midió la actividad locomotora anticipatoria al encendido subjetivo de las luces (momento en el que se encendían las luces cuando estaban en un régimen sincronizado); el grupo PR mostró menor cantidad de actividad anticipatoria en comparación con el grupo MR. Sin embargo, después de que ambos grupos recibieron un tratamiento oral de melatonina, el grupo PR mostró un aumento de actividad anticipatoria aún más pronunciado que el grupo control.

En el presente trabajo no se encontró una relación entre la PCM y la homeostasis circadiana de ingesta de agua. El estudio anterior, mostró que la

PCM no ejerce cambios en el periodo, sino en otros componentes circadianos como la actividad anticipatoria, que podrían ser sólo observados tras condiciones particulares; en este caso, un protocolo de desincronización forzada. Futuros estudios deberían evaluar la influencia de la PCM ante condiciones circadianas “demandantes” por ejemplo protocolos de jet-lag, retrasos y avances de fase y enfocarse en evaluar la cronostasis circadiana más que los componentes homeostáticos que fueron evaluados en este estudio. Estos estudios permitirán conocer si la PCM ejerce cambios en la forma en que responden los sujetos más que en los parámetros generales como los abordados en este trabajo. Ya que se ha sugerido que los sujetos que presentan trastornos del ánimo tienen un sistema circadiano que presenta dificultades para adaptarse a los cambios ambientales (Grandin, Alloy, & Abramson, 2006).

Una limitante en este trabajo fue la falta de algunas mediciones, que dan soporte de que los sujetos experimentaron condiciones adversas durante las primeras semanas de vida. Por ejemplo, el registro de las conductas de cuidado materno hacia las crías; indicadores conductuales de ansiedad, por ejemplo, las entradas a los brazos cerrados del laberinto elevado en cruz; Indicadores fisiológicos, por ejemplo, hormonas relacionadas al estrés (Factor liberador de corticotropina, cortisol).

Otra limitación en este trabajo fue el tamaño de muestra utilizado, para futuros estudios se recomienda ampliar el número de sujetos utilizados y así poder ampliar las conclusiones. Por otra parte, los efectos de la PCM solo se reportaron en machos, otras investigaciones deberían considerar estudiar los efectos de la PCM en hembras y dar cuenta si la PCM tiene efectos dependientes del sexo. Como se mencionó anteriormente, el protocolo de PCM presenta variantes en la forma para llevarlo a cabo, así como diversos resultados, próximos estudios deberían enfocarse en establecer protocolos estandarizados, consistentes y detallados para su replicación. Una propuesta más enriquecedora es estudiar el efecto de la PCM y ritmos circadianos en humanos; identificando sujetos que

hayan experimentado condiciones negligentes en la infancia y su relación con los cronotipos y posible abuso de sustancias.

Con respecto al protocolo experimental, dos semanas antes del nacimiento de las crías, las ratas gestantes experimentaron un cambio de ciclo normal a ciclo invertido, esta manipulación se llevó a cabo para poder realizar el protocolo de privación de cuidado materno durante la fase de oscuridad, sin embargo, pudo ser una condición estresante para las madres. Por otra parte no se registró la ingesta de comida y agua durante la condición de oscuridad constante, para evitar que el experimentador funcionara como sincronizador y así mismo evitar interferir con la actividad propia de cada sujeto, sin embargo se podría llevar registros diarios de la ingesta, en horarios diferentes. Se sugiere tener en cuenta estas observaciones, para futuros estudios.

Finalmente, en este trabajo se exploraron en mayor medida los componentes homeostáticos del ritmo de ingesta (cantidad de actividad durante el CLO), futuros estudios podrían explorar mediciones circadianas más enfocadas a la cronostasis, obteniendo análisis de cosinor, acrofase, amplitud, mesor. Además de probar otros protocolos experimentales más demandantes para el NSQ y poder conocer su capacidad de ajuste, por ejemplo, retrasos o avances de fase, actividad anticipatoria, protocolos jet-lag. La literatura científica sobre el cuidado materno, ritmos circadianos y el abuso de sustancias, es escasa, lo cual abre una oportunidad para nuevas investigaciones acerca de este fenómeno y sus repercusiones en la salud.

CONCLUSIÓN

La privación de cuidado materno no modifico la cantidad de actividad en ninguna de las fases del CLO; la duración del periodo ni el número de días transitorios para la resincronización. La privación de cuidado materno no modifico el consumo de alcohol. Los resultados sugirieren que los eventos estresantes en la vida temprana no impactan en la homeostasis circadiana de ratas juveniles Wistar macho.

REFERENCIAS

- Agoston, D. V. (2017). How to Translate Time? The Temporal Aspect of Human and Rodent Biology. *Frontiers in Neurology, 8*, 92. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00092>
- American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (5 Edition). <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425596>
- Aschoff, J. (1979). Circadian rhythms: influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. *Zeitschrift Fur Tierpsychologie, 49*(3), 225–249.
- Aschoff, J. (1960). Exogenous and Endogenous Components in Circadian Rhythms. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 25*, 11–28.
<https://doi.org/10.1101/SQB.1960.025.01.004>
- Aschoff, J. (1981). *Biological Rhythms*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6552-9>
- Bainier, C., Mateo, M., Felder-Schmittbuhl, M.-P., & Mendoza, J. (2017). Circadian rhythms of hedonic drinking behavior in mice. *Neuroscience, 349*, 229–238.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.03.002>
- Bass, C. E., Jansen, H. T., & Roberts, D. C. S. (2010). Free-running rhythms of cocaine self-administration in rats held under constant lighting conditions. *Chronobiology International, 27*(3), 535–548. <https://doi.org/10.3109/07420521003664221>
- Bell-Pedersen, D., Cassone, V. M., Earnest, D. J., Golden, S. S., Hardin, P. E., Thomas, T. L., & Zoran, M. J. (2005). Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nature Reviews. Genetics, 6*(7), 544–556. <https://doi.org/10.1038/nrg1633>
- Benický, J., Nikodémová, M., Scsuková, S., Zórad, Š., & Štrbák, V. (2000). Four-week ethanol drinking increases both thyrotropin-releasing hormone (TRH) release and content in rat

pancreatic islets. *Life Sciences*, 66(7), 629–639. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00635-9](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00635-9)

Cardinali, D., Carpizo Alfayate, R., Cos Corral, S., Fernández López, R., Mediavilla Aguado, M. D., Noriega Borge, M. J., ... Sánchez Barceló, E. J. (1994). *Introducción a la Cronobiología. Fisiología de los ritmos biológicos*. Recuperado de <http://hdl.handle.net/11162/10860>

Champagne, F. A., Francis, D. D., Mar, A., & Meaney, M. J. (2003). Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiology & Behavior*, 79(3), 359–371. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(03\)00149-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(03)00149-5)

Chapman, D. P., Wheaton, A. G., Anda, R. F., Croft, J. B., Edwards, V. J., Liu, Y., ... Perry, G. S. (2011). Adverse childhood experiences and sleep disturbances in adults. *Sleep Medicine*, 12(8), 773–779. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2011.03.013>

Covassin, N., Singh, P., & Somers, V. K. (2016). Keeping Up with the Clock: Circadian Disruption and Obesity Risk. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 68(5), 1081–1090. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.06588>

Cruz, F. C., Quadros, I. M., Planeta, C. da S., & Miczek, K. A. (2008). Maternal separation stress in male mice: long-term increases in alcohol intake. *Psychopharmacology*, 201(3), 459–468. <https://doi.org/10.1007/s00213-008-1307-4>

Daan, S., Damassa, D., Pittendrigh, C. S., & Smith, E. R. (1975). An effect of castration and testosterone replacement on a circadian pacemaker in mice (*Mus musculus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(9), 3744–3747.

Damaggio, A. S., & Gorman, M. R. (2014). The circadian timing system in ethanol consumption and dependence. *Behavioral Neuroscience*, 128(3), 371–386. <https://doi.org/10.1037/a0036408>

- Daoura, L., Haaker, J., & Nylander, I. (2011). Early Environmental Factors Differentially Affect Voluntary Ethanol Consumption in Adolescent and Adult Male Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 35(3), 506–515. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2010.01367.x>
- Circadian.(2005). En Dictionary of circadian physiology (2 ed.). Consultado el 23 de Julio de 2019, de <https://www.circadian.org/dictionary>
- Dimatelis, J. J., Stein, D. J., & Russell, V. A. (2012). Behavioral changes after maternal separation are reversed by chronic constant light treatment. *Brain Research*, 1480, 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.07.013>
- Dobbing, J., & Sands, J. (1971). Vulnerability of developing brain. IX. The effect of nutritional growth retardation on the timing of the brain growth-spurt. *Neonatology*, 19(4-6), 363-378.
- Dobbing, J. (1972). Vulnerable periods of brain development. In *Lipids, malnutrition and the developing brain* (pp. 9-29). Associated Scientific Publishers, Amsterdam.
- Dube, S. R., Felitti, V. J., Dong, M., Chapman, D. P., Giles, W. H., & Anda, R. F. (2003). Childhood abuse, neglect, and household dysfunction and the risk of illicit drug use: the adverse childhood experiences study. *Pediatrics*, 111(3), 564–572.
- Escobar, C., Salgado, R., Rodriguez, K., Blancas Vázquez, A. S., Angeles-Castellanos, M., & Buijs, R. M. (2011). Scheduled meals and scheduled palatable snacks synchronize circadian rhythms: Consequences for ingestive behavior. *Physiology & Behavior*, 104(4), 555–561. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.05.001>
- Felitti, V. J., Anda, R. F., Nordenberg, D., Williamson, D. F., Spitz, A. M., Edwards, V., ... Marks, J. S. (1998). Relationship of Childhood Abuse and Household Dysfunction to Many of the Leading Causes of Death in Adults: The Adverse Childhood Experiences (ACE) Study.

American Journal of Preventive Medicine, 14(4), 245–258. [https://doi.org/10.1016/S0749-3797\(98\)00017-8](https://doi.org/10.1016/S0749-3797(98)00017-8)

Fenoglio, K. A., Brunson, K. L., & Baram, T. Z. (2006). Hippocampal neuroplasticity induced by early-life stress: functional and molecular aspects. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 27(2), 180–192. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2006.02.001>

Frank, M. G., Ruby, N. F., Heller, H. C., & Franken, P. (2016). Development of Circadian Sleep Regulation in the Rat: A Longitudinal Study Under Constant Conditions. *Sleep*, 40(3). <https://doi.org/10.1093/sleep/zsw077>

Gallegos, G., Salazar, L., Ortiz, M., Marquez, W., Davis, A., Sanchez, S., ... Schreiber, H. L. (1990). Simple disturbance of the dam in the neonatal period can alter haloperidol-induced catalepsy in the adult offspring. *Behavioral and Neural Biology*, 53(2), 172–188. [https://doi.org/10.1016/0163-1047\(90\)90390-R](https://doi.org/10.1016/0163-1047(90)90390-R)

García-Burgos, D., González, F., Manrique, T., & Gallo, M. (2009). Patterns of Ethanol Intake in Preadolescent, Adolescent, and Adult Wistar Rats Under Acquisition, Maintenance, and Relapse-Like Conditions. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 33(4), 722–728. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00889.x>

Goel, N. (2005). Late-night presentation of an auditory stimulus phase delays human circadian rhythms. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 289(1), R209-216. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00754.2004>

Grandin, L. D., Alloy, L. B., & Abramson, L. Y. (2006). The social zeitgeber theory, circadian rhythms, and mood disorders: review and evaluation. *Clinical Psychology Review*, 26(6), 679–694. <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2006.07.001>

- Gulick, D., & Gamsby, J. J. (2018). Racing the clock: The role of circadian rhythmicity in addiction across the lifespan. *Pharmacology & Therapeutics*, *188*, 124–139.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.03.003>
- Guo, R., Simasko, S. M., & Jansen, H. T. (2016). Chronic Alcohol Consumption in Rats Leads to Desynchrony in Diurnal Rhythms and Molecular Clocks. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *40*(2), 291–300. <https://doi.org/10.1111/acer.12944>
- Gustafsson, L., & Nylander, I. (2006). Time-dependent alterations in ethanol intake in male wistar rats exposed to short and prolonged daily maternal separation in a 4-bottle free-choice paradigm. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *30*(12), 2008–2016.
<https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2006.00247.x>
- Hardy, A. R., Quay, R. J., & Huson, L. W. (1983). Estimation of age in the Norway rat (*Rattus norvegicus* Berkenhout) from the weight of the eye lens. *Journal of Applied Ecology*.
Recuperado de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302605532>
- Hastings, M. H. (1997). Circadian clocks. *Current Biology*, *7*(11), R670–R672.
[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(06\)00350-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(06)00350-2)
- Himmler, B. T., Mychasiuk, R., Nakahashi, A., Himmler, S. M., Pellis, S. M., & Kolb, B. (2018). Juvenile social experience and differential age-related changes in the dendritic morphologies of subareas of the prefrontal cortex in rats. *Synapse (New York, N.Y.)*, *72*(4).
<https://doi.org/10.1002/syn.22022>
- Hofstetter, J. R., Grahame, N. J., & Mayeda, A. R. (2003). Circadian activity rhythms in high-alcohol-preferring and low-alcohol-preferring mice. *Alcohol*, *30*(1), 81–85.
[https://doi.org/10.1016/S0741-8329\(03\)00095-8](https://doi.org/10.1016/S0741-8329(03)00095-8)

- Holloway, F. A., Miller, J. M., King, D. A., & Bedingfield, J. B. (1993). Delayed ethanol effects on physiological and behavioral indices in the rat. *Alcohol*, *10*(6), 511–519.
[https://doi.org/10.1016/0741-8329\(93\)90075-Y](https://doi.org/10.1016/0741-8329(93)90075-Y)
- Horii-Hayashi, N., Sasagawa, T., Matsunaga, W., Matsusue, Y., Azuma, C., & Nishi, M. (2013). Developmental Changes in Desensitisation of c-Fos Expression Induced by Repeated Maternal Separation in Pre-Weaned Mice. *Journal of Neuroendocrinology*, *25*(2), 158–167.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2012.02377.x>
- Huot, R. L., Thirvikraman, K., Meaney, M. J., & Plotsky, P. M. (2001). Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology*, *158*(4), 366–373.
<https://doi.org/10.1007/s002130100701>
- Jaworski, J. N., Francis, D. D., Brommer, C. L., Morgan, E. T., & Kuhar, M. J. (2005). Effects of early maternal separation on ethanol intake, GABA receptors and metabolizing enzymes in adult rats. *Psychopharmacology*, *181*(1), 8–15. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-2232-4>
- Kahana, T., Birkby, W. H., Goldin, L., & Hiss, J. (2003). Estimation of age in adolescents --the basilar synchondrosis. *Journal of Forensic Sciences*, *48*(3), 504–508.
- Kajeepeeta, S., Gelaye, B., Jackson, C. L., & Williams, M. A. (2015). Adverse childhood experiences are associated with adult sleep disorders: a systematic review. *Sleep Medicine*, *16*(3), 320–330. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2014.12.013>
- Karlsson, C., Aziz, A. M. A., Rehman, F., Pitcairn, C., Barchiesi, R., Barbier, E., ... Thorsell, A. (2016). Melanin-Concentrating Hormone and Its MCH-1 Receptor: Relationship Between Effects on Alcohol and Caloric Intake. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *40*(10), 2199–2207. <https://doi.org/10.1111/acer.13181>

- Koskenvuo, K., Hublin, C., Partinen, M., Paunio, T., & Koskenvuo, M. (2010). Childhood adversities and quality of sleep in adulthood: A population-based study of 26,000 Finns. *Sleep Medicine, 11*(1), 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2009.03.010>
- Kosobud, A. E. K., Gillman, A. G., Leffel, J. K., Pecoraro, N. C., Rebec, G. V., & Timberlake, W. (2007). Drugs of Abuse Can Entrain Circadian Rhythms. *The Scientific World Journal, 7*, 203–212. <https://doi.org/10.1100/tsw.2007.234>
- Kurosawa, G., Fujioka, A., Koinuma, S., Mochizuki, A., & Shigeyoshi, Y. (2017). Temperature-amplitude coupling for stable biological rhythms at different temperatures. *PLoS Computational Biology, 13*(6), e1005501. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005501>
- Kwon, I., Choe, H. K., Son, G. H., & Kim, K. (2011). Mammalian Molecular Clocks. *Experimental Neurobiology, 20*(1), 18–28. <https://doi.org/10.5607/en.2011.20.1.18>
- Lee, R. D., & Chen, J. (2017). Adverse childhood experiences, mental health, and excessive alcohol use: Examination of race/ethnicity and sex differences. *Child Abuse & Neglect, 69*, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.chiabu.2017.04.004>
- Lehmann, J., & Feldon, J. (2011). Long-term Biobehavioral Effects of Maternal Separation in the Rat: Consistent or Confusing? *Reviews in the Neurosciences, 11*(4), 383–408. <https://doi.org/10.1515/REVNEURO.2000.11.4.383>
- Levine, S. (2001). Primary social relationships influence the development of the hypothalamic--pituitary--adrenal axis in the rat. *Physiology & Behavior, 73*(3), 255–260.
- Lewis, C. R., Staudinger, K., Scheck, L., & Olive, M. F. (2013). The Effects of Maternal Separation on Adult Methamphetamine Self-Administration, Extinction, Reinstatement, and MeCP2 Immunoreactivity in the Nucleus Accumbens. *Frontiers in Psychiatry, 4*, 55. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2013.00055>

- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., ... Meaney, M. J. (1997). Maternal Care, Hippocampal Glucocorticoid Receptors, and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses to Stress. *Science*, *277*(5332), 1659–1662.
<https://doi.org/10.1126/science.277.5332.1659>
- Lockley, S. W., Skene, D. J., James, K., Thapan, K., Wright, J., & Arendt, J. (2000). Melatonin administration can entrain the free-running circadian system of blind subjects. *The Journal of Endocrinology*, *164*(1), R1-6.
- Logan, R. W., Williams, W. P., & McClung, C. A. (2014). Circadian rhythms and addiction: Mechanistic insights and future directions. *Behavioral neuroscience*, *128*(3), 387–412.
<https://doi.org/10.1037/a0036268>
- Marmendal, M., Eriksson, C. J. P., & Fahlke, C. (2006). Early deprivation increases exploration and locomotion in adult male Wistar offspring. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *85*(3), 535–544. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.10.005>
- Marmendal, M., Roman, E., Eriksson, C. J. P., Nylander, I., & Fahlke, C. (2004). Maternal separation alters maternal care, but has minor effects on behavior and brain opioid peptides in adult offspring. *Developmental Psychobiology*, *45*(3), 140–152.
<https://doi.org/10.1002/dev.20027>
- Mas, C. S., & Blanch, G. G. (2007). *Fundamentos de neurociencia*. Editorial UOC.
- McCormick, C. M., Kehoe, P., & Kovacs, S. (1998). Corticosterone release in response to repeated, short episodes of neonatal isolation: evidence of sensitization. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, *16*(3–4), 175–185.
- Mendoza, J. (2009). Neurobiología Del Sistema Circadiano: Su Encuentro Con El Metabolismo. *Suma Psicológica*, *16*(1), 85–95.

- Mersky, J. P., Topitzes, J., & Reynolds, A. J. (2013). Impacts of adverse childhood experiences on health, mental health, and substance use in early adulthood: A cohort study of an urban, minority sample in the U.S. *Child Abuse & Neglect*, *37*(11), 917–925.
<https://doi.org/10.1016/j.chiabu.2013.07.011>
- Mistlberger, R. E., & Skene, D. J. (2004). Social influences on mammalian circadian rhythms: animal and human studies. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, *79*(3), 533–556.
- Moffett, M. C., Harley, J., Francis, D., Sanghani, S. P., Davis, W. I., & Kuhar, M. J. (2006). Maternal separation and handling affects cocaine self-administration in both the treated pups as adults and the dams. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *317*(3), 1210–1218. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.101139>
- Nelson, N. G., Suhaidi, F. A., DeAngelis, R. S., & Liang, N.-C. (2016). Appetite and weight gain suppression effects of alcohol depend on the route and pattern of administration in Long Evans rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *150–151*, 124–133.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2016.10.006>
- National Institute on Drug Abuse. (2018). Las drogas, el cerebro y la conducta: la ciencia de la adicción. Recuperado el 18 de marzo del 2018 de
<https://www.drugabuse.gov/es/publicaciones/las-drogas-el-cerebro-y-la-conducta-la-ciencia-de-la-adiccion>
- Nishi, M., Horii-Hayashi, N., & Sasagawa, T. (2014). Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rodents. *Frontiers in Neuroscience*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00166>

- Nylander, I., & Roman, E. (2013). Is the rodent maternal separation model a valid and effective model for studies on the early-life impact on ethanol consumption? *Psychopharmacology*, 229(4), 555–569. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3217-3>
- Odeon, M. M., Yamauchi, L., Grosman, M., & Acosta, G. B. (2017). Long-term effects of repeated maternal separation and ethanol intake on HPA axis responsiveness in adult rats. *Brain Research*, 1657, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.11.034>
- Oreland, S., Raudkivi, K., Oreland, L., Harro, J., Arborelius, L., & Nylander, I. (2011). Ethanol-induced effects on the dopamine and serotonin systems in adult Wistar rats are dependent on early-life experiences. *Brain Research*, 1405, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.06.031>
- Pankakoski, E. (1980). An improved method for age determination in the muskrat, *Ondatra zibethica* (L.). *Annales Zoologici Fennici*, 17(2), 113–121. Recuperado de JSTOR.
- Pittendrigh, C. S. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 25, 159–184.
- Ploj, K., Roman, E., & Nylander, I. (2003). Long-term effects of maternal separation on ethanol intake and brain opioid and dopamine receptors in male Wistar rats. *Neuroscience*, 121(3), 787–799.
- Ploj, K., Roman, E., & Nylander, I. (2002). Effects of maternal separation on brain nociceptin/orphanin FQ peptide levels in male Wistar rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 73(1), 123–129.
- Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1993). Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 18(3), 195–200.

Portero-Tresserra, M., Gracia-Rubio, I., Cantacorps, L., Pozo, O. J., Gómez-Gómez, A., Pastor, A., ...

Valverde, O. (2018). Maternal separation increases alcohol-drinking behaviour and reduces endocannabinoid levels in the mouse striatum and prefrontal cortex. *European Neuropsychopharmacology: The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 28(4), 499–512.

<https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2018.02.003>

Prosser, R. A., & Glass, J. D. (2015). Assessing ethanol's actions in the suprachiasmatic circadian clock using in vivo and in vitro approaches. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 49(4), 321–339.

<https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.07.016>

Pryce, C. R., Bettschen, D., & Feldon, J. (2001). Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Developmental Psychobiology*, 38(4), 239–

251. <https://doi.org/10.1002/dev.1018>

Quinn, R. (2005). Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 21(6), 775–777.

<https://doi.org/10.1016/j.nut.2005.04.002>

Ibarra, R. (2014). Los ritmos biológicos del ser humano. 1(1), 129–137.

Rawashdeh, O., & Dubocovich, M. L. (2014). Long-term effects of maternal separation on the responsiveness of the circadian system to melatonin in the diurnal nonhuman primate (Macaca mulatta). *Journal of pineal research*, 56(3), 254–263.

<https://doi.org/10.1111/jpi.12118>

Refinetti, R., Lissen, G. C., & Halberg, F. (2007). Procedures for numerical analysis of circadian rhythms. *Biological rhythm research*, 38(4), 275–325.

<https://doi:10.1080/09291010600903692>

- Reyes, B. A., Pendergast, J. S., & Yamazaki, S. (2008). Mammalian Peripheral Circadian Oscillators Are Temperature Compensated. *Journal of biological rhythms*, 23(1), 95–98.
<https://doi.org/10.1177/0748730407311855>
- Prieto, N. M. R., López, A. R., Morales, M. P., Pech, O., Méndez-Díaz, M., Contreras, A. E. R., & Prospéro-García, O. (2012). Oleamide restores sleep in adult rats that were subjected to maternal separation. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 103(2), 308–312.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.08.028>
- Roman, E., & Nylander, I. (2005). The impact of emotional stress early in life on adult voluntary ethanol intake—results of maternal separation in rats. *Stress*, 8(3), 157–174.
<https://doi.org/10.1080/10253890500188666>
- Roman, E., Ploj, K., & Nylander, I. (2004). Maternal separation has no effect on voluntary ethanol intake in female Wistar rats. *Alcohol*, 33(1), 31–39.
<https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2004.04.002>
- Romano-López, A., Méndez-Díaz, M., Ruiz-Contreras, A. E., Carrisoza, R., & Prospéro-García, O. (2012). Maternal separation and proclivity for ethanol intake: a potential role of the endocannabinoid system in rats. *Neuroscience*, 223, 296–304.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.07.071>
- Romano-López, A., Méndez-Díaz, M., García, F. G., Regalado-Santiago, C., Ruiz-Contreras, A. E., & Prospéro-García, O. (2016). Maternal separation and early stress cause long-lasting effects on dopaminergic and endocannabinergic systems and alters dendritic morphology in the nucleus accumbens and frontal cortex in rats. *Developmental Neurobiology*, 76(8), 819–831. <https://doi.org/10.1002/dneu.22361>
- Romero, M. (2010). Ritmo diario de los procesos de atención y el impacto de la malnutrición en la rata adulta Sprague-Dawley. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional de México.

- Rosenwasser, A. M., Clark, J. W., Fixaris, M. C., Belanger, G. V., & Foster, J. A. (2010). Effects of repeated light-dark phase shifts on voluntary ethanol and water intake in male and female Fischer and Lewis rats. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, *44*(3), 229–237.
<https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2010.03.002>
- Rosenwasser, A. M., Fecteau, M. E., Logan, R. W., Reed, J. D., Cotter, S. J. N., & Seggio, J. A. (2005). Circadian activity rhythms in selectively bred ethanol-preferring and nonpreferring rats. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, *36*(2), 69–81. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2005.07.001>
- Sandi, C., & Haller, J. (2015). Stress and the social brain: behavioural effects and neurobiological mechanisms. *Nature Reviews Neuroscience*, *16*(5), 290.
- Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., & Noble-Haeusslein, L. J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology*, *106–107*, 1–16.
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.001>
- Sengupta, P. (2013). The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *International Journal of Preventive Medicine*, *4*(6), 624–630.
- Sirohi, S., Van Cleef, A., & Davis, J. F. (2017). Binge-like intake of HFD attenuates alcohol intake in rats. *Physiology & Behavior*, *178*, 187–195.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.10.006>
- Sollars, P. J., & Pickard, G. E. (2015). The neurobiology of circadian rhythms. *The Psychiatric clinics of North America*, *38*(4), 645–665. <https://doi.org/10.1016/j.psc.2015.07.003>
- Smart, J. L. (1991). Critical periods in brain development. The childhood environment and adult disease, 109-128.
- Van der Vegt, E. J. M., Tieman, W., van der Ende, J., Ferdinand, R. F., Verhulst, F. C., & Tiemeier, H. (2009). Impact of early childhood adversities on adult psychiatric disorders. *Social*

Psychiatry and Psychiatric Epidemiology, 44(9), 724–731. <https://doi.org/10.1007/s00127-009-0494-6>

Vazquez, V., Giros, B., & Daugé, V. (2006). Maternal deprivation specifically enhances vulnerability to opiate dependence. *Behavioural Pharmacology*, 17(8), 715–724. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e3280116e6f>

Vazquez, V., Penit-Soria, J., Durand, C., Besson, M. J., Giros, B., & Daugé, V. (2005). Maternal deprivation increases vulnerability to morphine dependence and disturbs the enkephalinergic system in adulthood. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(18), 4453–4462. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4807-04.2005>

Venebra-Muñoz, A., Corona-Morales, A., Santiago-García, J., Melgarejo-Gutiérrez, M., Caba, M., & García-García, F. (2014). Enriched environment attenuates nicotine self-administration and induces changes in Δ FosB expression in the rat prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Neuroreport*, 25(9), 688–692. <https://doi.org/10.1097/WNR.000000000000157>

Watson, N. F., Buchwald, D., & Harden, K. P. (2013). A twin study of genetic influences on diurnal preference and risk for alcohol use outcomes. *Journal of Clinical Sleep Medicine: JCSM: Official Publication of the American Academy of Sleep Medicine*, 9(12), 1333–1339. <https://doi.org/10.5664/jcsm.3282>

Wilking, M., Ndiaye, M., Mukhtar, H., & Ahmad, N. (2013). Circadian rhythm connections to oxidative stress: implications for human health. *Antioxidants & redox signaling*, 19(2), 192–208. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4889>

Whishaw, I., Kolb, B., & Galef, B. (2005). *The Behavior of the Laboratory Rat*.

- Wollnik, F. (1989). Physiology and regulation of biological rhythms in laboratory animals: an overview. *Laboratory Animals*, 23(2), 107–125.
<https://doi.org/10.1258/002367789780863538>
- Yamanaka, Y., Hashimoto, S., Takasu, N. N., Tanahashi, Y., Nishide, S.-Y., Honma, S., & Honma, K.-I. (2015). Morning and evening physical exercise differentially regulate the autonomic nervous system during nocturnal sleep in humans. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 309(9), R1112-1121.
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.00127.2015>
- Yan, L., Smale, L., & Nunez, A. A. (2018). Circadian and photic modulation of daily rhythms in diurnal mammals. *The European Journal of Neuroscience*.
<https://doi.org/10.1111/ejn.14172>
- Yeomans, M., Caton, S., & Hetherington, M. (2003). Alcohol and food intake. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 6(6), 639–644.
- Zhou, P., Werner, J. H., Lee, D., Sheppard, A. D., Liangpunsakul, S., & Duffield, G. E. (2015). Dissociation between diurnal cycles in locomotor activity, feeding behavior and hepatic PERIOD2 expression in chronic alcohol-fed mice. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 49(4), 399–408. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2015.03.005>
- Zimmerman, W. F., Pittendrigh, C. S., & Pavlidis, T. (1968). Temperature compensation of the circadian oscillation in *Drosophila pseudoobscura* and its entrainment by temperature cycles. *Journal of Insect Physiology*, 14(5), 669–684.