



Universidad Nacional Autónoma de México



Facultad
de Psicología

Facultad de Psicología

**La exposición materna a la luz tenue por la noche provoca
alteraciones
neuroinmunológicas y en la conducta de juego en las crías
macho de la cepa Wistar**

TESIS

Que para obtener el título de

Licenciada en Psicología

PRESENTA

González González Deyanira Shellye

Directora de tesis

Dra. Natalí Nadia Guerrero Vargas

CDMX, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dos fuerzas reinan en el universo: luz y gravedad

Simone Weil

Agradecimientos académicos

Le agradezco a la Dra. Natalí Guerrero Vargas por ser una tutora excelente, que me ha acompañado en cada paso de esta tesis y sobre todo gracias por siempre guiarme y apoyarme en la investigación científica.

A la Dra. Carolina Escobar por inspirarnos, compartir su conocimiento e interesarse por el bienestar de sus alumnos.

Mis agradecimientos para la Dra. Mara Guzmán Ruiz por enseñarme y asesorarme en la realización de las técnicas y análisis que se utilizaron en esta tesis.

Agradecimientos técnicos a la Biol. Ivonne Grisel Sánchez Cervantes por su asesoría técnica de inmunofluorescencia, observación de muestras y captura de micrografías en el Microscopio Confocal LSM 880 de la marca Zeiss de la Unidad de Microscopia de la Facultad de Medicina.

Agradecimientos técnicos a la Biol. Jacqueline González Ríos.

A Rosa Pavón por apoyarme con los análisis que se realizaron.

A los sinodales que enriquecieron esta tesis con sus comentarios.

Este proyecto fue financiado por PAPIIT IA206620, PAPIIT IG201321 y PAPIIT IA204121.

Agradecimientos personales

A mi madre que tiene la fuerza de un mar y me enseñó a no rendirme nunca.

A mi padre por su apoyo, sus consejos y su afecto.

A mi hermana Vale por cuidarme siempre, compartirme su virtud y su amor.

A Arturo y a Sandra por su cuidado, su cariño y su luz.

A mis amigas por escucharme y darle felicidad a este mundo.

A Estefa y Axel por acompañarme en la amistad y la ciencia.

A los miembros del laboratorio de Ritmos Biológicos y Metabolismo por ser el mejor equipo.

ACRÓNIMOS	6
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	8
ANTECEDENTES	9
1. <i>Ritmos circadianos</i>	9
2. <i>Ritmos biológicos en el periodo gestacional</i>	12
3. <i>Disrupción circadiana</i>	13
4. <i>Efectos adversos de la exposición a la luz por la noche</i>	14
5. <i>Efectos adversos de la exposición a la luz tenue por la noche DLAN</i>	15
5.1 <i>Efectos adversos de la exposición a la luz tenue por la noche (DLAN) en machos</i>	16
5.2 <i>Efectos adversos de la exposición a la luz tenue por la noche (DLAN) en hembras</i>	17
6. <i>Efectos adversos de la exposición a la luz tenue por la noche (DLAN) en el periodo gestacional</i>	18
6.1 <i>Efectos de la exposición a la luz tenue por la noche (DLAN) previo al periodo gestacional</i>	19
6.1 <i>Efectos de la exposición a la luz tenue por la noche (DLAN) previo y durante el periodo gestacional</i>	20
6.2 <i>Efectos de la exposición a la luz tenue por la noche (DLAN) exclusivamente durante el periodo gestacional y/o posnatal</i>	21
7. <i>Regulación circadiana</i>	22
7.1 <i>Regulación circadiana de la microglía en reposo</i>	22
7.2 <i>Regulación circadiana de la respuesta inmune de la microglía ante patógenos</i>	23
8. <i>Efectos de DLAN en la microglía y su respuesta inmune</i>	24
9. <i>Microglía en el desarrollo (poda neural)</i>	25
10. <i>Conducta de juego en rata</i>	28
10.1 <i>Sistema de recompensa en la conducta de juego en ratas</i>	30
10.2 <i>Núcleo Accumbens y receptores de dopamina en la conducta de juego en ratas</i>	31
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
OBJETIVO	34
<i>General</i>	34
<i>Específicos</i>	34
HIPÓTESIS	34
MATERIAL Y MÉTODO	35
<i>Sujetos experimentales</i>	35

Diseño experimental	35
Mediciones	37
<i>Conducta de juego</i>	37
<i>Inmunofluorescencia</i>	38
<i>Obtención de imágenes</i>	38
<i>Análisis de conteo celular de la microglía</i>	39
<i>Análisis de densidad integrada de D1r</i>	39
<i>Análisis de Sholl</i>	39
<i>Colocalización</i>	40
<i>Análisis estadístico</i>	40
RESULTADOS	40
<i>Las crías de madres expuestas a DLAN presentan menos conductas de juego social</i>	40
<i>Las crías de madres expuestas a DLAN presentan mayor número de microglía en el NAc</i>	41
<i>Las crías de madres expuestas a DLAN presentan menor densidad del receptor D1 en el NAc</i>	43
<i>La microglía de las crías de madres expuestas a DLAN presentan una morfología más ramificada</i>	45
<i>La exposición a DLAN no modifica la colocalización de IBA1 y D1r</i>	46
DISCUSIÓN	48
CONCLUSIONES	51
REFERENCIAS	52

ACRÓNIMOS

ARC: Arqueado

CT: Circadian time

D1r: Receptor de dopamina 1

DD: Ciclo luz oscuridad-oscuridad

DHM: Núcleo dorsomedial

DLAN: Luz tenue por la noche

IBA1: molécula adaptadora de unión al calcio 1

LD: Ciclo de luz-oscuridad

LH: Hipotálamo lateral

LPS: Liposacárido

NGLD: Núcleo geniculado laterodorsal

NAc: Núcleo accumbens

NQS: Núcleo supraquiasmático

PN: Posnatal

ROI: Región de interés

SNC: Sistema Nervioso Central

VHM: Hipotálamo ventromedial

ZT: Zeitgeber Time

RESUMEN

El acceso a la luz eléctrica ha generado que los seres vivos estén expuestos de forma constante no solamente a la luz brillante sino también a la luz tenue durante la noche (DLAN) por medio de fuentes de luz externas que se filtran en los hogares, dispositivos electrónicos o lámparas de baja intensidad. La exposición a DLAN tiene efectos negativos en la salud, genera disrupción circadiana, cambios metabólicos y cambios conductuales. Las mujeres gestantes también se exponen a DLAN. Debido a que en el útero los ritmos circadianos del feto dependen de las señales circadianas de la madre como la temperatura, la actividad y hormonas como la melatonina y el cortisol, las alteraciones circadianas de las madres gestantes impactan de forma directa en el desarrollo del sistema circadiano de las crías. En modelos animales, la exposición de madres gestantes a DLAN induce en las crías aumento de conductas tipo depresivas y tipo ansiosas, cambios en la respuesta. En nuestro laboratorio se ha desarrollado un modelo de desincronización circadiana en rata hembra mediante la exposición a DLAN. Las crías de madres expuestas a DLAN, presentan alteraciones circadianas y conductuales en la adultez. La conducta de juego social es importante para el desarrollo del cerebro y la conducta en etapas posteriores. El juego tiene un alto valor recompensante y está modulado por la vía dopaminérgica del sistema corticolímbico.

En esta investigación se estudiaron los efectos transgeneracionales de la exposición a DLAN (5-10lux) previo (5 semanas) y durante el periodo gestacional (21 días) en la conducta de juego social y en el núcleo accumbens (NAc), uno de los sustratos neuronales que la regula, en un modelo animal con ratas macho de la cepa Wistar. Se realizó una prueba conductual para evaluar la conducta de juego social. Posteriormente en el núcleo accumbens (NAc) se realizó análisis de conteo celular para cuantificar microglía y conocer su morfología, análisis para medir la densidad del receptor dopamina 1 (D1r) y se evaluó el contacto entre la microglía y los receptores D1r.

Las crías de madres expuestas a DLAN presentaron una disminución significativa en la conducta de juego, un aumento en el número de microglías en el NAc y menor densidad de receptores D1r. Estos resultados muestran que la exposición a DLAN induce alteraciones transgeneracionales a nivel de la conducta

PALABRAS CLAVE: Ritmos circadianos, disrupción circadiana materna, conducta de juego, microglía, vía dopaminérgica

INTRODUCCIÓN

Los ritmos circadianos son oscilaciones que presentan una duración de aproximadamente 24 horas. En los mamíferos estos ritmos son controlados por el reloj circadiano central; el núcleo supraquiasmático (NSQ), localizado en el hipotálamo, el cual coordina los mecanismos que generan las oscilaciones de señales hormonales, temperatura, actividad y ritmos de órganos periféricos (Panda, 2002).

La principal señal sincronizadora de los ritmos circadianos es el ciclo de luz-oscuridad dado por la rotación de la Tierra. Esta señal es relevante para sincronizar los procesos fisiológicos internos con los cambios del ambiente, por esta razón, se ha descrito que la exposición a luz durante la noche puede generar desincronización circadiana. La desincronización circadiana sucede cuando no existe una sincronización entre las fluctuaciones de las señales del medio externo y las oscilaciones producidas por el NSQ y los órganos periféricos (Ángeles-Castellanos, Rodríguez, Salgado, Escobar, 2007). En modelos animales expuestos a luz durante la noche se ha descrito que la disrupción circadiana tiene consecuencias negativas en la salud de los individuos como alteraciones metabólicas y conductas tipo depresivas (Karatsoreos et al., 2011; Tapia-Osorio et al., 2013; Shi et al., 2013).

Sin embargo, en el contexto actual no solamente nos exponemos a luz brillante durante la noche, sino también la luz tenue (5-10 lux), como la luz que se filtra del exterior o de fuentes de luz de baja intensidad en el hogar. Por esta razón se han evaluado los efectos negativos de la exposición a la luz tenue durante la noche (DLAN). En diferentes investigaciones se ha descrito que la exposición a DLAN en roedores induce cambios en la actividad general, aumento de la producción de citocinas proinflamatorias ante una enfermedad y conductas tipo depresivas y tipo ansiosas (Fonken et al., 2013; Cissé et al., 2016, Stenvers et al., 2016; Weil et al., 2020).

Las hembras gestantes son una población vulnerable a los efectos adversos de la exposición a DLAN. Durante la gestación los ritmos circadianos del feto dependen de las señales de la madre, algunas de estas pueden ser la melatonina, la temperatura o la actividad (Wong et al., 2022). Por lo tanto, las señales maternas se encargan de entrenar el reloj circadiano del feto (Wong et al., 2022). Debido a esto se han estudiado los efectos transgeneracionales de la exposición a DLAN durante la gestación y se ha descrito que las crías presentan cambios en la respuesta inmune y un aumento significativo en conductas tipo depresivas y tipo ansiosas

(Bedrosian, 2012 et al.; Fonken et al., 2013; Borniger et al., 2014; Cissé et al., 2017; Gutierrez-Pérez, 2018).

Durante la adolescencia del roedor, la expresión de la conducta de juego social es importante para el desarrollo del cerebro y la conducta en el animal adulto. Su alteración se ha asociado con déficits cognitivos, así como conducta social aberrante en la adultez y un aumento en la sensibilidad a las drogas de abuso, incluyendo al alcohol en etapas posteriores (Varcoe et al., 2018). En ratas esta conducta se expresa mediante patrones motores que se asemejan a conductas funcionales observadas en la adultez como el sexo, la depredación y las peleas (Pellis et al., 2019). La conducta de juego es regulada por el sistema de recompensa y una de las principales estructuras encargadas de su funcionamiento es el núcleo accumbens (NAc) (Gordon et al., 2002). Se ha descrito que la vía dopaminérgica del NAc es importante para que se presente la conducta de juego. La inhibición de la función de los receptores D1r del NAc en ratas, disminuye la conducta de juego (Manduca et al., 2016; Kopec et al., 2018). Durante el desarrollo esta vía es refinada con la poda neuronal que lleva a cabo la microglía (Kopec et al., 2018). Por lo tanto, es importante que la actividad de la microglía no se altere durante el desarrollo.

La exposición a DLAN aumenta la actividad de la microglía. En una investigación se encontró que la exposición a DLAN aumentó la expresión de citocinas proinflamatorias así como el número de microglías en el hipocampo, de las cuales una mayor cantidad presentaba morfología ameboides (Liu et al., 2022), probando que la exposición a DLAN tiene efectos negativos en la actividad de la microglía.

ANTECEDENTES

1. Ritmos circadianos

El planeta Tierra se encuentra en constante movimiento produciendo cambios ambientales rítmicos, un ejemplo de ello es el movimiento de rotación el cual genera estados cíclicos en el entorno natural, el ciclo más importante para los seres vivos es el ciclo de luz-oscuridad. Con el objetivo de adaptarse exitosamente al ambiente, a lo largo de los años, los organismos han desarrollado mecanismos celulares endógenos que sincronizan los ritmos fisiológicos y conductuales para anticipar estímulos importantes como la disponibilidad de alimento o los cambios de luz y temperatura; a este conjunto de mecanismos que permiten que las funciones

fisiológicas del organismo se sincronicen con las señales del medio ambiente en fluctuaciones de aproximadamente 24 horas se le denomina sistema circadiano (Panda, 2002).

En los mamíferos, el sistema circadiano está conformado por el reloj circadiano central; el núcleo supraquiasmático (NSQ) ubicado en el hipotálamo anterior, arriba del quiasma óptico y por los genes reloj que pueden encontrarse tanto en el sistema nervioso central, como en las células de múltiples órganos como el hígado y el corazón entre otros. Estos genes reloj sirven como osciladores periféricos y la mayoría son sincronizados por las señales provenientes del NSQ. En su conjunto, el sistema circadiano dirige la sincronización de procesos fisiológicos, bioquímicos, metabólicos, endocrinos y conductuales generando ritmos con un periodo de oscilación de aproximadamente 24 horas (Rüger & Scheer, 2009). La generación de los ritmos circadianos en todo el organismo es el resultado de la comunicación del reloj biológico con el resto del cuerpo a través de vías neurales y hormonales las cuales ajustan las funciones corporales (Panda, 2002).

El NSQ se compone de un circuito neuronal de aproximadamente 20,000 neuronas que se comunican con otros núcleos dentro del hipotálamo y con órganos de la periferia. Este núcleo recibe la señal de la alternancia del ciclo luz-oscuridad a través del tracto retino hipotalámico desde las células ganglionares de la retina con el objetivo de sincronizarse al día y la noche (Buijs et al., 2016;). Sin embargo, se ha demostrado que los ritmos dirigidos por el NSQ se mantienen aún en condiciones de oscuridad constante (Hastings, 2013), lo cual denota su capacidad de reloj endógeno. Para explorar el papel del NSQ en la organización de los ritmos circadianos se han realizado múltiples investigaciones, un ejemplo es la lesión del NSQ en donde se describe que este procedimiento tiene como consecuencia la pérdida de los ritmos circadianos, como el ritmo del sueño y pérdida de las oscilaciones de los genes reloj de múltiples tejidos (Musiek et al., 2016).

Para generar los ritmos de múltiples aspectos de la fisiología, dentro del hipotálamo el NSQ se comunica con diferentes estructuras. Por ejemplo, las conexiones entre el NSQ y el núcleo arqueado (ARC) le permiten al ARC regular la temperatura corporal con base en la información que se obtiene de la periferia. Por otra parte, el núcleo dorsomedial (DHM), el

hipotálamo lateral (LH) y el núcleo ventromedial reciben señales del NSQ que contribuyen a la sincronización de los estados de hambre y saciedad (Figura 1) (Buijs, 2001).

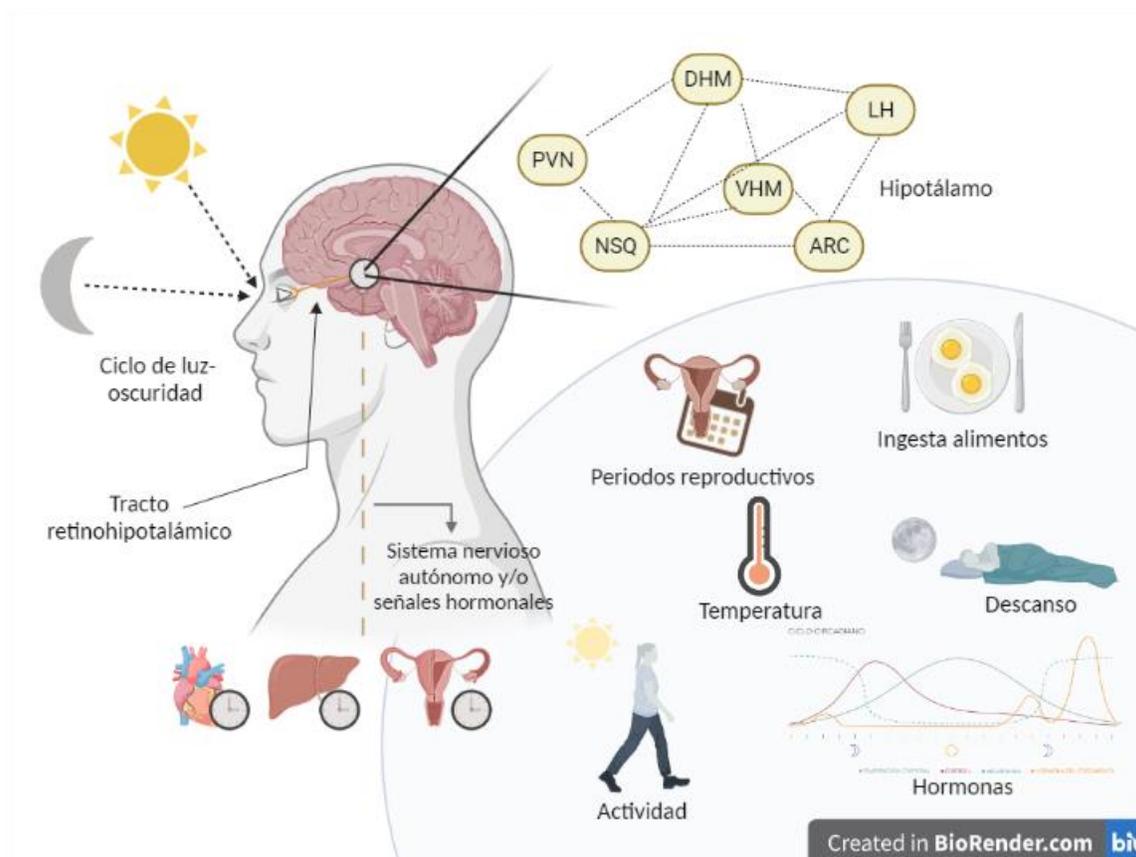


Figura 1. El sistema circadiano. La señal del ciclo luz-oscuridad se transmite a través de la retina y por medio del tracto retinohipotalámico (TRH) llega al núcleo supraquiasmático (NSQ). En el hipotálamo, el NSQ se comunica con otros núcleos como el núcleo arqueado (ARC), el núcleo paraventricular (PVN), el núcleo dorsomedial (DHM), el hipotálamo ventromedial (VHM) y el hipotálamo lateral (LH). Este circuito permite la sincronización de órganos periféricos como el hígado, el corazón, los ovarios y la sincronización de las conductas y la temperatura por medio de señales hormonales y a través del sistema nervioso autónomo. Imágen creada en BioRender.com

Por medio de estos mecanismos, los ritmos circadianos en su conjunto permiten que los organismos anticipen los cambios del medio ambiente con el objetivo adaptar los procesos fisiológicos para los retos diarios. Estas adaptaciones pueden reflejarse en la actividad, en un aumento de temperatura corporal justo antes del periodo de actividad, cambios en los niveles de glucosa o cambios en los niveles de cortisol, de acuerdo con las exigencias del ambiente. Los ritmos circadianos son de suma importancia para la salud de los individuos, debido a que la fisiología presenta variaciones a lo largo de las 24h del día. Un ejemplo de esto es la expresión de los síntomas de las enfermedades y/o eventos adversos durante un periodo

específico de día. En este sentido, los incidentes cardiovasculares tienen un pico durante la mañana, mientras que las convulsiones epilépticas son más frecuentes durante la tarde y el asma tiende a empeorar durante la noche (Rüger & Scheer, 2009).

2. Ritmos biológicos en el periodo gestacional

El sincronizador más fuerte para el NSQ de la hembra gestante es el ciclo de luz-oscuridad el cual regula la fluctuación diurna de señales hormonales maternas que llegan directamente al feto a través de la placenta durante el embarazo. En el útero, el feto depende de las señales circadianas maternas como la melatonina, el cortisol y la temperatura, las cuales entrenan el sistema circadiano fetal, por lo tanto, durante el desarrollo, el feto se sincroniza con el ciclo de luz-oscuridad a través de la madre (Wong et al, 2022). En humanos y roedores se ha demostrado que la glándula pineal de los fetos no secreta melatonina (Serón-Ferré et al, 2012), sin embargo, en humanos los receptores para la melatonina se pueden observar a partir de las 18 semanas de gestación en el NSQ del feto y se distribuyen ampliamente en el tejido fetal (Reppert et al., 1988). Una de las señales más importantes para los ritmos circadianos del feto es la melatonina ya que es una de las pocas hormonas que pueden cruzar la placenta sin presentar alteraciones y brinda información importante acerca del ciclo luz-oscuridad (Serón-Ferré et al., 2012). En primates cuando se suprime la señalización materna de melatonina se produce un cambio en la expresión de los genes reloj del NSQ fetal, estos cambios pueden revertirse mediante el reemplazo de la melatonina materna (Torres-Farfan, 2006 et al.).

Durante el embarazo la madre presenta cambios fisiológicos con el objetivo de mantener de forma adecuada el desarrollo del feto, algunos de estos cambios son circadianos como cambios en la concentración plasmática de hormonas, cambios en la temperatura e incluso se ha descrito que algunas mujeres presentan un inicio del sueño más temprano (Wong et al., 2022).

Se sabe que en humanos, primates y ovejas existen ritmos de movimientos y en la producción de algunas hormonas que muestran una oscilación de 24 horas aproximadamente, sin embargo, se ha propuesto que el NSQ y los órganos del feto se comportan como osciladores circadianos periféricos que son sincronizados a través de señales del NSQ materno (Serón-Ferré et al., 2012).

En roedores se ha descrito que, aunque la ritmicidad circadiana depende de la madurez del sistema circadiano la expresión de los genes reloj se encuentra presente en el NSQ de embriones de ratón (Wong et al, 2022).

3. *Disrupción circadiana*

La desincronización circadiana es una alteración del tiempo biológico y se puede definir como la carencia de coherencia entre las señales del medio externo y las oscilaciones producidas por el NSQ. Esta desincronización puede ocurrir a diferentes niveles del organismo, es decir puede impactar desde los ritmos moleculares en células individuales de los órganos hasta la desincronización de los ciclos de algunas conductas (Qian & Scheer, 2016), como los ciclos de sueño y vigilia y los horarios de alimentación. (Rüger & Scheer, 2009). Rüger & Scheer (2009) describen los diferentes factores que pueden provocar disrupción circadiana, ésta puede deberse a factores externos, a factores internos o como consecuencia de un daño al NSQ debido a alguna enfermedad, lesión, tumor o variaciones genéticas nocivas. Las alteraciones circadianas pueden ser consecuencia de un daño en las estructuras relacionadas con la sincronización, por ejemplo, se sabe que cuando se lesiona el NSQ de las ratas, no se observan ritmos en la actividad general de los animales (Eastman & Rechtschaffen, 1983), o pueden deberse a una alteración de las señales exógenas tales como el ciclo de luz-oscuridad o los horarios de alimentación (Ángeles-Castellanos et al., 2007). Algunos factores externos promotores de disrupción circadiana son: la exposición a la luz artificial durante la noche, la amplia disponibilidad de los alimentos a lo largo de las 24h, los viajes con cambios de zonas horarias y los horarios de trabajo que rotan a lo largo de las 24h del día. Todos estos factores pueden alterar los ritmos circadianos, impactando de forma directa en la salud general de los individuos (Vetter, 2020). En modelos animales de disrupción circadiana inducida por trabajo nocturno e ingesta de alimentos durante la fase de descanso, se observaron alteraciones metabólicas y en la expresión de los genes reloj en el hígado de ratas macho (Salgado-Delgado et al., 2013). Por otra parte, en diversos modelos animales de alteración circadiana, en donde se manipula el ciclo de luz-oscuridad, exponiendo a animales a un ciclo de luz constante (24h de luz), se han observado conductas tipo depresivas y ansiosas (Tapia-Osorio et al., 2013), resistencia a la insulina, tendencia a la obesidad (Shi et al., 2013), alteraciones en los niveles de temperatura corporal, cambios en

la ganancia de peso, cambios a nivel neuronal en algunas estructuras del sistema nervioso como alteración de la morfología de las neuronas en la corteza prefrontal en ratones (Karatsoreos et al., 2011) , promueve el crecimiento tumoral disrumpiendo el metabolismo e incrementando la respuesta inflamatoria (Guerrero-Vargas et al., 2017), pérdida en los ritmos de melatonina y corticosterona, incremento de la masa corporal (Báez-Ruíz 2017) y alteraciones en el aprendizaje entre otros efectos nocivos para la salud (Karatsoreos et al., 2011).

El NSQ sincroniza a los relojes circadianos periféricos de múltiples tejidos y órganos con un periodo de 24h, por esta razón, la desincronización derivada de cambios en los factores externos puede alterar esa comunicación ocasionando alteraciones endócrinas (Bedrosian et al., 2016). La disrupción circadiana y las alteraciones del sueño se han descrito como parte de los síntomas de diferentes enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Huntington (Musiek et al., 2016). Estudiar la disrupción circadiana y los factores que la provocan es de suma importancia debido al papel fundamental que tienen los ritmos circadianos en la regulación de la fisiología y los efectos negativos de la desincronización en la salud.

4. Efectos adversos de la exposición a la luz por la noche

En los mamíferos, además de los conos y los bastones que se encuentran en la retina, existe una tercera clase de fotorreceptores llamados células ganglionares intrínsecamente fotosensibles, las cuáles contienen el fotorpigmento melanopsina que las hace intrínsecamente fotosensibles. A diferencia de los otros fotorreceptores que son parte de la vía visual, la presencia de las células ganglionares se ha relacionado con una vía importante en la transmisión de información fótica a diferentes estructuras del SNC encargadas de la sincronización de los ritmos circadianos (Vandewalle et al., 2009). En una investigación post-mortem con humanos, se encontró que las células ganglionares proyectan directamente al NSQ. Por otra parte, en ratones deficientes de melanopsina, se observó que aún con la señal de luz, los ritmos circadianos se atenúan de forma importante (Rüger & Schee, 2009). La información de la luz que llega al sistema circadiano es percibida y transmitida directamente

desde las células ganglionares al NSQ a través de la vía tractoretinohipotalámica (Rüger & Schee, 2009), con el objetivo de sincronizar su actividad con el día y la noche. En este sentido, se sabe, que las neuronas del NSQ se encuentran más activas durante el día (Buijs et al., 2016).

El ciclo luz-oscuridad generado por la rotación de la Tierra, es considerado la señal sincronizadora externa más importante para el reloj circadiano (Vetter, 2020). Sin embargo, los avances tecnológicos han llevado consigo el invento de la luz eléctrica la cual ha permitido que nuestras casas, lugares de trabajo y calles se encuentren iluminadas por luz artificial durante el día y durante la noche con el objetivo de extender las actividades cotidianas como las horas de trabajo o estudio, actividades sociales, etc. A pesar de que estos avances tienen como intención mejorar la calidad de la vida moderna, la exposición a la luz artificial durante la noche provoca la pérdida de la alternancia del ciclo luz-oscuridad, lo cual representa un factor de riesgo para la coordinación de los ritmos circadianos. Por esta razón, se ha propuesto que el estilo de vida actual puede contribuir de forma importante a la disrupción circadiana que se ha asociado con la creciente prevalencia de trastornos metabólicos, trastornos del sueño y enfermedades psiquiátricas (Vetter, 2020).

Se ha descrito que la exposición a la luz artificial durante la noche, tiene consecuencias significativas en el ámbito social, ecológico y también en la salud de los individuos, afectando el sistema reproductivo, el sistema inmunológico, el metabolismo y algunos procesos cognitivos y emocionales (Navara et al., 2007).

5. Efectos adversos de la exposición a la luz tenue por la noche DLAN

En el entorno existen distintas intensidades lumínicas tanto naturales como artificiales, entre ellas se encuentra la luz brillante o de alta intensidad y la luz tenue o de baja intensidad. Las investigaciones sobre los efectos de la exposición a la luz por la noche se han enfocado mayormente en evaluar los efectos de la luz brillante. Sin embargo, actualmente existen múltiples fuentes de luz de baja intensidad que están presentes durante la noche en nuestro día a día, como la luz emitida por los aparatos electrónicos o la que proviene del alumbrado público y que se filtra por las ventanas. Por esta razón, recientemente se han explorado cuáles pueden ser los efectos de la exposición a la luz de baja intensidad o luz tenue durante la noche

(DLAN) sobre la salud de los individuos. En los estudios con modelos animales que evalúan los efectos de la exposición a DLAN, los animales son expuestos a luz con una intensidad de 5 a 10 luxes durante toda la noche.

5.1 Efectos adversos de la exposición a la luz tenue por la noche (DLAN) en machos

La luz tenue por la noche genera múltiples alteraciones negativas en diferentes aspectos de la salud, esta exposición genera una disrupción circadiana que se puede observar por ejemplo en la desorganización de la actividad general posterior su exposición crónica (4 semanas) (Stenvers et al., 2016). Por otra parte, la DLAN se asocia con un mayor riesgo de desarrollar enfermedades metabólicas. En ratones macho se ha encontrado que la exposición a DLAN durante 2-3 semanas incrementa la ganancia de peso y altera los ritmos circadianos de la temperatura contribuyendo a problemas metabólicos relacionados con la desincronización interna entre el oscilador circadiano central (NSQ) y los relojes periféricos que rigen los ritmos de temperatura (Borniger et al., 2014; Fonken et al., 2013).

En una investigación con ratas macho se observó que la exposición a DLAN disminuyó de forma importante la amplitud en los ritmos del sueño REM y NREM y que esta disminución aumentaba con los días (Stenvers et al., 2016). También, en ratas macho, se suprimieron los niveles de la hormona melatonina en plasma después de una exposición corta de 2 semanas y de una exposición prolongada de 5 semanas (Molcan et al., 2019; Rumanova et al., 2020). En cuanto a la salud cardiovascular, se encontró que la DLAN en ratones macho, suprime de forma significativa las oscilaciones de 24 horas en la frecuencia cardíaca y la presión arterial, (Molcan et al., 2019). Además, los genes reloj que rigen las oscilaciones circadianas también son afectados por la DLAN; en ratones macho, la exposición de 3 semanas a DLAN fue suficiente para atenuar la amplitud de los ritmos de *Per1* y *Per2* en el hipotálamo y tejidos periféricos relacionados con funciones metabólicas (Fonken et al., 2013).

La exposición a DLAN afecta el proceso de recuperación de una enfermedad. En ratones macho con isquemia cerebral global, se observó mayor mortalidad durante la semana de recuperación en el grupo expuesto a DLAN en comparación con el grupo control (Fonken et al., 2019). Además, en un modelo de evento cerebrovascular en ratones macho expuestos a DLAN, las citocinas proinflamatorias aumentaron durante los días de recuperación y también

se registraron conductas tipo ansiosas en el campo abierto y daño neuronal exacerbado en el hipocampo (Weil et al., 2020).

Otro aspecto de suma importancia que se ha evaluado son los efectos de la DLAN en las conductas tipo-ansiosas y tipo depresivas. En ratones macho expuestos a DLAN durante 4 semanas se evaluaron las pruebas de nado forzado y de anhedonia con la intención de medir conductas tipo depresivas y tipo-ansiosas y se observaron resultados parecidos; los ratones expuestos a DLAN, duraron más tiempo flotando y consumieron menos agua con azúcar (Fonken et al., 2013). Estos resultados indican que los ratones expuestos a DLAN desarrollan conductas tipo depresivas. Los efectos en las conductas tipo depresivas y ansiosas se han investigado también en ratones expuestos a DLAN durante la adolescencia para conocer si la exposición en edades tempranas podría impactar en las conductas de la edad adulta. Los ratones expuestos a DLAN fueron evaluados posteriormente en la adultez y los resultados mostraron un mayor número de conductas asociadas a la depresión y la ansiedad en las pruebas de laberinto elevado y campo abierto, tanto en hembras como en machos (Cissé et al., 2016).

5.2 Efectos adversos de la exposición a la luz tenue por la noche (DLAN) en hembras

Los efectos de la exposición a DLAN también se ha estudiado en roedores hembras en las que, de igual manera, tiene como consecuencia una disrupción circadiana que se puede observar, por ejemplo, en la pérdida del ritmo de actividad general y el de temperatura después de la exposición a DLAN durante 5 semanas (Gutiérrez-Pérez, 2021). La exposición a DLAN no sólo afecta los ritmos de la actividad general, también tiene consecuencias en diferentes aspectos conductuales, hormonales y reproductivos de las hembras. Al igual que en roedores machos, la exposición a DLAN (6 semanas) se relaciona con ganancia de peso (Aubrecht et al., 2015).

Para determinar los efectos de la exposición a DLAN sobre el sistema reproductivo, se expuso a ratas Wistar hembra a DLAN durante 5 semanas y se evaluó el ciclo estral, las ratas que estuvieron expuestas a DLAN presentaron un ciclo estral irregular, indicando un estado de estro persistente (caracterizado por la presencia de células cornificadas en el frotis vaginal), la exposición a DLAN generó ciclos irregulares en el 100% de las ratas a diferencia

de las ratas controles en las que sólo 20% de las hembras presentó ciclos irregulares (Gutiérrez-Pérez, 2021).

Además de los efectos sobre el sistema reproductivo, la exposición a DLAN genera también cambios hormonales en las ratas hembra, después de una exposición durante 5 semanas, las ratas expuestas a DLAN no presentaron una diferencia significativa entre los niveles de corticosterona diurnos y nocturnos y se observó una disminución significativa en las concentraciones nocturnas de la hormona melatonina en comparación con el grupo control (Gutiérrez-Pérez, 2021).

En hámster hembras ovariectomizadas expuestas a DLAN durante 8 semanas, se observó una diferencia en las pruebas de nado forzado entre los grupos, los hámsteres expuestos a DLAN pasaban más tiempo flotando y menos tiempo intentando escalar, además consumieron menos agua con azúcar durante la prueba de anhedonia (Bedrosian et al., 2011). En un estudio realizado con hámsteres hembras ovariectomizadas expuestas a DLAN durante 4 semanas se encontraron conductas tipo depresivas en las pruebas de anhedonia y nado forzado, menor expresión del factor neurotrófico BDNF y una mayor expresión del factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) (Bedrosian et al., 2013). Lo anterior sugiere una relación importante entre los efectos inflamatorios de la exposición a DLAN y las conductas tipo depresivas. Por último, la exposición a DLAN durante 5 semanas en ratas Wistar hembra generó cambios en la prueba de campo abierto, en la que las ratas de la condición DLAN mostraron menos exploración que las ratas control, esta conducta se asoció con una conducta tipo ansiosa, también se observaron diferencias en la prueba de anhedonia, las ratas expuestas a DLAN tuvieron un menor porcentaje de consumo de agua con azúcar en comparación con las ratas control, esta conducta se describe como una conducta tipo depresiva (Gutiérrez-Pérez, 2021).

6. Efectos adversos de la exposición a la luz tenue por la noche (DLAN) en el periodo gestacional

El entorno de la vida temprana puede impactar directamente en los individuos, a veces de forma negativa predisponiéndolos a enfermedades o trastornos en etapas más tardías de la vida. El periodo gestacional es un periodo clave para el desarrollo de un mamífero, las situaciones que se presentan durante este periodo son de suma importancia ya que tendrán

consecuencias directas en la vida adulta. Durante todo el periodo gestacional, la madre aporta nutrientes, oxígeno y hormonas al feto a través de la placenta, la cual se encarga de regular qué sustancias pueden ingresar al feto (Serón-Ferré et al., 2012). Una de las pocas hormonas maternas que tiene la capacidad de atravesar la placenta es la melatonina, esta hormona junto con la temperatura y la ingesta de alimentos de la madre influyen de forma directa en la regulación de los ritmos circadianos del feto, por lo tanto, es la madre la que determina los ritmos biológicos del feto durante todo el periodo gestacional e incluso algunos estudios demuestran que las señales maternas son necesarias para sincronizar los ritmos circadianos en el periodo posnatal (Serón-Ferré et al., 2012). Debido a lo anterior, la disrupción de los ritmos circadianos de la madre durante este periodo tiene un efecto en la salud de su descendencia. Por esta razón, algunos estudios se han enfocado en evaluar las consecuencias transgeneracionales de la alteración del ritmo circadiano provocado por la exposición a DLAN previo y durante la gestación.

6.1 Efectos de la exposición a la luz tenue por la noche (DLAN) previo al periodo gestacional

Para evaluar las posibles alteraciones en las conductas tipo depresivas y ansiosas provocadas por la exposición a DLAN en la descendencia, se expusieron hámsteres hembras y machos a DLAN durante 9 semanas para posteriormente aparearlos. Al nacer, las crías se mantuvieron en un ciclo normal de luz-oscuridad, a las 8 semanas de nacimiento, PN56, se evaluaron conductas tipo ansiosas y depresivas. Las crías de hembras expuestas a DLAN consumieron menos agua con azúcar a comparación de los controles, mientras que las crías de machos expuestos a DLAN permanecieron más tiempo flotando en la prueba de nado forzado (Cissé, et al. 2017). Estos resultados muestran que la exposición de ambos padres a DLAN previa a la gestación es suficiente para generar cambios en las conductas tipo depresivas de las crías a pesar de que estas se encuentren en un ciclo de luz-oscuridad desde su nacimiento.

En roedores, se ha descrito que la exposición a la luz brillante durante la noche altera las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas (Fonken et al., 2013). Estas alteraciones se han asociado con cambios endocrinos ocasionados por la disrupción circadiana que resulta de la exposición a la luz durante la noche. De manera interesante, la exposición a DLAN también provoca cambios en la respuesta inmune (Bedrosian et al., 2013), por esta razón, se han

explorado cuáles son las consecuencias que tiene la exposición a DLAN antes del periodo de gestación en la respuesta inmune. Hámsteres hembras y machos fueron expuestos a DLAN durante 8 semanas para emparejarse posteriormente, durante el periodo de gestación y el desarrollo de las crías se mantuvieron las condiciones de un ciclo de luz-oscuridad. En respuesta a la inoculación de un reto inmune con lipopolisacárido (LPS), los resultados de las evaluaciones mostraron que las crías machos de padres (machos) expuestos a DLAN previo a la gestación, presentaron disminución del ritmo de la actividad general en relación con las crías controles; las crías machos de madres expuestas a DLAN disminuyeron su temperatura corporal promedio en relación con las crías macho de madres control. Por otra parte, se observó que las crías machos de madres y padres expuestos a DLAN aumentaron significativamente la expresión de la citocina pro inflamatoria TNF α en el hipotálamo en comparación de las crías machos control (Cissé et al., 2020). Otra investigación que se realizó con el objetivo de conocer las consecuencias transgeneracionales en la función inmunológica por la exposición a DLAN se realizó en hámsteres hembras y machos que fueron expuestos a DLAN durante 9 semanas para posteriormente ser puestos a condiciones de luz-oscuridad durante el periodo de gestación y durante el desarrollo de las crías. Cuando las crías llegaron a la adultez, se evaluó la expresión relativa del receptor a melatonina 1 (MT1), en el bazo ya que la melatonina es un potente inmunomodulador que tiene la capacidad de potenciar las respuestas inmunitarias. Se observó que las crías de machos expuestos a DLAN presentaron una disminución en la expresión de MT1 con relación a los controles, mientras que en las crías de madres expuestas a DLAN la expresión de MT1 aumentó durante el día en comparación con las crías de hembras controles (Cissé et al., 2017).

6.1 Efectos de la exposición a la luz tenue por la noche (DLAN) previo y durante el periodo gestacional

También se ha explorado cuáles pueden ser los efectos de la exposición a DLAN previo y durante el periodo gestacional. En nuestro laboratorio, se expusieron a ratas hembra a DLAN durante 5 semanas previas a la gestación y también durante la gestación (~22 días), evaluamos el peso de las crías desde el nacimiento hasta el destete (PN25) y encontramos que las crías (machos y hembras) de madres expuestas a DLAN presentaban un mayor peso al nacer en comparación con los machos de madres control y esta diferencia de peso entre

grupos se mantuvo hasta el destete (PN25). También se evaluó el consumo de alimento en las crías a partir del PN40 y se observó que las crías hembra de las madres expuestas a DLAN presentaron una tendencia a consumir más alimento del PN40 al PN70 a diferencia de los machos los cuales tendieron a consumir menos alimento que el grupo control.

También, durante la adolescencia se evaluó la conducta de las crías para saber si la exposición a DLAN previa y durante la gestación podía tener un efecto en las conductas tipo depresivas y tipo ansiosas. En la prueba de campo abierto, los machos de madres DLAN presentaron una disminución en los cruces al centro en comparación con las crías del grupo control y las crías hembras de madres DLAN presentaron mayor número de eventos de acicalamiento y menor actividad total en comparación con las hembras del grupo control sugiriendo que la exposición materna a DLAN previo y durante la gestación promueve conductas tipo ansiosas en la descendencia. Además, para evaluar los efectos en la interacción social durante la adolescencia (PN40) se evaluó la conducta de juego social con pares y se observó que las crías machos de madres expuestas a DLAN presentaban un menor número de conductas de juego en comparación con los machos crías de las madres control (Gutiérrez-Pérez, 2021). La exposición a DLAN antes y durante la gestación impacta de forma directa en los ritmos circadianos de las madres gestantes y como consecuencia, afecta el desarrollo y la conducta de las crías en la etapas adolescentes y adultas.

6.2 Efectos de la exposición a la luz tenue por la noche (DLAN) exclusivamente durante el periodo gestacional y/o posnatal

También se han abordado cuáles pueden ser las consecuencias a largo plazo de la exposición a DLAN exclusivamente durante la gestación (21 días aproximadamente) y/o durante el período postnatal temprano durante (21 días). Ratones hembra fueron expuestos a DLAN durante estos dos periodos y sus crías fueron evaluadas en la adultez a la edad de PN60. Las crías de madres expuestas a DLAN durante la gestación y previo a la gestación mostraron más conductas tipo ansiosas en la prueba de laberinto elevado en la que tardaron significativamente más tiempo en cruzar en comparación de las crías controles (Borniger et al., 2014).

7. Regulación circadiana

7.1 Regulación circadiana de la microglía en reposo

Como comentamos en secciones anteriores, la respuesta del sistema inmune también se ve alterada ante la exposición a DLAN. En los últimos años, la investigación respecto a la regulación circadiana de la microglía ha aumentado. La microglía es un tipo de célula glial del sistema nervioso central, esta célula forma parte del sistema inmunológico innato del cerebro y la médula espinal y tiene la capacidad de fagocitar patógenos. A diferencia de otras células gliales como los oligodendrocitos y los astrocitos, la microglía tiene un origen mesodérmico (Graeber & Streit, 2009).

En estado basal la microglía se encarga de vigilar el parénquima cerebral por medio de sus procesos y ante la presencia de un patógeno o lesión puede activarse liberando citocinas, quimiocinas o fagocitando. Sin embargo, aunque esta respuesta es de suma importancia para mantener un estado fisiológico equilibrado, la respuesta inmune proinflamatoria o la neuroinflamación, impulsada por la activación de la microglía se ha asociado como factor clave para la contribución de múltiples enfermedades neurodegenerativas (Rodríguez-Gómez et al., 2020).

Uno de los aspectos que se ha investigado ampliamente en la microglía es la expresión de los genes reloj y sus factores de transcripción, por ejemplo, se sabe que en la microglía los genes *Per1* y *Per2* se expresan rítmicamente a lo largo de las 24h (Nakanishi et al., 2021). En investigaciones en donde se aisló la microglía del hipocampo y de la corteza de ratas, se encontró un pico de expresión de ambos genes durante la mitad de la fase de luz (Fonken et al., 2015). Además, se registró que el punto más alto de expresión del gen *Per1* ocurre a la mitad de la fase de descanso en roedores mientras que la acrofase de *Per2* se presenta a la mitad de la fase de descanso (Fonken et al., 2016). Estas variaciones circadianas en la expresión de ambos genes en la microglía son persistentes incluso condiciones de oscuridad constante (DD) (Deurveilher et al., 2021), lo que sugiere que los ritmos de *Per1* y *Per2* no dependen de los estímulos exógenos.

Una característica muy importante de la microglía es su morfología, los cambios y estados morfológicos de la microglía han sido ampliamente investigados debido a la correlación que tienen con la actividad de la célula. La morfología ramificada de la microglía se ha asociado

con su estado en reposo o vigilancia, mientras que la morfología ameboide o menos ramificada se ha relacionado con su actividad (Liu et al., 2022). La investigación respecto al factor circadiano ha evidenciado que existe una diferencia en la morfología de la microglía a lo largo del día. En la microglía aislada de la corteza de ratón se observan variaciones morfológicas con una mayor ramificación de las células durante la fase de oscuridad y menor durante la fase de luz (Martinez-Tapia et al., 2020), mientras que, en microglía aislada de corteza somatosensorial de ratón, las variaciones diurnas en la morfología se caracterizan por ramificaciones más largas y complejas durante la fase de oscuridad en comparación con la fase de luz (Deurveilher et al., 2021). Por otra parte, durante el sueño se observa una morfología ramificada (morfología R-type) mientras que durante la vigilia se observa una morfología hiper-ramificada (morfología HR-type) (Nakanishi et al., 2021). Estos ritmos morfológicos en la microglía persisten incluso en condiciones de oscuridad constante (DD), en donde se observan procesos microgliales más largos y complejos durante la noche subjetiva o “circadian time” (CT) 14 en comparación con el día subjetivo (CT2) (Deurveilher et al., 2021).

7.2 Regulación circadiana de la respuesta inmune de la microglía ante patógenos

Se ha observado que la morfología de la microglía se modifica ante la presencia de un patógeno. En una investigación se describió que, en situación de reposo, tanto el promedio de la longitud como de número de ramas es más alto en la noche que en el día. Sin embargo, en presencia de un patógeno esto se invierte y se observa una mayor extensión de las ramas en el principio del día en roedores en comparación con el principio de la noche (fase de actividad) (Martinez-Tapia et al., 2019).

Por último, diversas investigaciones abordan las diferencias circadianas de la respuesta de la microglía ante un reto inmunológico, específicamente en respuesta a la inoculación de LPS, con el objetivo de saber si existe una diferencia en la respuesta dependiente de la hora del día en la que se presenta el reto inmunológico. Estas investigaciones han demostrado que la microglía aislada de hipocampo de rata produce más citocinas pro-inflamatorias como la IL-1 β cuando el LPS es administrado durante la mitad fase de luz, en comparación con la

administración en la fase de oscuridad (Fonken et al., 2015). Estos resultados indican que la microglía parece ser más reactiva a LPS durante el día en comparación con la noche.

8. Efectos de DLAN en la microglía y su respuesta inmune

El sistema inmunológico está sujeto a regulación circadiana y en la periferia regula la actividad de los macrófagos ante estímulos inflamatorios (Musiek et al., 2016). Además, la ablación del NSQ tiene como consecuencia la amplificación de la respuesta inmune innata (Guerrero-Vargas et al., 2015). Por esta razón, cuando existe un factor ambiental que genera una disrupción circadiana, la respuesta inmune se verá afectada. En ratones con modelo de desfase de horario se encontró una mayor cantidad de marcadores inflamatorios (Castanon-Cervantes et al., 2010), mientras que en un modelo de “trabajo nocturno” en ratas, se observó una mayor producción de citocinas inflamatorias como TNF α e IL-6 en la circulación después de la administración de LPS (Guerrero-Vargas et al., 2015). La exposición a la luz nocturna puede interrumpir el funcionamiento del sistema circadiano, alterando la reactividad neuroinmune, en una investigación donde se evaluaron los efectos de la exposición a DLAN durante periodos críticos del desarrollo en la función neuroinmune, ratones hembra jóvenes expuestas a DLAN durante 15 días mostraron un mayor el nivel de las citocinas proinflamatorias TNF α , IL-1 β , IL-6, en el hipocampo después de una administración de LPS (Chen et al., 2021). Además, en un modelo de evento cerebrovascular en ratones expuestos a DLAN durante su recuperación, se midió la expresión génica de IL-6, IL-1 β y TNF α en la corteza y se observó que la expresión de las tres citocinas fue significativamente mayor en los ratones expuestos a DLAN en comparación con los controles (Weil et al., 2020). La regulación circadiana de la respuesta inmune de la microglía ha sido ampliamente estudiada, los resultados de múltiples estudios hacen evidente que esta respuesta presenta cambios a lo largo del día.

Fonken et al. (2016) describen que en la microglía de hipocampo de rata las citocinas proinflamatorias como IL-1 β e IL-6 presentan un ritmo de 24h a lo largo del día, además se ha encontrado que los niveles de IL-1 β tiene un mayor pico de expresión durante el comienzo la fase de luz, 6-8 horas después de prender la luz, a comparación la mitad del periodo de

oscuridad, 4-6 horas después de apagar la luz (Martinez-Tapia et al., 2019), este pico coincide con la propensión máxima al sueño REM y el inicio del sueño (Deurveilher et al., 2021). Debido a que la microglía posee relojes circadianos y su respuesta inmune presenta una variación circadiana (Fonken et al., 2015; Hayashi et al., 2013; Musiek et al., 2016), también se ve afectada ante la presencia de un disruptor circadiano. La desincronización circadiana inducida por cambios en el ciclo de luz y oscuridad tiene un impacto importante en la actividad, la respuesta y las funciones de la microglía. En un modelo de isquemia cerebral global los ratones se expusieron a DLAN un día después del evento para saber cómo se afectaba su recuperación y se observó que el daño neuronal fue significativamente mayor en los ratones sobrevivientes expuestos a DLAN en comparación con los controles. Además, se evaluó la inmunorreactividad de IBA1 (un marcador de microglía) y la expresión de citocinas proinflamatorias; ambas aumentaron en ratones expuestos a DLAN (Fonken, 2019). En otra investigación, ratones adultos fueron expuestos a DLAN durante 10 semanas, posteriormente se midió la expresión del marcador microglial IBA1 en el núcleo arqueado en el hipotálamo (ARC) y se observó que este marcador aumentó significativamente en el grupo de DLAN (Wyse et al., 2016). De igual modo, en ratones adultos expuestos a luz blanca tenue (DLAN-WL) y a luz tenue luz azul (DLAN-BL) durante 4 semanas, se observó mayor número de microglia en el hipocampo en comparación con el grupo control, para ambas condiciones. Además se realizó un análisis para medir la morfología de microglía (análisis de Sholl), en el que se encontró que tanto en las microglia del grupo DLAN-WL como las del grupo DLAN-BL se redujo el número de puntos finales, ramas y uniones triples de la microglía del hipocampo, lo que se relaciona con una morfología menos ramificada y más de tipo ameboide sugiriendo activación microglial (Liu et al., 2022).

9. Microglía en el desarrollo (poda neural)

La microglía es de suma importancia cuando hay una enfermedad causada por un patógeno o una lesión en el SNC. Sin embargo, sus funciones en el cerebro no se limitan únicamente a ello, la microglía tiene un papel fundamental en el cerebro sano durante el desarrollo posnatal, en la plasticidad neuronal y en las funciones de diferentes circuitos neuronales (Tremblay et al., 2011).

Las primeras semanas postnatales son un periodo muy significativo en el desarrollo de la plasticidad neuronal, ya que durante este periodo el cerebro posee una gran densidad sináptica, es decir, más sinapsis de las que se conservarán posteriormente durante la adultez. Mediante diferentes mecanismos una cantidad importante de estas sinapsis son eliminadas de forma permanente, mientras que otro conjunto de sinapsis se mantienen y se fortalecen, a este proceso se le llama poda neuronal o poda sináptica y se ha observado en diferentes circuitos del SNC. La importancia de la poda sináptica durante el desarrollo postnatal radica en el refinamiento y remodelación de los circuitos sinápticos para un óptimo funcionamiento (Tremblay et al., 2011; Sominsky et al., 2018).

Uno de los mecanismos por los que se lleva a cabo la poda sináptica es mediado por la microglía. En diferentes áreas del cerebro, como en el tálamo, el cerebelo, el bulbo olfatorio y el hipocampo se han observado microglías activadas durante el periodo de poda sináptica. En cada estructura la microglía interactúa con las sinapsis y las elimina por medio de la fagocitosis (Figura 2) (Tremblay et al., 2011). Un modelo clásico para estudiar la poda sináptica ha sido el sistema retinogeniculado (vía visual) de roedores, el cual se ha utilizado para investigar la participación de la microglía en la eliminación permanente de sinapsis durante el desarrollo y entender cuáles son los mecanismos celulares y moleculares a través de los cuales se realiza dicha eliminación (Tremblay et al., 2011; Schafer et al., 2012). En un estudio en el que se utilizaron trazadores anterógrados (CTB) para marcar las proyecciones desde la retina al núcleo geniculado laterodorsal (NGLD) y ratones modificados genéticamente para poder marcar la microglía (ratones CX3CR1+/GFP), se encontró que la microglía localizada en el NGLD colocalizaban con la marca de CTB. Además, se observó un aumento significativo de CD68 un marcador de fagocitosis. Esta actividad se evaluó en diferentes etapas postnatales y se encontró que durante el PN5 se podía observar un mayor volumen de sinapsis fagocitadas por la microglía a comparación con el PN9 y PN30 (Schafer et al., 2012). Estos resultados sugieren que la microglía tiene un papel fundamental en la poda sináptica de la vía visual en la etapa postnatal mediante la fagocitosis (Figura, 2).

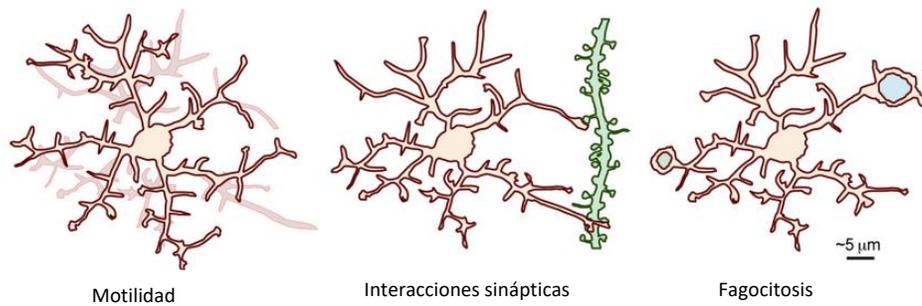


Figura 2. *Microglía fagocitando sinapsis.* La microglía tiene procesos altamente móviles que sensan el medio para remodelar y reestructurar los circuitos neuronales por medio de la fagocitosis interactuando con las sinapsis Tremblay et al., 2011. Traducida de *The Role of Microglia in the Healthy*

En otro estudio se realizaron una serie de experimentos en ratas con el objetivo de evaluar el papel de la microglia en la eliminación de células positivas para el receptor a dopamina 1 (D1r) en el núcleo Accumbens (NAc), en diferentes etapas postnatales, representativas a la pre-adolescencia (PN20), adolescencia (PN30), adolescencia media (PN38) y adolescencia tardía (PN54). Se realizó una triple inmunofluorescencia con el marcador de microglía IBA1, el marcador del receptor de dopamina 1 (D1r) y el marcador de la proteína del complemento C3 (C3). La proteína del complemento C3 es una etiqueta que se ha observado en sinapsis durante la poda sináptica (Schafer, 2012), la microglía puede reconocer el C3 a través de su receptor C3R o CD11b, para fagocitar y degradar las sinapsis. Los resultados de la inmunofluorescencia mostraron que tanto el pico de IBA1, D1r y C3 coincidían en el PN30, mientras que la densidad de D1r disminuyó significativamente en PN38 y PN54. Además, por medio de una reconstrucción 3D, se observó que la microglía colocalizaba y contactaba con D1r y C3, posteriormente para saber si existía actividad fagocítica por parte de la microglía, se realizó otra triple inmunofluorescencia con D1r, C3 y CD68. Los resultados mostraron niveles significativamente más altos de CD68 en PN30 que coinciden con los picos de IBA1, D1r y C3. Además, se observó la colocalización entre CD68, D1r y C3. Por último, se realizó un bloqueo químico del receptor CD11b, el bloqueo tuvo como resultado un porcentaje significativamente más alto de inmunorreactividad D1r en comparación con el vehículo (Kopeck, 2018). Estos resultados demuestran que la actividad fagocítica de la microglía y su interacción con la proteína del complemento C3 es un mecanismo importante para el refinamiento del circuito dopaminérgico del NAc, es decir la poda sináptica que se da durante la adolescencia. Se sabe que la vía dopaminérgica del NAc es una de las principales

vías asociadas la conducta de juego (Achterberg et al., 2015), por medio de diferentes experimentos, se demostró que el refinamiento de este circuito afecta de forma importante con la conducta de juego en el roedor (Kopec et al., 2018).

10. Conducta de juego en rata

La conducta de juego se presenta en animales sanos que se encuentran en contextos seguros y generalmente se caracteriza por la presencia de patrones de movimientos voluntarios estereotipados que se realizan repetidamente. Esta conducta contiene patrones motores estandarizados que se asemejan a conductas funcionales observadas tanto en otros contextos como en edades posteriores, como la conducta sexual, la depredación y las conductas agresivas entre pares. En ratas, la conducta de juego se puede observar a partir de los 24 días postnatales con un pico entre los 30 y 40 días de edad, lo cual corresponde al periodo de la adolescencia (Panksepp et al., 1981; Thor et al., 1984; Kopec et al., 2018). El juego tiene un fuerte componente emocional, siendo su rasgo más característico su alto valor recompensante, esto se ha demostrado a través de pruebas conductuales como condicionamiento del lugar, prueba en la que los individuos desarrollan una preferencia por un entorno asociado a una recompensa, y a través de condicionamiento operante, en el que la conducta de juego funge como el estímulo recompensante (Vanderschuren et al., 2016). Aunque pueden presentarse de forma simultánea, se han identificado y descrito tres categorías generales importantes en la conducta de juego (Figura 3) (Pellis et al., 2019):

1. El juego locomotor, el cual implica la presencia de un animal solitario realizando patrones de comportamiento como saltos, patadas, rotaciones corporales y giros bruscos.
2. El juego con objetos, en el que se puede observar un animal solitario arrojando, cargando, rasgando o manipulando un objeto inanimado.
3. El juego social, el cual involucra la participación de dos o más congéneres que luchan, saltan o mantienen contacto físico continuo.

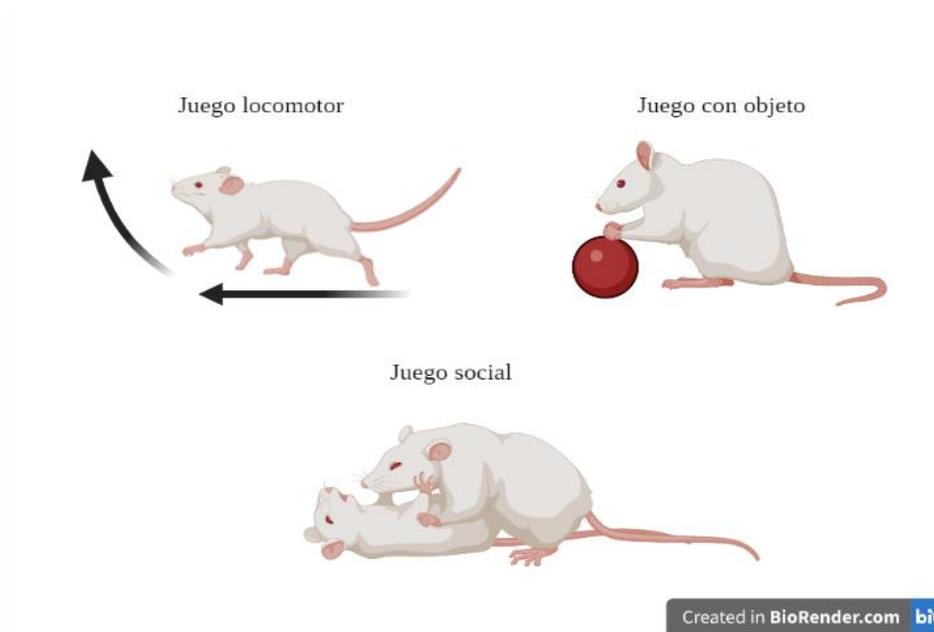


Figura 3. *Categorías descritas del juego.* Representación gráfica de las tres categorías que se han descrito de la conducta de juego en ratas: juego locomotor, juego con objeto y juego social. Imagen creada en BioRender.com

Se ha demostrado que las interacciones sociales que ocurren durante el juego en el desarrollo temprano, posterior al destete, son críticas para el desarrollo social y cognitivo en la etapa adulta (Achterberg et al., 2015), además la conducta de juego social se relaciona con el desarrollo de capacidades físicas, cognitivas y sociales tanto en animales como en humanos (Panksepp et al., 1984; Pellis et al., 2010). Se ha propuesto que las funciones de la conducta de juego se relacionan con la capacidad de favorecer y beneficiar el desarrollo de conductas y capacidades que son importantes en la etapa adulta, entre estas capacidades se puede encontrar el refinamiento de las habilidades motoras, la competencia social de los adultos, la obtención de alimento y la conducta sexual (Pellis et al., 2010). Por esta razón, la presencia de la conducta de juego durante edades tempranas del desarrollo es un factor importante en el desarrollo de conductas sociales específicas en la adultez relacionadas con la agresión, el dominio, la alimentación y la sexualidad, entre otras (Pellis et al., 2019).

Se ha descrito que el aislamiento y la privación de juego durante la adolescencia provoca una reducción en la actividad social en la etapa adulta (Hol et al., 1999), respaldando la idea de que la adolescencia es una etapa importante en el desarrollo para la conducta social en etapas posteriores.

Se ha observado que los factores del ambiente pueden influir de manera significativa en la conducta de juego social. En un estudio con ratas que fueron mantenidas durante toda su vida en condiciones de luz tenue por la noche (20-40lx), se encontró que bajo condiciones de luz intensa algunas conductas de juego se suprimieron completamente y otras disminuyeron de manera significativa (Vanderschuren et al., 1995).

También se han investigado los efectos del estrés prenatal en la conducta de juego social y se ha observado que, ante la presencia de un factor estresante durante el periodo de gestación, las crías presentaron una mayor latencia para comenzar el juego en comparación con las crías controles (Takahashi et al., 1992), sugiriendo que el estrés durante la gestación afecta la conducta social de juego.

La conducta de juego también sirve como un indicador de salud, en animales enfermos esta conducta es casi nula y en humanos con trastornos psiquiátricos durante la infancia y adolescencia se ha observado que la conducta de juego social se encuentra alterada (Manduca et al., 2016). El estudio de las alteraciones de la conducta de juego es de interés para las investigaciones de trastornos que implican cambios en el comportamiento social, como la ansiedad, el autismo juvenil, el trastorno por déficit de atención con hiperactividad, la depresión y la esquizofrenia, debido a que se utiliza como una forma de evaluar la conducta social en modelos animales durante la adolescencia (Vanderschuren et al., 1995). Específicamente, existe una estrecha relación entre la conducta social y la ansiedad; se ha descrito que el aislamiento social en edades tempranas tiene como consecuencia el desarrollo de conductas tipo ansiosas en la adultez (Vanderschuren et al., 2016).

10. 1 Sistema de recompensa en la conducta de juego en ratas

Múltiples estructuras del sistema nervioso están involucradas en la conducta de juego social. Para conocer qué estructuras pueden mediar esta conducta en ratas, se ha analizado la presencia del marcador de transcripción c-Fos (marcador de activación neuronal) en el cerebro de roedores después de jugar. Se ha observado la activación de estructuras como la corteza somatosensorial, la corteza prefrontal, la corteza orbitofrontal, la corteza parietal, el cíngulo anterior, el tálamo dorsal, el colículo superior, la amígdala, el hipotálamo

ventromedial y dorsomedial, la sustancia gris periacueductal dorsal y ventral, el estriado dorsal y ventral, así como el núcleo accumbens (Gordon et al., 2002; Charles Lawrence et al., 2008; Van Kerkhof et al., 2013).

Entre esas múltiples estructuras, las que más relevancia han tenido en la investigación de la neurobiología de la conducta de juego social son las que conforman el circuito de la recompensa. Debido a que la conducta de juego social es altamente recompensante, se sabe que su expresión es modulada a través de sistemas que también están implicados en otros tipos de recompensas como la comida, el sexo y las drogas de abuso, es decir, el circuito de la recompensa (Achterberg et al., 2015).

En un estudio con ratas Wistar (PN26), donde se utilizaron métodos de inactivación farmacológica de receptores en la corteza prefrontal medial y en el estriado (dos de las estructuras más importantes en el sistema de recompensa) para conocer su participación, se observó que la inactivación de los receptores glutamatérgicos en subregiones de la corteza prefrontal como la corteza prelimbica, la corteza infralímbica y la corteza orbitofrontal medial y ventral redujo de forma significativa tanto la frecuencia como la duración del juego social. Mientras que la inactivación de receptores gabaérgicos en el estriado dorsomedial incrementó la frecuencia y duración del juego social, además la inactivación de receptores gabaérgicos en el núcleo accumbens (NAc) core incrementó la duración del juego social (Van Kerkhof et al., 2013). Estos resultados destacan la importancia que tiene la actividad de la corteza prefrontal medial y el estriado para la expresión de la conducta de juego social.

10.2 Núcleo Accumbens y receptores de dopamina en la conducta de juego en ratas

Debido a que la dopamina se caracteriza por tener un papel fundamental en procesos de recompensa y el juego social se caracteriza por ser altamente reforzante y estar modulado por neurotransmisores involucrados en la recompensa y la motivación, se ha estudiado cuál es la función de la vía dopaminérgica del sistema de recompensa en esta conducta (Vanderschuren et al., 2016).

En una investigación se encontró que la aplicación de antagonistas de receptores dopaminérgicos, específicamente el receptor a dopamina 1 (D1r), inhibía de forma

importante la conducta social (Achterberg et al., 2015), confirmando de forma general que la conducta de juego está mediada por la actividad de los receptores D1r.

Por otra parte, múltiples estudios han demostrado que el NAc, estructura relacionada de forma importante con la recompensa y la motivación, modula de forma relevante la conducta de juego social (Vanderschuren et al., 2016). Se ha demostrado que la depleción de dopamina en el estriado por medio de la administración de hidroxidopamina, altera la conducta de juego social, específicamente interrumpe la secuencia de los patrones de juego entre pares (Pellis, 1993). Además, la expresión de los receptores D1r en el estriado ventral aumenta desde la preadolescencia hasta la adolescencia (Kopec et al., 2018).

Con base en estos hallazgos que asocian sustancialmente la actividad de los receptores D1r en el NAc para la expresión de la conducta de juego, se realizó una investigación en la que se manipuló la actividad dopaminérgica en el NAc con la intención de conocer de qué forma se veía afectada la conducta de juego social en ratas. Se administró una infusión intra-accumbens de un agonista del receptor D1r, la apomorfina y se observó un aumento en la conducta de juego social. Mientras que el tratamiento intra-accumbens de un antagonista no selectivo del receptor de D1r, alfa-flupentixol, inhibió de forma importante los efectos estimulantes del juego inducidos por el tratamiento anterior con el agonista, además dosis más altas del alfa-flupentixol redujeron el juego de animales motivados a jugar después de un aislamiento social prolongado (Manduca et al., 2016). Otra investigación con ratas midió la conducta de juego y la expresión de receptores de D1r en diferentes etapas postnatales del desarrollo, representativas a pre-adolescencia (PN20), adolescencia (PN30), adolescencia media (PN38) y adolescencia tardía (PN40), aunque en todas las edades se observó conducta de juego y expresión de D1r en diferentes medidas, tanto la presencia de juego como la expresión de D1r presentaron mayores niveles en el PN30. En otro estudio se inyectó un silenciador de ARN del D1r (D1r siRNA) en el NAc y se midió la conducta de juego en el PN30, se observó una disminución significativa en la conducta de juego de las ratas que fueron inoculadas con D1r siRNA en comparación con las que fueron inoculadas con el vehículo (Kopec et al., 2018). Estos resultados comprueban el papel fundamental del receptor D1 en la conducta de juego social.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El avance tecnológico ha generado un cambio radical en el estilo de vida lo cual impacta directamente en la salud. Las zonas urbanas tienen altos niveles de contaminación lumínica haciendo cada vez más frecuente la exposición a diversas fuentes lumínicas de alta y baja intensidad durante la noche. Aunque pudiera considerarse inofensiva para la salud (debido al bajo nivel de iluminación), la exposición a la luz tenue por la noche (DLAN), es una señal inadecuada para el reloj biológico, encargado de la organización temporal de la fisiología. Aunque pareciera inofensiva por el bajo nivel de iluminación. Los hábitos y el estilo de vida de las mujeres antes y durante el periodo gestacional repercuten significativamente en el desarrollo y la salud de su descendencia. Estos efectos se han investigado en modelos animales. Por ejemplo, se ha descrito que la exposición a DLAN previo a la gestación tiene consecuencias en la respuesta inmune de las crías (Cissé et al., 2020). Aunque se sabe que la luz durante la noche tiene consecuencias en la salud, en la actualidad existe poca información sobre cuáles podrían ser los efectos neuroinmunológicos en las crías de madres expuestas a la luz tenue durante la noche en el periodo gestacional. Actualmente, las mujeres en edad reproductiva se exponen frecuentemente a la luz durante la noche, debido a las condiciones sociales, tecnológicas y de trabajo. A pesar de esto, no existen estudios que aborden los efectos neuroinmunológicos de la exposición a la luz por la noche en su descendencia, específicamente durante la adolescencia. Este trabajo evalúa las alteraciones neuroinmunológicas y en la conducta de juego en crías de hembras expuestas a DLAN en antes y durante el periodo gestacional. Lo anterior es de gran interés para dilucidar el efecto de la exposición a DLAN en etapas tempranas del desarrollo sobre las conductas sociales en etapas posteriores de la vida. Se sabe que las alteraciones en las conductas sociales en etapas tempranas del desarrollo afectan y moldean de forma significativa las conductas sociales en la etapa adulta. Por ejemplo, el juego social en ratas durante las etapas tempranas del desarrollo consiste en patrones conductuales relacionados con aspectos sociales importantes, las ratas son muy susceptibles a los efectos del aislamiento social durante el periodo conformado entre el destete y la maduración sexual, se ha observado que la privación de juego social durante este periodo crítico provoca alteraciones en los patrones de conducta social, conducta sexual y conductas agresivas durante la adultez (Vanderschuren et al., 1997).

OBJETIVO

General

Analizar los efectos neuroinmunológicos y en la conducta de juego en las crías macho de ratas hembra de la cepa Wistar expuestas a DLAN antes y durante el periodo gestacional

Específicos

- Evaluar la conducta de juego social en ratas macho adolescentes y crías de ratas hembra expuestas a DLAN antes y durante el periodo gestacional.
- Evaluar la presencia del marcador de microglía IBA1 en el núcleo accumbens en crías macho de ratas hembra expuestas a DLAN antes y durante el periodo gestacional.
- Evaluar la morfología de la microglía en el núcleo accumbens en crías macho de ratas hembra expuestas a DLAN antes y durante el periodo gestacional.
- Determinar cambios en la expresión de receptores dopaminérgicos del núcleo accumbens en crías macho de ratas hembra expuestas a DLAN antes y durante el periodo gestacional.
- Evaluar la interacción entre la microglía y los receptores de dopamina D1r.

HIPÓTESIS

- H: Las crías macho de madres expuestas a DLAN presentarán una disminución en la conducta de juego social.
- H: Las crías macho de madres expuestas a DLAN presentarán mayor número de células positivas al marcador de la microglía IBA1.
- H: Las crías macho de madres expuestas a DLAN presentarán microglía con morfología menos ramificada.
- H: Las crías machos de madres expuestas a DLAN presentarán una disminución en la intensidad de receptores dopaminérgicos en el núcleo accumbens.
- H: Las crías de machos de madres expuestas a DLAN presentarán una mayor colocalización entre el marcador IBA1 y el marcador D1r.

MATERIAL Y MÉTODO

Sujetos experimentales

Ratas hembra de la cepa Wistar con un peso entre 200-250 gramos fueron obtenidas del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Estas ratas se dividieron en dos condiciones experimentales: LD (ratas expuestas a un ciclo de luz/oscuridad) y DLAN (ratas expuestas a un ciclo de luz/luz tenue) durante 5 semanas y durante todo el periodo gestacional (~21 días). Las crías de las hembras de ambos grupos fueron colocados en cajas en armarios aislados que albergaban a ocho animales cada uno en una habitación insonorizada con condiciones de temperatura controlada (22±1 °C) y con agua y alimento ad libitum (Rodent Laboratory Chow 5001, Purina, Minnetanka, MN, EE.UU). La manipulación de los animales se realizó bajo las normas de uso de animales de experimentación según el decreto de la ley de protección a los animales del Distrito Federal, publicada en la Gaceta Oficial del Distrito Federal 26/02/02. Los procedimientos experimentales para este estudio fueron aprobados por el Comité de Ética de la Investigación de la Facultad de Medicina (FM/DI/069/2020) y por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL: 023-CIC-2020).

Diseño experimental

Madres:

Todas las hembras obtenidas del bioterio se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad (12 h luz, 150 luxes:12h oscuridad 0 luxes) las luces se prendían a las 7:00 horas (Zeitgeber Time 0; ZT0) y se apagaban a las 19:00 horas (ZT12) durante una semana para adaptarse. Después, se eligieron aleatoriamente hembras para el grupo control y el grupo experimental. Las hembras del grupo control se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad (12h luz, 150 luxes:12h oscuridad 0 luxes). Mientras que las hembras del grupo experimental se mantuvieron en un ciclo de luz /luz tenue (12 h luz, 150 luxes:12h luz tenue 5-7 luxes). Estas condiciones lumínicas se mantuvieron durante 5 semanas. En la semana 6 las hembras se expusieron a machos con un peso entre 300-350 gramos, durante una semana con fines

reproductivos. La condición lumínica para cada grupo se mantuvo durante la semana de exposición a los machos y durante todo el periodo gestacional.

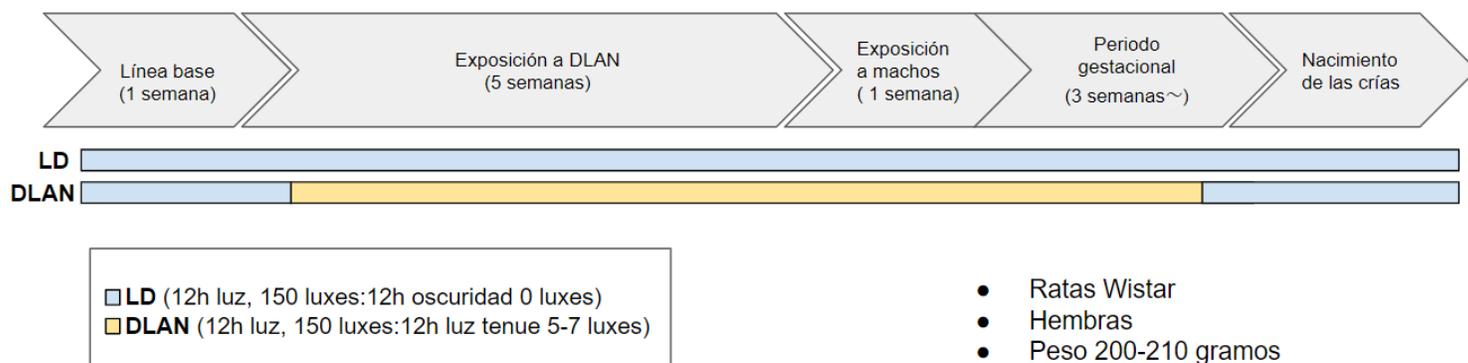


Figura 4. Diseño experimental de las madres expuestas a un ciclo de luz/oscuridad (LD) y las madres expuestas a un ciclo de luz /luz tenue (DLAN).

Crías:

A partir del nacimiento de las crías, todas las madres y sus crías fueron colocadas en un ciclo de luz oscuridad (12 h luz, 150 luxes:12h oscuridad 0 luxes). Las luces se prendían a las 7:00 horas (ZT0) y se apagaban a las 19:00 horas (ZT12). En el día postnatal 1 (PN1), las crías fueron sexadas y las camadas se ajustaron a 5 crías. El destete se realizó en el PN25. En el PN26 se eligieron aleatoriamente 4 crías macho de cada condición (hijos de madres LD o hijos de madres DLAN) que fueron sacrificadas con el objetivo de recolectar tejido nervioso para su procesamiento por inmunofluorescencia (n=4). Otra serie de animales se monitoreó hasta el PN40 para registrar la conducta de juego social (n=15).



Grupo LD: crías machos de madres expuestas a un ciclo de LD antes y durante el periodo gestacional

Grupo DLAN: crías machos de madres expuestas a un ciclo DLAN antes y durante el periodo gestacional

Figura 5. Diseño experimental de las crías de madres expuestas a un ciclo de luz/oscuridad (LD) y las madres expuestas a un ciclo de luz /luz tenue (DLAN).

Mediciones

Conducta de juego

La prueba se realizó en el PN40, edad del desarrollo correspondiente a la adolescencia en la que se ha registrado una alta presencia de conducta de juego y al inicio de la fase de oscuridad ya que es la fase de actividad en roedores. Se realizó bajo luz roja (10 luxes) y sin ruido. Antes de la prueba se aisló a cada una de las ratas durante 24 horas. Se grabó un vídeo de 5 minutos para evaluar posteriormente la conducta de juego social por dos observadores sin conocer la condición experimental (en ciego). Se registraron las siguientes conductas (número de eventos durante los 5 minutos de grabación) (Figura 4):

1. Pouncing: cuando una rata se coloca parcial o totalmente sobre el dorso de otra rata.
2. Pinning: cuando una rata se coloca parcial o totalmente sobre otra rata que está en posición supina.
3. Chasing: cuando una rata persigue a otra rata.
4. Boxing: cuando dos ratas se colocan una enfrente de la otra y comienzan a empujarse con sus patas superiores.

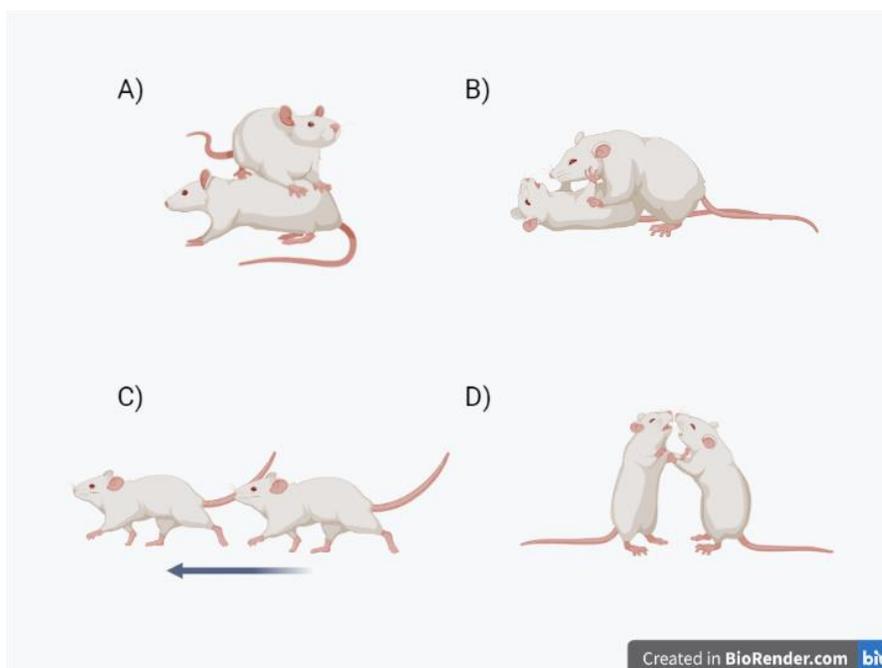


Figura 6. Conductas estandarizadas de juego social en ratas. (A) Pouncing. (B) Pinning. (C) Chasing (D) Boxing. Imagen creada en BioRender.com

Inmunofluorescencia

En el PN26 se realizó la eutanasia de una serie de ratas (n=4 por grupo). Las ratas fueron anestesiadas con una sobredosis de pentobarbital sódico (1-1.5 mL), posteriormente se perfundieron vía intracardiaca con solución salina (0.9%) seguida de 250 ml de paraformaldehído al 4% en 0.1 mM de buffer de fosfato (PB: pH 7.5). Se removieron los cerebros, se fijaron y crioprotegieron en solución de sacarosa al 30%. Posteriormente se obtuvieron cortes coronales de 40 µm de grosor en un crióstato, de las áreas shell y core del núcleo accumbens. La localización de esas estructuras se identificó con el atlas de Paxinos y Watson (1998) de la Figura 15 a la Figura 22. Una serie de los cortes se incubaron durante 48h con el anticuerpo policlonal para IBA1 hecho en conejo (abcam #ab5076) a una disolución 1:2000 en Super mix (PBS: solución de salina buffer fosfato que se compone de una concentración iónica (Cl⁻, Na⁺,K⁺) similar al medio extracelular, 0.25% gelatina y 0.5% tritón) y el anticuerpo policlonal para el receptor de dopamina 1 (D1r) hecho en conejo (GeneTex C-term #GTX100354) a una disolución 1:5000 en super mix (PBS, 0.25% gelatina y 0.5% tritón). Concluida la incubación con los anticuerpos primarios los cortes se lavaron 3 veces en PBS durante 5 min y se realizó la segunda incubación con los anticuerpos secundarios fluorescentes correspondientes, para IBA1 se utilizó Alexa Flour 647 anti-cabra (Jackson 128-607-232), mientras que para D1r se utilizó Alexa Flour 488 anti-conejo (Jackson 711-545-152) ambos diluidos 1:500 en supermix.

Las secciones se montaron en portaobjetos gelatinizados, posteriormente se colocaron en una solución de DAPI (especificación) durante 5 minutos, después se enjuagaron con H₂O destilada y se cubrieron con anti fade mounting medium (Vectashield ZE0809) y un cubreobjetos.

Obtención de imágenes

Para todas las inmunofluorescencias se adquirieron imágenes de los cortes coronales del núcleo accumbens en el microscopio confocal LSM 880 (Carl, Zeiss). Se obtuvieron imágenes por animal, 10 de la región core, 6 de la región shell del NAc a un aumento de 40X. Las imágenes fueron guardadas en formato czi. El análisis de todas las imágenes fue realizado

por 2 experimentadores diferentes sin conocer la condición experimental de la imagen (en ciego).

Análisis de conteo celular de la microglía

Para medir el número de células positivas al marcador IBA1 de microglía, las imágenes obtenidas se dividieron en sus componentes de color con el software de *Fiji* (Schindelin,2012), posteriormente se duplicó el canal de DAPI (canal azul) con el objetivo de tener una referencia, y después se generó un merge entre el canal de IBA1 (canal rojo) y el canal original de DAPI (canal azul). Con la función *Multi-point* de *ImageJ* se contaron las células positivas tanto a IBA1 como a DAPI.

Análisis de densidad integrada de D1r

Para medir la densidad integrada del marcador de receptor de dopamina 1, las imágenes obtenidas se dividieron en sus componentes de color con el software de *Fiji* (Schindelin et al., 2012), posteriormente se midió la densidad integrada de tres regiones de interés (ROI) de 2502.309, los tres ROI fueron elegidos aleatoriamente en cada imagen. La densidad integrada representa la suma de los valores de los píxeles contenidos en el ROI. También se midió el fondo con un ROI de 35.846 para controlarlo y restarlo posteriormente.

Análisis de Sholl

Para medir la morfología de la microglía las imágenes se dividieron en sus componentes de color con el software de *Fiji* (Schindelin, 2012), las microglías se procesaron por separado de las imágenes completas, se generaron tres regiones de interés (ROI) de 2502.309, los tres ROI fueron elegidos aleatoriamente en cada imagen. Para convertir las imágenes en imágenes binarias, se estableció un umbral a través del comando *Threshold* ajustándolo manualmente hasta que únicamente fuera visible el soma y las ramificaciones de la microglía, posteriormente se borró manualmente cualquier ruido y se utilizó el plugging de *Neuroanatomy, Sholl Analysis* (Schindelin, 2012). De acuerdo con Liu (2022), se midió el

número de intersecciones entre las ramificaciones de la microglía y el diámetro de sholl cada dos micras,

Colocalización

Para medir el porcentaje de colocalización entre la microglía y el receptor D1r, se evaluó la colocalización del marcador IBA1 y el marcador D1r, las imágenes obtenidas se dividieron en sus componentes de color con el software de *Fiji*, posteriormente se utilizó la función de colocalización del programa y se colocalizó el canal de D1r y el canal de IBA1.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se clasificaron por grupos (Luz-oscuridad LD y luz tenue por la noche, DLAN) y se representan por la media \pm el error estándar (sem). La conducta de juego se evaluó con la prueba de Mann-Whitney. Para analizar el número de células positivas para IBA1, la densidad integrada de D1r y la colocalización de IBA1 y D1r se utilizaron pruebas T de Student. Mientras que para el análisis de Sholl se utilizó una prueba ANOVA de dos vías.

RESULTADOS

Las crías de madres expuestas a DLAN presentan menos conductas de juego social

Para evaluar la conducta de juego social durante la adolescencia (PN40) se midió una serie de conductas representativas de la interacción social (*ver apartado de metodología*). El grupo DLAN (crías de madres expuestas a DLAN durante el periodo gestacional) presentó un menor número de eventos de las conductas de pinning ($P < 0.0009$; Fig.7a), pousing ($P < 0.0295$; Fig.7b), chasing ($P < 0.0020$; Fig.7c) y boxing ($P < 0.0005$; Fig.7d) en comparación con el grupo LD. También en el juego total, el grupo DLAN presentó un menor número de eventos en comparación con el grupo LD ($P < 0.0009$; Fig.7e).

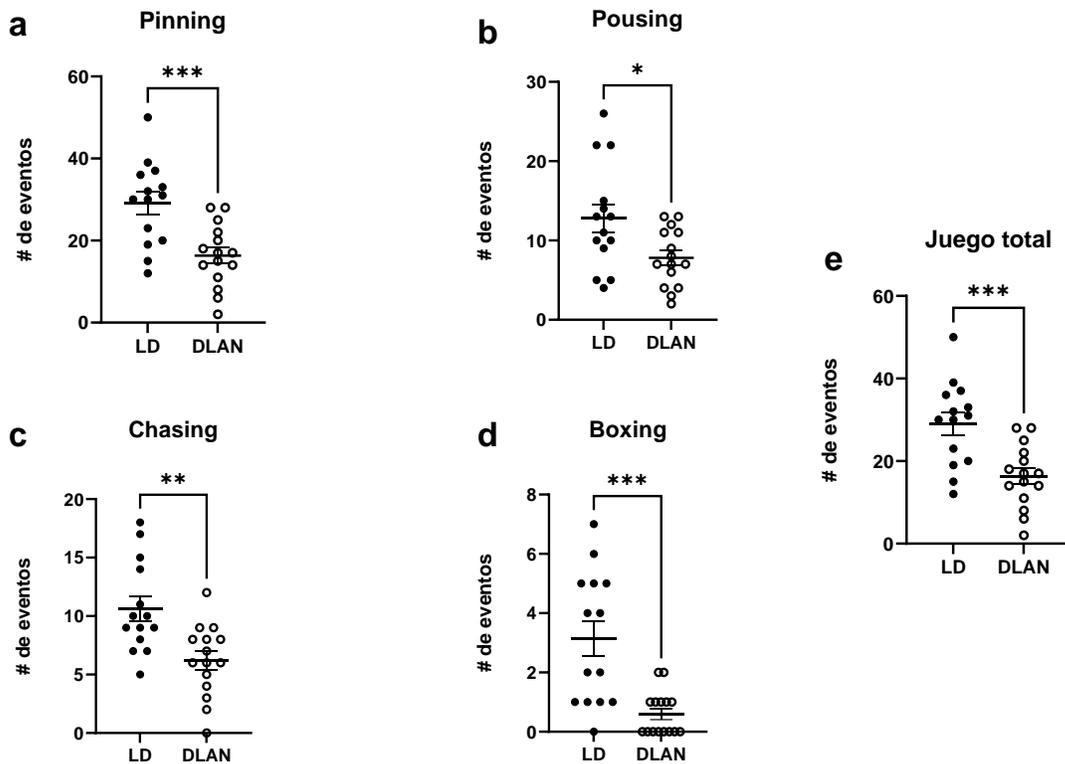


Figura 7. Número de eventos en la conducta de juego. (A) Número de eventos de la conducta de pinning, del grupo de crías de madres expuestas a un ciclo de luz-oscuridad (LD, círculos negros) y del grupo de crías de madres expuestas a luz tenue durante la noche (DLAN, círculos blancos). (B) Número de eventos de la conducta pousing. (C) Número de eventos de la conducta chasing. (D) Número de eventos de la conducta boxing. (E) Número de eventos de la conducta de juego total. Los datos son representados como media \pm SEM; n=14-15/grupo. El análisis U de Mann-Whitney mostró diferencias significativas entre grupos. ***P < 0.0009, * P < 0.0295, ** P < 0.0020, *** P < 0.0005, ***P < 0.0009

Las crías de madres expuestas a DLAN presentan mayor número de microglía en el NAc

El número de células positivas al marcador de microglía IBA1 y para el marcador de núcleos celulares DAPI, se midió en las dos regiones que conforman el NAc, core y shell. En el core del NAc, el grupo DLAN presentó un mayor número de células positivas para IBA1 en comparación con el grupo LD (P < 0.0001; Fig. 8a-c). En el shell del Nac, las ratas DLAN presentaron un mayor número de células positivas para IBA1 en comparación con el grupo LD (P < 0.0001; Fig. 8d). En el total del Nac (shell + core), el análisis de conteo celular de la microglía arrojó que el grupo DLAN presentó un mayor número de células positivas para IBA1 en comparación con el grupo LD (P < 0.0001; Fig 8e)

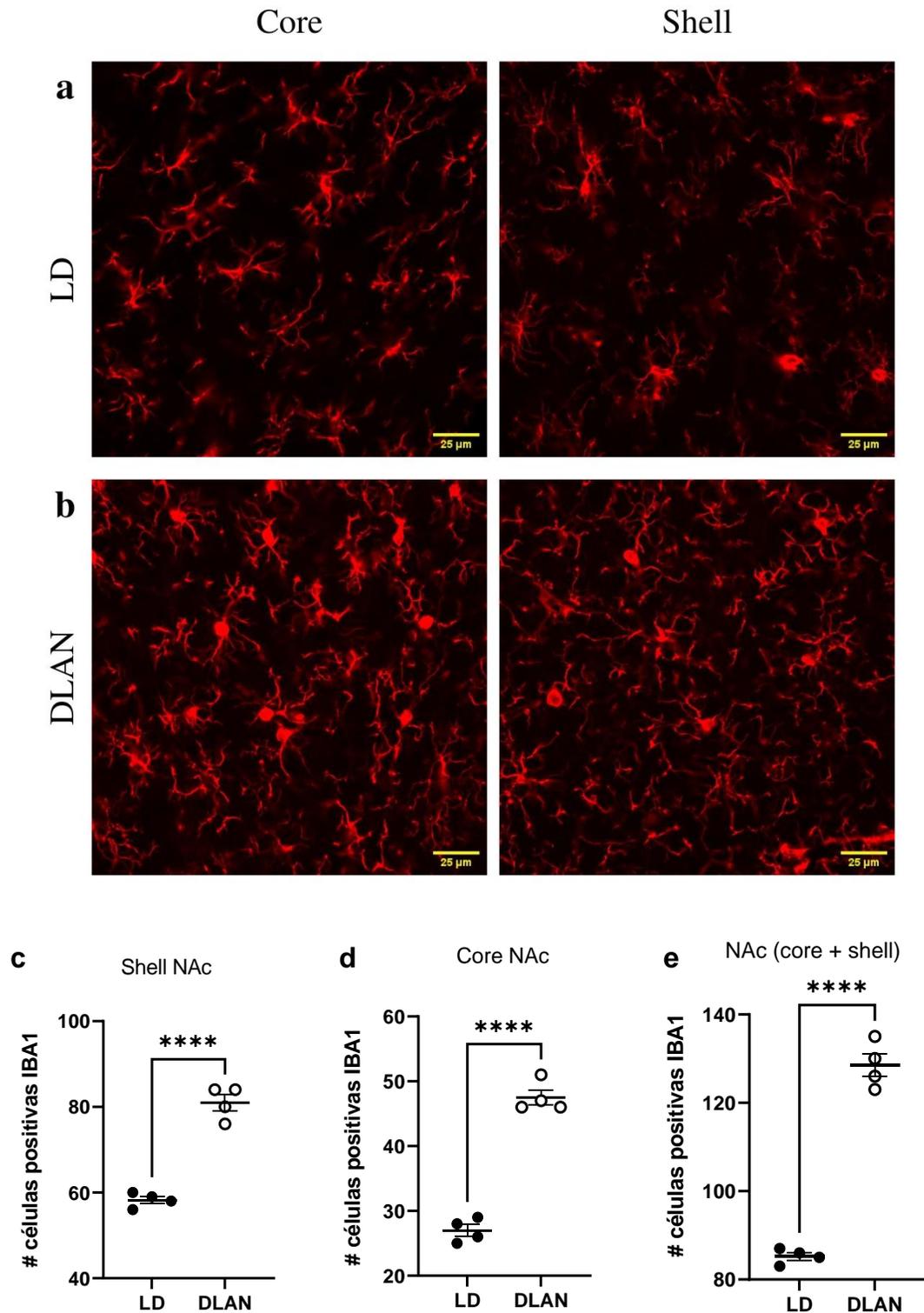


Figura 8. Número de células positivas para el marcador de microglía IBA1 en la región core y la región shell del Núcleo Accumbens (NAc). (a) Imágenes representativas de microscopio confocal (40X) para el marcador IBA1 en el core y shell de las crías de madres expuestas a un ciclo de luz-oscuridad (LD, círculos negros) .(b) Imágenes representativas de microscopio confocal (40X) para el marcador IBA1 en el core y shell de las crías

de madres expuestas a luz tenue durante la noche (DLAN, círculos blancos). (c) Número de células positivas a IBA1 en el core, del grupo LD y del grupo DLAN. (d) Número de células positivas a IBA1 en el shell del grupo LD y DLAN. (e) Número de células positivas a IBA1 en todo el NAc (shell+core) del grupo LD y DLAN. Los datos son representados como media + SEM; n=4. La prueba t de Student indicó diferencias significativas entre grupos **** P <0.0001, ****P <0.0001, ****P <0.0001

Las crías de madres expuestas a DLAN presentan menor densidad del receptor D1 en el NAc

El análisis de densidad integrada de D1r se midió en las dos regiones que conforman el NAc, core y shell. En el core y el shell del NAc, el grupo DLAN presentó un menor promedio de densidad integrada de la marca D1r en comparación con el grupo LD (core: P <0.0106; Fig. 9a-c; shell: P <0.0352; Fig. 9d). En el total del NAc (shell + core), el grupo DLAN presentó un menor promedio de densidad integrada de la marca D1r en comparación con el grupo LD (P <0.0104; Fig. 9e).

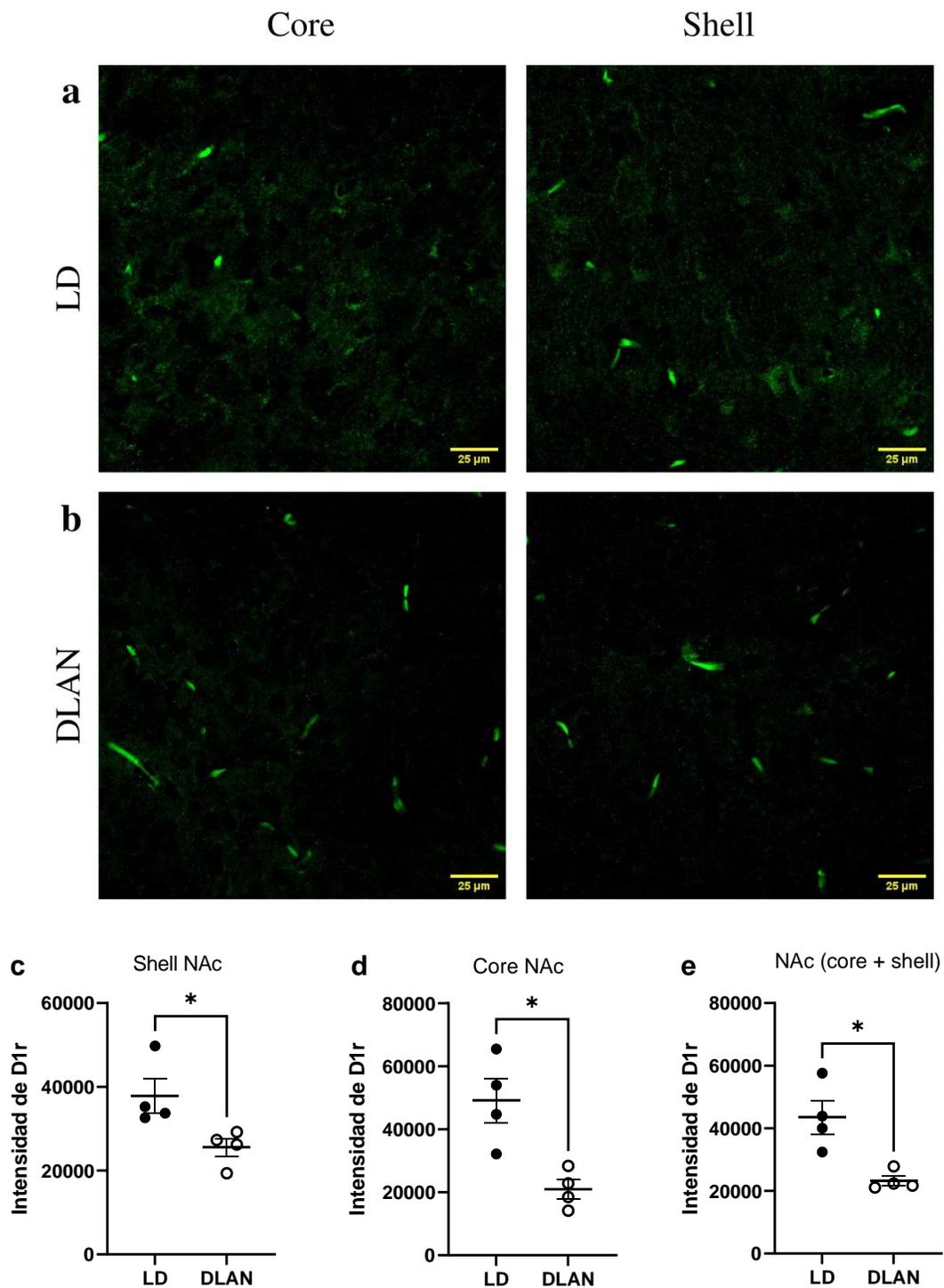


Figura 9. Densidad de receptor de dopamina 1 (D1r) en la región core y la región shell del Núcleo Accumbens (Nac). (a) Imágenes representativas de microscopio confocal (40X) para el marcador D1r en el core y shell de las crías de madres expuestas a un ciclo de luz-oscuridad (LD, círculos negros). (b) Imágenes representativas de microscopio confocal (40X) para el marcador D1r en el core y shell de las crías de madres expuestas a luz tenue durante la noche (DLAN, círculos blancos). (c) Densidad integrada de D1r en el core, del grupo crías de

madres expuestas a LD y DLAN.(d) Densidad integrada de D1r en el shell en crías LD y DLAN. (e) Densidad integrada de D1r en todo el NAc (shell+core) en crías LD y DLAN. Los datos son representados como la media + SEM; n=4. La prueba t de Student mostró diferencias significativas entre grupos * P <0.0106, * P <0.0352, *P <0.0104

La microglía de las crías de madres expuestas a DLAN presentan una morfología más ramificada

Para evaluar la morfología de la microglía se realizó el análisis de sholl (*ver apartado de metodología*), en las dos regiones que conforman el NAc, core y shell. En el core del NAc, no hubo diferencias significativas entre los grupos LD y DLAN en el número de intersecciones (Fig 10a). Mientras que en el shell del NAc el grupo LD presentó un menor número de intersecciones (P<0.0415; Fig. 10b) en comparación con el grupo DLAN. Los resultados del ANOVA de dos vías mostraron valores de $F(20, 119) = 1.705$ y una $P = 0.0415$. En el total del NAc, ambas estructuras (shell + core), el grupo LD mostró un menor número de intersecciones (P<0.0014; Fig. 10c) en comparación con el grupo DLAN. Los resultados del ANOVA de dos vías de medidas repetidas mostraron valores $F(20, 125) = 2.450$ y $P = 0.0014$.

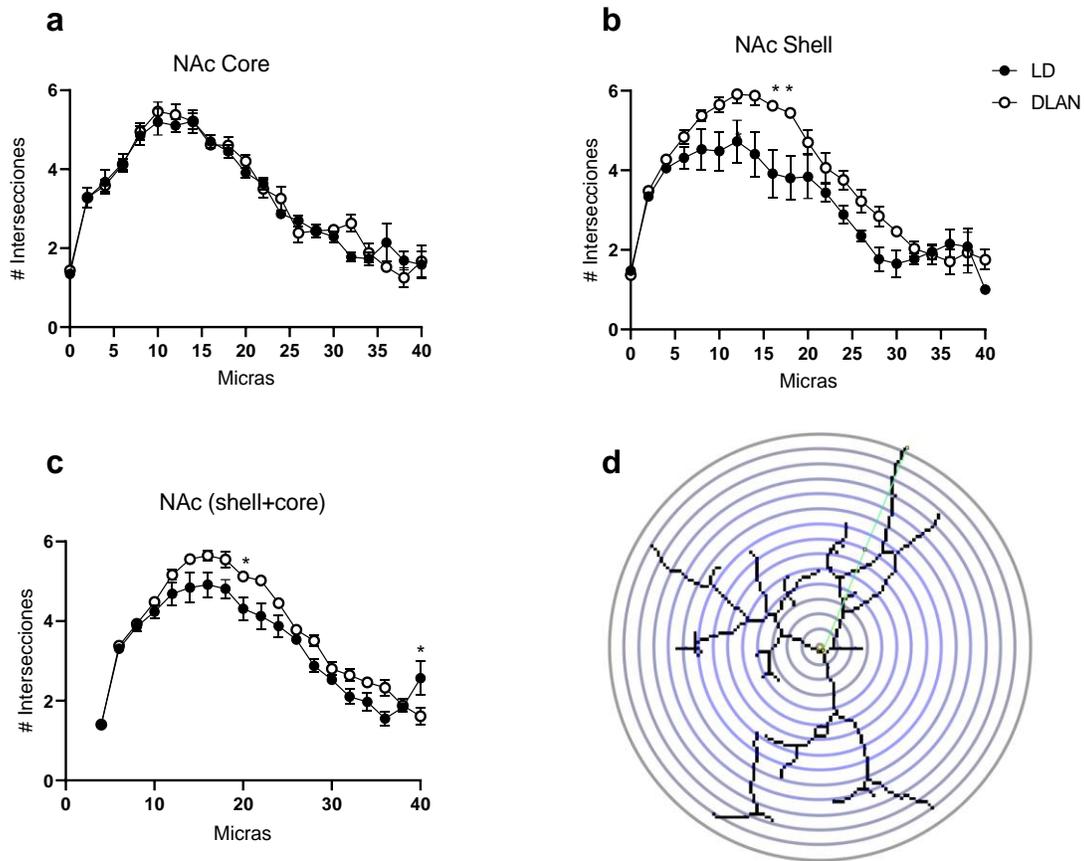


Figura 10. Análisis de Sholl de la microglía. (a) Número de intersecciones del grupo crías de madres expuestas a un ciclo de luz-oscuridad (LD, círculos negros) y del grupo de crías de madres expuestas a luz tenue durante la noche (DLAN, círculos blancos) en el core del NAc. (b) Número de intersecciones en el shell del Nac en crías LD y DLAN. (c) Número de intersecciones en todo el NAc (shell+core) en crías LD y DLAN. (d) Ilustración del análisis de Sholl. Los datos son representados como media + SEM; n=4. La prueba pos hoc χ^2 indicó diferencias significativas entre los grupos. * $P < 0.0415$, * $P < 0.0014$

La exposición a DLAN no modifica la colocación de IBA1 y D1r

Para evaluar la interacción de la microglía con los receptores D1r se realizó una colocación en las dos regiones que conforman el NAc, el core (Fig. 11c) y shell (Fig. 11d). A pesar de que se puede observar una tendencia, no hubo diferencias significativas entre los grupos en ninguna de las regiones que conforman el Nac (Fig. 11e).

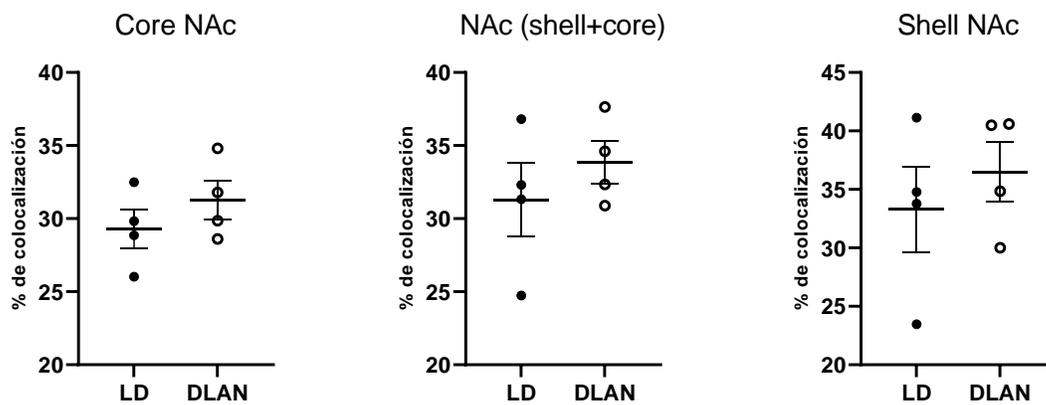
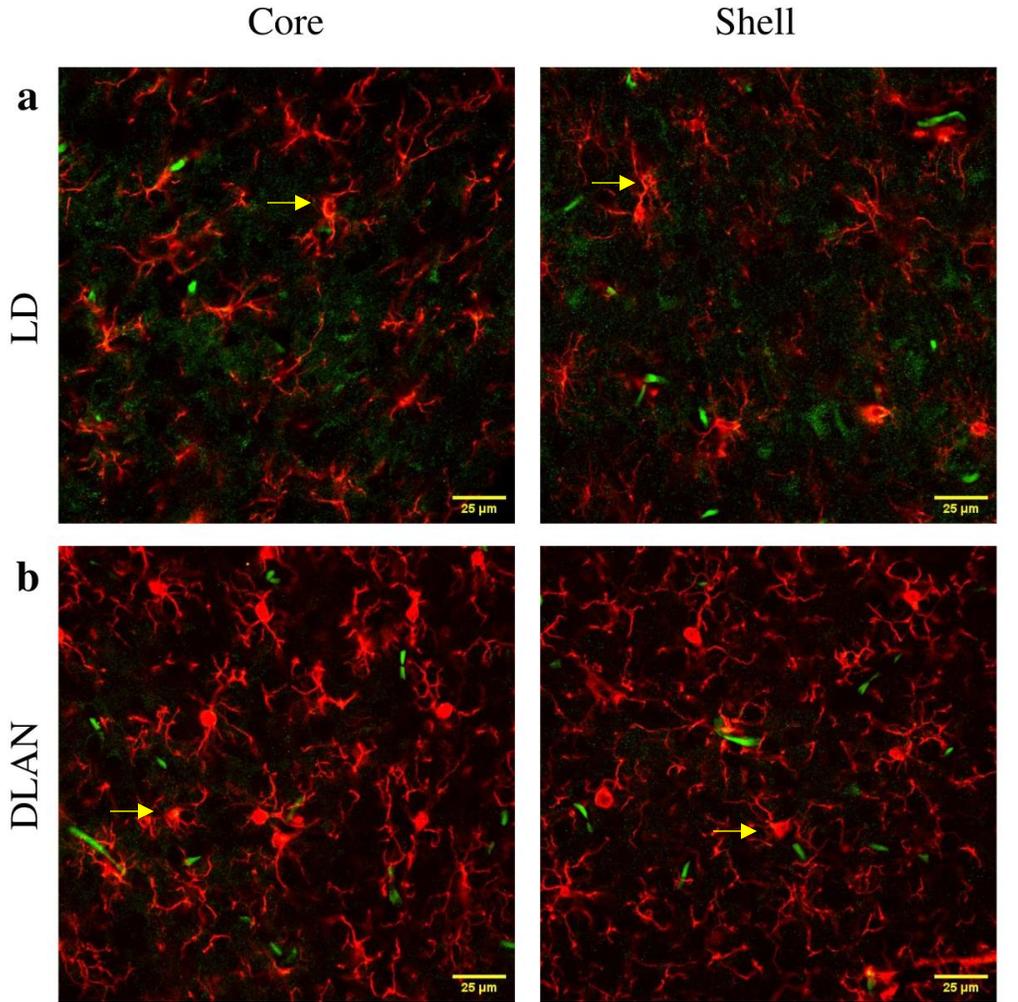


Figura 11. Análisis de la colocalización del marcador de microglía IBA1 y el marcador del receptor a dopamina 1 (D1r) en la región core y shell del Núcleo accumbens (Nac). (a) Imágenes representativas de microscopio confocal (40X) con el “merge” de los marcadores IBA1 y D1r en el core y Shell de las crías de madres expuestas a un ciclo de luz-oscuridad (LD, círculos negros). (b) Imágenes representativas de microscopio

confocal (40X) merge de IBA1 Y D1r en el core y shell de crías de madres expuestas a luz tenue durante la noche (DLAN, círculos blancos). (c) Porcentaje de colocalización IBA1 y D1r del grupo LLD y DLAN en el core del NAc. (d) Porcentaje de colocalización de IBA1 y D1r en el shell del NAc en crías LD y DLAN. (e) Porcentaje de colocalización de IBA1 y D1r en todo el NAc (shell+core) en crías LD y DLAN. Los datos son representados como media + SEM; n=4. La prueba t de Student no indicó diferencias significativas entre grupos.

DISCUSIÓN

La contaminación lumínica es un fenómeno frecuente en la actualidad, en los últimos años la evidencia respecto a cómo la exposición a luz tenue afecta la salud ha ido en aumento (Fonken et al., 2013; Borniger et al., 2014; Stenvers et al., 2016; Rumanova et al., 2020; Gutiérrez-Pérez, 2021). Los resultados que se obtuvieron en esta investigación demuestran que las crías de madres expuestas a DLAN durante 5 semanas previas a la gestación y durante la gestación presentaron menor conducta de juego, una menor expresión de D1r tanto en la región shell como en el core del NAc y un mayor número de células positivas a IBA1 en ambas regiones del NAc.

Diversos estudios han demostrado que la exposición a ambientes adversos durante la etapa prenatal, influyen de forma importante en el desarrollo de enfermedades en etapas posteriores como la adolescencia. Durante la gestación la madre aporta al feto, a través de la placenta, todo lo que éste necesita para sobrevivir, tales como nutrientes y señales hormonales, debido a esto, la gestación es un periodo crítico en el desarrollo de los mamíferos, en el que las condiciones ambientales a las que se expone la madre pueden tener repercusión en sus crías (Serón-Ferré et al., 2012; Fonken et al., 2013; Cissé et al., 2020; Gutiérrez-Pérez, 2021). Además, a través de la temperatura, señales hormonales y la alimentación, la madre determina de forma directa los ritmos circadianos del feto (Serón-Ferré et al., 2012), por esta razón, se han estudiado los efectos de la desincronización circadiana durante la gestación y estudios en nuestro laboratorio han demostrado que la disrupción circadiana de la madre, provocada por la exposición a DLAN impacta los ritmos circadianos de su descendencia (Gutiérrez-Pérez, 2021). En esta investigación, los resultados obtenidos mostraron que las crías macho de madres expuestas a DLAN presentaron una menor conducta de juego, lo que demuestra que la exposición a DLAN antes y durante la gestación tiene un efecto negativo en esta conducta social temprana. Lo anterior concuerda con otras investigaciones en las que

se ha demostrado que las condiciones adversas durante la gestación, tales como estrés y exposición a drogas afectan de forma negativa en la conducta tipo social (Weinsock et al., 2001; Neubert da Silva et al., 2019).

Debido a que la conducta de juego es altamente reforzante y su presencia está relacionada con la actividad dopaminérgica del NAc (Achterberg et al., 2015), hipotetizamos que la disminución de la conducta se debió a cambios en los receptores D1 de la vía dopaminérgica del NAc, por esta razón se evaluó la expresión de D1r en el NAc, el análisis de densidad integrada del marcador D1r mostró una disminución significativa del receptor D1 tanto en el shell como en el core del Nac. Lo anterior sugiere que la disminución de la conducta de juego de las crías DLAN, podría deberse a estos cambios en los receptores de la vía dopaminérgica del NAc ya que ha sido previamente comprobado el papel fundamental del receptor D1 en la conducta de juego social (Kopec et al., 2018). En diversos estudios donde se manipula la actividad del receptor mediante herramientas farmacológicas, se ha observado que su inhibición disminuye la conducta de juego social en roedores (Manduca et al., 2016).

Debido a que la poda neuronal y el refinamiento de la vía dopaminérgica que regula el juego ocurre durante la preadolescencia (PN30~) a través de la fagocitosis mediada por la microglía (Kopec et al., 2018), también evaluamos los cambios en la microglía en el NAc de crías LD y DLAN.

Las ratas DLAN mostraron un mayor número de microglías en las regiones que componen el Nac, esto es consistente con estudios anteriores donde se ha observado que la exposición a DLAN durante 4 semanas se asocia con un aumento del número de microglía en el hipocampo (Liu et al., 2022). Sin embargo, en esta tesis se demuestra que tan sólo la exposición materna es suficiente para inducir un aumento en la cantidad de microglías en el NAc de las crías, quienes desde el nacimiento estuvieron expuestas a condiciones LD. Dado que la actividad de la microglía es importante para el refinamiento del circuito dopaminérgico del juego, se evaluó la morfología de la microglía para asociarlo a un estado de activación. Las crías de las madres expuestas a DLAN presentaron un mayor número de ramificaciones que las crías LD, lo cual sugiere que podrían estar en un estado de reposo en el PN 26 en el que se realizó el análisis. Sin embargo, este análisis no es suficiente para descartar la actividad fagocítica de la microglía. Se ha demostrado que la morfología de la microglía varía dependiendo de la etapa del desarrollo. Se sabe que, en ratas, la microglía presenta una

morfología ameboide asociada a la poda neuronal y cuando el circuito es refinado la microglía regresa a una morfología más ramificada (Nayak et al., 2014), esto sugiere la posibilidad de que la morfología de la microglía pudiera ser ameboide en PN anteriores. Para evaluar esta hipótesis se necesita realizar análisis morfológico en diferentes PN en crías de ratas expuestas a LD y DLAN.

Por último, para evaluar si existía una interacción o contacto entre la microglía y los receptores D1, lo cual pudiera asociarse a su fagocitosis, se realizó una colocalización de los marcadores IBA1 y el marcador D1r. Aunque se observa una tendencia, los resultados no mostraron diferencias significativas. Se sabe que en ratas, durante el desarrollo la microglía presenta una morfología ameboide asociada a la poda neuronal y cuando el circuito es refinado la microglía regresa a una morfología más ramificada (Nayak et al., 2014), dado que la densidad de D1r es menor y hay un mayor número de microglía en el NAc de las crías DLAN, se podría hipotetizar que la fagocitosis o el refinamiento llevado a cabo por la microglía sucede en PN más tempranos al evaluado en esta investigación, por esta razón, una evaluación de diferentes PN junto con la exploración de un marcador específico de fagocitosis podrían generar resultados más completos y valiosos para esclarecer los efectos de la exposición a DLAN tanto en la microglía como en los receptores D1r en el Nac, lo cual regula la conducta de juego.

La exposición de la madre a DLAN impacta de forma directa en sus ritmos circadianos modificando de forma importante diferentes parámetros fisiológicos que sirven como señales para los fetos durante el embarazo, algunas de estas señales pueden ser la temperatura, el cortisol y la melatonina. Las señales de la madre son de suma importancia para el desarrollo del feto, por lo tanto, los cambios en estas señalizaciones durante la gestación producen un efecto negativo en la salud y desarrollo de la cría. Debido a que se sabe que la exposición a DLAN produce un cambio en la actividad de la microglía (Liu et al., 2022), se podría hipotetizar que los cambios en la actividad de la microglía en la madre o su estado inflamatorio generan un cambio en la respuesta de la microglía del feto. Sin embargo, aún se necesitan evaluar diferentes variables de la interacción entre la madre y el feto para poder demostrar dicha hipótesis. También se considera de suma importancia evaluar si la pérdida de señales circadianas durante la gestación, tales como la melatonina, puede afectar la maduración de la vía dopaminérgica del NAc. Lo anterior dada que la melatonina se ha

relacionado con el aumento de la expresión de diferentes factores neurotróficos como GDNF y BDNF (Kim et al., 2019) y en estudios de exposiciones a ambientes adversos durante la gestación se observan alteraciones en el hipocampo de la descendencia (Lucassen et al., 2015).

32 34

CONCLUSIONES

La exposición a DLAN previo y durante la gestación disminuyó la conducta de juego, aumentó el número de microglías en el NAc y disminuyó el número de receptores de D1r en el NAc de las crías.

Los resultados obtenidos en esta investigación prueban la importancia de mantener un ciclo de luz-oscuridad antes y durante el periodo gestacional para evitar las repercusiones negativas en la descendencia como alteraciones en la conducta social en etapas tempranas.

La investigación de modelos de exposición a la luz tenue durante la noche en madres gestantes es importante para conocer sus efectos negativos transgeneracionales y genera estrategias para su prevención o su manejo.

REFERENCIAS

- Achterberg, E. J. M., van Kerkhof, L. W. M., Servadio, M., van Swieten, M. M. H., Houwing, D. J., Aalderink, M., Driel, N. v., Trezza, V., & Vanderschuren, L. J. M. J. (2015). Contrasting Roles of Dopamine and Noradrenaline in the Motivational Properties of Social Play Behavior in Rats. *Neuropsychopharmacology* 2016 41:3, 41(3), 858–868. <https://doi.org/10.1038/npp.2015.212>
- Aubrecht, T. G., Jenkins, R., & Nelson, R. J. (2015). Dim light at night increases body mass of female mice. <Http://Dx.Doi.Org/10.3109/07420528.2014.986682>, 32(4), 557–560. <https://doi.org/10.3109/07420528.2014.986682>
- Bedrosian, T. A., Fonken, L. K., & Nelson, R. J. (2016). Endocrine Effects of Circadian Disruption. In *Annual Review of Physiology* (Vol. 78, pp. 109–131). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021115-105102>
- Bedrosian, T. A., Fonken, L. K., Walton, J. C., Haim, A., & Nelson, R. J. (2011). Dim light at night provokes depression-like behaviors and reduces CA1 dendritic spine density in female hamsters. *Psychoneuroendocrinology*, 36(7), 1062–1069. <https://doi.org/10.1016/J.PSYNEUEN.2011.01.004>
- Bedrosian, T. A., Weil, Z. M., & Nelson, R. J. (2013). Chronic dim light at night provokes reversible depression-like phenotype: Possible role for TNF. *Molecular Psychiatry*, 18(8), 930–936. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.96>
- Borniger, J. C., Maurya, S. K., Periasamy, M., & Nelson, R. J. (2014a). Acute dim light at night increases body mass, alters metabolism, and shifts core body temperature circadian rhythms. <Http://Dx.Doi.Org/10.3109/07420528.2014.926911>, 31(8), 917–925. <https://doi.org/10.3109/07420528.2014.926911>
- Borniger, J. C., Maurya, S. K., Periasamy, M., & Nelson, R. J. (2014b). Acute dim light at night increases body mass, alters metabolism, and shifts core body temperature circadian rhythms. <Http://Dx.Doi.Org/10.3109/07420528.2014.926911>, 31(8), 917–925. <https://doi.org/10.3109/07420528.2014.926911>
- Borniger, J. C., McHenry, Z. D., Abi Salloum, B. A., & Nelson, R. J. (2014). Exposure to dim light at night during early development increases adult anxiety-like responses. *Physiology & Behavior*, 133, 99–106. <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2014.05.012>
- Buijs, F. N., León-Mercado, L., Guzmán-Ruiz, M., Guerrero-Vargas, N. N., Romo-Nava, F., & Buijs, R. M. (2016a). The circadian system: A regulatory feedback network of periphery and brain. *Physiology*, 31(3), 170–181. <https://doi.org/10.1152/PHYSIOL.00037.2015/ASSET/IMAGES/LARGE/PHY0031603240002.JPEG>

- Buijs, F. N., León-Mercado, L., Guzmán-Ruiz, M., Guerrero-Vargas, N. N., Romo-Nava, F., & Buijs, R. M. (2016b). The circadian system: A regulatory feedback network of periphery and brain. *Physiology*, *31*(3), 170–181.
<https://doi.org/10.1152/PHYSIOL.00037.2015/ASSET/IMAGES/LARGE/PHY0031603240002.JPEG>
- Buijs, R. M., & Kalsbeek, A. (2001). Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nature Reviews Neuroscience* *2001* 2:7, *2*(7), 521–526.
<https://doi.org/10.1038/35081582>
- Castanon-Cervantes, O., Wu, M., Ehlen, J. C., Paul, K., Gamble, K. L., Johnson, R. L., Besing, R. C., Menaker, M., Gewirtz, A. T., & Davidson, A. J. (2010a). Dysregulation of Inflammatory Responses by Chronic Circadian Disruption. *The Journal of Immunology*, *185*(10), 5796–5805. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1001026>
- Castanon-Cervantes, O., Wu, M., Ehlen, J. C., Paul, K., Gamble, K. L., Johnson, R. L., Besing, R. C., Menaker, M., Gewirtz, A. T., & Davidson, A. J. (2010b). Dysregulation of Inflammatory Responses by Chronic Circadian Disruption. *The Journal of Immunology*, *185*(10), 5796–5805. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1001026>
- Charles Lawrence, R., Cale Bonner, H., Newsom, R. J., & Kelly, S. J. (2008). Effects of alcohol exposure during development on play behavior and c-Fos expression in response to play behavior. *Behavioural Brain Research*, *188*(1), 209–218.
<https://doi.org/10.1016/J.BBR.2007.10.028>
- Chen, Y., Li, L., Zhang, J., Cui, H., Wang, J., Wang, C., Shi, M., & Fan, H. (2021). Dexmedetomidine Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Hippocampal Neuronal Apoptosis via Inhibiting the p38 MAPK/c-Myc/CLIC4 Signaling Pathway in Rats. *Molecular Neurobiology* *2021* 58:11, *58*(11), 5533–5547.
<https://doi.org/10.1007/S12035-021-02512-9>
- Cissé, Y. M., Peng, J., & Nelson, R. J. (2016). Dim light at night prior to adolescence increases adult anxiety-like behaviors. <https://doi.org/10.1080/07420528.2016.1221418>, *33*(10), 1473–1480.
<https://doi.org/10.1080/07420528.2016.1221418>
- Cissé, Y. M., Russart, K. L. G., & Nelson, R. J. (2017a). Parental Exposure to Dim Light at Night Prior to Mating Alters Offspring Adaptive Immunity. *Scientific Reports* *2017* 7:1, *7*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep45497>
- Cissé, Y. M., Russart, K. L. G., & Nelson, R. J. (2017b). Depressive-like behavior is elevated among offspring of parents exposed to dim light at night prior to mating. *Psychoneuroendocrinology*, *83*, 182–186.
<https://doi.org/10.1016/J.PSYNEUEN.2017.06.004>

- Cissé, Y. M., Russart, K., & Nelson, R. J. (2020). Exposure to dim light at night prior to conception attenuates offspring innate immune responses. *PLOS ONE*, *15*(4), e0231140. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0231140>
- Deurveilher, S., Golovin, T., Hall, S., & Semba, K. (2021). Microglia dynamics in sleep/wake states and in response to sleep loss. *Neurochemistry International*, *143*, 104944. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2020.104944>
- Eastman, C., & Rechtschaffen, A. (1983). Circadian temperature and wake rhythms of rats exposed to prolonged continuous illumination. *Physiology & Behavior*, *31*(4), 417–427. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(83\)90061-6](https://doi.org/10.1016/0031-9384(83)90061-6)
- Fonken, L. K., Aubrecht, T. G., Meléndez-Fernández, O. H., Weil, Z. M., & Nelson, R. J. (2013). Dim Light at Night Disrupts Molecular Circadian Rhythms and Increases Body Weight. <Http://Dx.Doi.Org/10.1177/0748730413493862>, *28*(4), 262–271. <https://doi.org/10.1177/0748730413493862>
- Fonken, L. K., Bedrosian, T. A., Zhang, N., Weil, Z. M., DeVries, A. C., & Nelson, R. J. (2019a). Dim light at night impairs recovery from global cerebral ischemia. *Experimental Neurology*, *317*, 100–109. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2019.02.008>
- Fonken, L. K., Bedrosian, T. A., Zhang, N., Weil, Z. M., DeVries, A. C., & Nelson, R. J. (2019b). Dim light at night impairs recovery from global cerebral ischemia. *Experimental Neurology*, *317*, 100–109. <https://doi.org/10.1016/J.EXPNEUROL.2019.02.008>
- Fonken, L. K., Frank, M. G., Kitt, M. M., Barrientos, R. M., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2015). Microglia inflammatory responses are controlled by an intrinsic circadian clock. *Brain, Behavior, and Immunity*, *45*, 171–179. <https://doi.org/10.1016/J.BBI.2014.11.009>
- Fonken, L. K., Kitt, M. M., Gaudet, A. D., Barrientos, R. M., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2016). Diminished circadian rhythms in hippocampal microglia may contribute to age-related neuroinflammatory sensitization. *Neurobiology of Aging*, *47*, 102–112. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2016.07.019>
- Fonken, L. K., & Nelson, R. J. (2013). Dim light at night increases depressive-like responses in male C3H/HeNHsd mice. *Behavioural Brain Research*, *243*(1), 74–78. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2012.12.046>
- Gordon, N. S., Kollack-Walker, S., Akil, H., & Panksepp, J. (2002). Expression of c-fos gene activation during rough and tumble play in juvenile rats. *Brain Research Bulletin*, *57*(5), 651–659. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(01\)00762-6](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(01)00762-6)
- Graeber, M. B., & Streit, W. J. (2009). Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathologica* *2009 119:1*, *119*(1), 89–105. <https://doi.org/10.1007/S00401-009-0622-0>

- Guerrero-Vargas, N. N., Guzmán-Ruiz, M., Fuentes, R., García, J., Salgado-Delgado, R., Basualdo, M. D. C., Escobar, C., Markus, R. P., & Buijs, R. M. (2015a). Shift work in rats results in increased inflammatory response after lipopolysaccharide administration. *Journal of Biological Rhythms*, *30*(4), 318–330.
https://doi.org/10.1177/0748730415586482/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_0748730415586482-FIG2.JPEG
- Guerrero-Vargas, N. N., Guzmán-Ruiz, M., Fuentes, R., García, J., Salgado-Delgado, R., Basualdo, M. D. C., Escobar, C., Markus, R. P., & Buijs, R. M. (2015b). Shift work in rats results in increased inflammatory response after lipopolysaccharide administration. *Journal of Biological Rhythms*, *30*(4), 318–330.
https://doi.org/10.1177/0748730415586482/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_0748730415586482-FIG2.JPEG
- Gutiérrez-Pérez, M. (2021). *La exposición materna a la luz tenue por la noche provoca alteraciones conductuales en las crías de ratas de la cepa Wistar*. Obtenido de TESIUNAM:
https://tesiunam.dgb.unam.mx/F/GM9582RUB2HGXJY8QYF1V997B9L1D2E78QUL26GHB9TV7T2AQD-46494?func=full-set-set&set_number=186142&set_entry=000001&format=999
- Hastings, M. H., & Goedert, M. (2013). Circadian clocks and neurodegenerative diseases: time to aggregate? *Current Opinion in Neurobiology*, *23*(5), 880–887.
<https://doi.org/10.1016/J.CONB.2013.05.004>
- Hayashi, Y., Koyanagi, S., Kusunose, N., Okada, R., Wu, Z., Tozaki-Saitoh, H., Ukai, K., Kohsaka, S., Inoue, K., Ohdo, S., & Nakanishi, H. (2013). The intrinsic microglial molecular clock controls synaptic strength via the circadian expression of cathepsin S. *Scientific Reports 2013 3:1*, *3*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep02744>
- Hol, T., van den Berg, C. L., van Ree, J. M., & Spruijt, B. M. (1999). Isolation during the play period in infancy decreases adult social interactions in rats. *Behavioural Brain Research*, *100*(1–2), 91–97. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(98\)00116-8](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(98)00116-8)
- Jan Stenvers, D., van Dorp, R., Foppen, E., Mendoza, J., Opperhuizen, A. L., Fliers, E., Bisschop, P. H., Meijer, J. H., Kalsbeek, A., & Deboer, T. (2016). Dim light at night disturbs the daily sleep-wake cycle in the rat. *Scientific Reports 2016 6:1*, *6*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep35662>
- Karatsoreos, I. N., Bhagat, S., Bloss, E. B., Morrison, J. H., & McEwen, B. S. (2011). Disruption of circadian clocks has ramifications for metabolism, brain, and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(4), 1657–1662.
https://doi.org/10.1073/PNAS.1018375108/SUPPL_FILE/PNAS.201018375SI.PDF
- Kim, W., Hahn, K. R., Jung, H. Y., Kwon, H. J., Nam, S. M., Kim, J. W., Park, J. H., Yoo, D. Y., Kim, D. W., Won, M. H., Yoon, Y. S., & Hwang, I. K. (2019). Melatonin

ameliorates cuprizone-induced reduction of hippocampal neurogenesis, brain-derived neurotrophic factor, and phosphorylation of cyclic AMP response element-binding protein in the mouse dentate gyrus. *Brain and Behavior*, 9(9).
<https://doi.org/10.1002/BRB3.1388>

- Kopec, A. M., Smith, C. J., Ayre, N. R., Sweat, S. C., & Bilbo, S. D. (2018). Microglial dopamine receptor elimination defines sex-specific nucleus accumbens development and social behavior in adolescent rats. *Nature Communications*.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-06118-z>
- Liu, Q., Wang, Z., Cao, J., Dong, Y., & Chen, Y. (2022). Dim Blue Light at Night Induces Spatial Memory Impairment in Mice by Hippocampal Neuroinflammation and Oxidative Stress. *Antioxidants* 2022, Vol. 11, Page 1218, 11(7), 1218.
<https://doi.org/10.3390/ANTIOX11071218>
- Lucassen, P. J., Oomen, C. A., Naninck, E. F. G., Fitzsimons, C. P., van Dam, A. M., Czeh, B., & Korosi, A. (2015). Regulation of Adult Neurogenesis and Plasticity by (Early) Stress, Glucocorticoids, and Inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(9). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A021303>
- Manduca, A., Servadio, M., Damsteegt, R., Campolongo, P., Vanderschuren, L. J. M. J., & Trezza, V. (2016). Dopaminergic neurotransmission in the nucleus accumbens modulates social play behavior in rats. *Neuropsychopharmacology*, 41(9).
<https://doi.org/10.1038/npp.2016.22>
- Manuel Ángeles-Castellanos Katia Rodríguez Roberto Salgado Carolina Escobar. (2007). *Cronobiología médica: Fisiología y fisiopatología de los ritmos biológicos*. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/62943106/2007_Angeles_Castellanos_cronobiologia_medica_Rev_Fac_med-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1664863710&Signature=O9yAPs-p1nc00Y00OmQYHAULDvPOLEI9zhW46lAcrj4i27SdLXhhZpldshTZITcO0tzqLVB17DOyA2geNmc9oa9tzMcif0OP3~e7G5oExe21eQjrOsRUT1mFUes5H-FXn7fY4S6jCY6BxMXFBjY9GIrgMXOGMVc6YJ9FynAW5vDgXvFs0qJTfW8QcG2Rpz5YE2OqcRF2n~sS6Sx2GYBem0yDC~Yg2sbVj0iUA9Osd84~qefg7G8PT9fFa6uL1-hQrpzvIbDdxE9jxIARV~bG2RbmS4OZJImXmnOFb1YVuun8P~Wwu1mS3hI1WAsWWPLyO3lDeMu8dGhdUzRKzmQQA__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA
- Martinez-Tapia, R. J., Estrada-Rojas, F., Lopez-Aceves, T. G., Rodríguez-Mata, V., Perez-Torres, A., Barajas-Martinez, A., Garcia-Velasco, S., Ugalde-Muñiz, P., & Navarro, L. (2020). Diurnal Variation Induces Neurobehavioral and Neuropathological Differences in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *Frontiers in Neuroscience*, 14, 986. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2020.564992/BIBTEX>

- Molcan, L., Sutovska, H., Okuliarova, M., Senko, T., Krskova, L., & Zeman, M. (2019). Dim light at night attenuates circadian rhythms in the cardiovascular system and suppresses melatonin in rats. *Life Sciences*, *231*, 116568. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2019.116568>
- Musiek, E. S., & Holtzman, D. M. (2016a). Mechanisms linking circadian clocks, sleep, and neurodegeneration. *Science*, *354*(6315), 1004–1008. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAH4968/ASSET/9E754662-0E03-4415-BAA4-227672454639/ASSETS/GRAPHIC/354_1004_F3.JPEG
- Musiek, E. S., & Holtzman, D. M. (2016b). Mechanisms linking circadian clocks, sleep, and neurodegeneration. *Science*, *354*(6315), 1004–1008. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAH4968>
- Nakanishi, H. (2003). Microglial functions and proteases. *Molecular Neurobiology* *2003* *27*:2, *27*(2), 163–176. <https://doi.org/10.1385/MN:27:2:163>
- Nakanishi, H., Ni, J., Nonaka, S., & Hayashi, Y. (2021). Microglial circadian clock regulation of microglial structural complexity, dendritic spine density and inflammatory response. *Neurochemistry International*, *142*, 104905. <https://doi.org/10.1016/J.NEUINT.2020.104905>
- Navara, K. J., & Nelson, R. J. (2007). The dark side of light at night: Physiological, epidemiological, and ecological consequences. In *Journal of Pineal Research* (Vol. 43, Issue 3, pp. 215–224). <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00473.x>
- Nayak, D., Roth, T. L., & McGavern, D. B. (2014). Microglia development and function. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 32, pp. 367–402). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120240>
- Neubert da Silva, G., Zauer Curi, T., Lima Tolouei, S. E., Tapias Passoni, M., Sari Hey, G. B., Marino Romano, R., Martino-Andrade, A. J., & Dalsenter, P. R. (2019). Effects of diisopentyl phthalate exposure during gestation and lactation on hormone-dependent behaviours and hormone receptor expression in rats. *Journal of Neuroendocrinology*, *31*(12). <https://doi.org/10.1111/jne.12816>
- Panda, S., Hogenesch, J. B., & Kay, S. A. (2002). Circadian rhythms from flies to human. *Nature* *2002* *417*:6886, *417*(6886), 329–335. <https://doi.org/10.1038/417329a>
- Panksepp, J. (n.d.). *The Ontogeny of Play in Rats*.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1986). *The Rat Brain: In Stereotaxic Coordinates* (2.). Academic Pr.
- Pellis, S. M., Pellis, V. C., & Bell, H. C. (2010). *the Function of Play in the Development of the social Brain* •.

- Pellis, S. M., Pellis, V. C., Pelletier, A., & Leca, J. B. (2019). Is play a behavior system, and, if so, what kind? In *Behavioural Processes*.
<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2018.12.011>
- Qian, J., & Scheer, F. A. J. L. (2016). Circadian System and Glucose Metabolism: Implications for Physiology and Disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 27(5), 282–293. <https://doi.org/10.1016/J.TEM.2016.03.005>
- Reppert, S. M., Weaver, D. R., & Rivkees, S. A. (1988). Maternal communication of circadian phase to the developing mammal. *Psychoneuroendocrinology*, 13(1–2), 63–78. [https://doi.org/10.1016/0306-4530\(88\)90007-8](https://doi.org/10.1016/0306-4530(88)90007-8)
- Rodríguez-Gómez, J. A., Kavanagh, E., Engskog-Vlachos, P., Engskog, M. K. R., Herrera, A. J., Espinosa-Oliva, A. M., Joseph, B., Hajji, N., Venero, J. L., & Burguillos, M. A. (2020). Microglia: Agents of the CNS Pro-Inflammatory Response. *Cells 2020, Vol. 9, Page 1717*, 9(7), 1717. <https://doi.org/10.3390/CELLS9071717>
- Ruger, M., & Scheer, F. A. J. L. (2009). Effects of circadian disruption on cardiometabolic system. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 10(4), 245.
<https://doi.org/10.1007/S11154-009-9122-8>
- Rumanova, V. S., Okuliarova, M., & Zeman, M. (2020). Differential Effects of Constant Light and Dim Light at Night on the Circadian Control of Metabolism and Behavior. *International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 5478*, 21(15), 5478.
<https://doi.org/10.3390/IJMS21155478>
- Salgado-Delgado, R. C., Saderi, N., Basualdo, M. del C., Guerrero-Vargas, N. N., Escobar, C., & Buijs, R. M. (2013). Shift Work or Food Intake during the Rest Phase Promotes Metabolic Disruption and Desynchrony of Liver Genes in Male Rats. *PLoS ONE*, 8(4).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060052>
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., Ransohoff, R. M., Greenberg, M. E., Barres, B. A., & Stevens, B. (2012). Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron*, 74(4), 691–705. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.026>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods 2012 9:7*, 9(7), 676–682.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Serón-Ferré, M., Mendez, N., Abarzua-Catalan, L., Vilches, N., Valenzuela, F. J., Reynolds, H. E., Llanos, A. J., Rojas, A., Valenzuela, G. J., & Torres-Farfan, C. (2012). Circadian rhythms in the fetus. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 349(1), 68–75. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2011.07.039>

- Shi, S. Q., Ansari, T. S., McGuinness, O. P., Wasserman, D. H., & Johnson, C. H. (2013). Circadian disruption leads to insulin resistance and obesity. *Current Biology : CB*, 23(5), 372. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2013.01.048>
- Sominsky, L., de Luca, S., & Spencer, S. J. (2018). Microglia: Key players in neurodevelopment and neuronal plasticity. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 94, pp. 56–60). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.11.012>
- Takahashi, L. K., Haglin, C., & Kalin, N. H. (1992). Prenatal stress potentiates stress-induced behavior and reduces the propensity to play in juvenile rats. *Physiology & Behavior*, 51(2), 319–323. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(92\)90147-T](https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90147-T)
- Tapia-Osorio, A., Salgado-Delgado, R., Angeles-Castellanos, M., & Escobar, C. (2013). Disruption of circadian rhythms due to chronic constant light leads to depressive and anxiety-like behaviors in the rat. *Behavioural Brain Research*, 252, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2013.05.028>
- Thor, D. H., & Holloway, W. R. (2013). Developmental analyses of social play behavior in juvenile rats. *Bulletin of the Psychonomic Society 1984 22:6*, 22(6), 587–590. <https://doi.org/10.3758/BF03333916>
- Torres-Farfan, C., Rocco, V., Monsó, C., Valenzuela, F. J., Campino, C., Germain, A., Torrealba, F., Valenzuela, G. J., & Seron-Ferre, M. (2006). Maternal Melatonin Effects on Clock Gene Expression in a Nonhuman Primate Fetus. *Endocrinology*, 147(10), 4618–4626. <https://doi.org/10.1210/EN.2006-0628>
- Tremblay, M. È., Stevens, B., Sierra, A., Wake, H., Bessis, A., & Nimmerjahn, A. (2011). The role of microglia in the healthy brain. *Journal of Neuroscience*, 31(45), 16064–16069. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4158-11.2011>
- van Kerkhof, L. W. M., Damsteegt, R., Trezza, V., Voorn, P., & Vanderschuren, L. J. M. J. (2013). Functional integrity of the habenula is necessary for social play behaviour in rats. *European Journal of Neuroscience*, 38(10), 3465–3475. <https://doi.org/10.1111/EJN.12353>
- van Kerkhof, L. W. M., Trezza, V., Mulder, T., Gao, P., Voorn, P., & Vanderschuren, L. J. M. J. (2013). Cellular activation in limbic brain systems during social play behaviour in rats. *Brain Structure and Function 2013 219:4*, 219(4), 1181–1211. <https://doi.org/10.1007/S00429-013-0558-Y>
- Vanderschuren, L. J. M. J., Achterberg, E. J. M., & Trezza, V. (2016). The neurobiology of social play and its rewarding value in rats. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 70, 86–105. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2016.07.025>
- Vanderschuren, L. J. M., Niesink, R. J. M., Spruijt, B. M., & van Ree, J. M. (1995). Influence of environmental factors on social play behavior of juvenile rats. *Physiology & Behavior*, 58(1), 119–123. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)00385-I](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)00385-I)

- Vandewalle, G., Maquet, P., & Dijk, D. J. (2009). Light as a modulator of cognitive brain function. *Trends in Cognitive Sciences*, *13*(10), 429–438.
<https://doi.org/10.1016/J.TICS.2009.07.004>
- Varcoe, T. J., Gatford, K. L., & Kennaway, D. J. (2018). Maternal circadian rhythms and the programming of adult health and disease. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *314*(2), R231–R241.
https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00248.2017/SUPPL_FILE/SUPPLEMENTAL
- Vetter, C. (2020). Circadian disruption: What do we actually mean? *European Journal of Neuroscience*, *51*(1), 531–550. <https://doi.org/10.1111/EJN.14255>
- Weil, Z. M., Fonken, L. K., Walker, W. H., Bumgarner, J. R., Liu, J. A., Melendez-Fernandez, O. H., Zhang, N., DeVries, A. C., & Nelson, R. J. (2020). Dim light at night exacerbates stroke outcome. *European Journal of Neuroscience*, *52*(9), 4139–4146. <https://doi.org/10.1111/EJN.14915>
- Weinstock, M. (2001). Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 65).
www.elsevier.com/locate/pneurobio
- Wong, S. D., Wright, K. P., Spencer, R. L., Vetter, C., Hicks, L. M., Jenni, O. G., & LeBourgeois, M. K. (2022). Development of the circadian system in early life: maternal and environmental factors. In *Journal of Physiological Anthropology* (Vol. 41, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40101-022-00294-0>
- Wyse, C., Desbonnet, L., Kangasmaa, N., Russell, A., & SM, B. (2016). Increased Expression of Microglial Markers in the Arcuate Nucleus of Mice Exposed to Dim Light at Night. *Proceedings of the Nutrition Society*, *75*(OCE1), E27.
<https://doi.org/10.1017/S0029665115004607>