



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efecto de la administración prenatal de cadmio en
la fisiología y conducta de la rata**

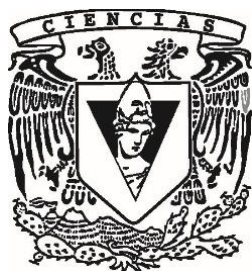
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

GONZÁLEZ RUANO, JESÚS SALVADOR



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. PILAR DURÁN HERNÁNDEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. (2018)



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVÁNAMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

LIC. IVONNE RAMÍREZ WENCE
Directora General
Dirección General de Administración Escolar
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Efecto de la administración prenatal de cadmio en la fisiología y conducta de la rata

realizado por **Jesús Salvador González Ruano** con número de cuenta **309189543** quien ha decidido titularse mediante la opción de **tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietaria Dra. Elsa Guadalupe Escamilla Chimal

Propietario M. en C. Agustín Carmona Castro

Propietaria Dra. Pilar Durán Hernández
Tutora

Suplente M. en C. Enrique Moreno Sáenz

Suplente Biól. Dulce Jocelyn Bustamante Valdez

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., A 20 DE OCTUBRE DE 2017

JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno
González Ruano, Jesús
Salvador
68 37 21 38
Universidad Nacional
Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
30918954-3
2. Datos del Tutor
Doctora
Pilar
Durán
Hernández
3. Datos del sinodal 1
Doctora
Elsa
Guadalupe
Escamilla
Chimal
4. Datos del sinodal 2
M. en C.
Enrique
Moreno
Sáenz
5. Datos del sinodal 3
M. en C.
Agustín
Carmona
Castro
6. Datos del sinodal 4
Bióloga
Dulce
Jocelyn
Bustamante
Valdez
7. Datos del trabajo escrito
Efecto de la administración
prenatal de cadmio en la
fisiología y conducta de la
rata
75p
2018

Dedicatoria a:

La Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

La Facultad de Ciencias.

Laboratorio de Biología Animal Experimental.

Mi padre Juan Ambrosio González Alatorre y a mi madre Severa Ruano Mariano, a mis
hermanos Juan González Ruano y Julio Cesar González Ruano.

Mis sinodales, Pilar Durán, Enrique Moreno, Agustín Carmona, Elsa Escamilla y Dulce
Bustamante.

Los amigos que se han cruzado a lo largo de mi vida

y

a todos los animales que apoyaron ésta y todas las investigaciones que se realizan
para el conocimiento biológico así como biomédico, en favor de la naturaleza.

***Para entender y comprender la paz, primero tenemos que sentir empatía y amor
por otras formas de vida.***

Agradecimientos académicos

A la Dra. Pilar Durán Hernández, por ser una parte fundamental en el desarrollo de este protocolo, en la parte experimental, en desarrollar las técnicas y laberintos, en la investigación teórica y análisis de resultados.

A la Dra. Marcela Arteaga Silva por aportar las alícuotas de CdCl_2 que se utilizaron para realizar el protocolo experimental.

Al M. en C. Enrique Moreno Sáenz, por apoyar en el desarrollo de este proyecto en el desarrollo del laberinto de acantilado visual, principalmente en la parte teórica con revisiones constantes del escrito.

A la Bióloga Dulce Bustamante Valdez, por su apoyo técnico, su ayuda en el cuidado de los animales, a realizar pruebas conductuales, enseñarme técnicas que se utilizaron durante este protocolo, a obtener y analizar los resultados, su análisis estadístico y además en la revisión constante del escrito.

A la Dra. Elsa Escamilla Chimal, por sus constantes aportaciones para mejorar el proyecto de investigación.

Al M. en C. Agustín Carmona Castro, por su apoyo en el mantenimiento de animales den el bioterio de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Además por sus revisiones al escrito.

Al Biólogo Martín A. Fuentes Cano, por su apoyo técnico en el equipo que se utilizó en este protocolo, además de sus constantes aportaciones para la obtención y el análisis de resultados.

A la Bióloga María Nayeli Ortega Villegas, por su apoyo en el mantenimiento de animales, sus aportaciones al desarrollo del protocolo y ayuda en la realización de las pruebas conductuales.

Agradecimientos

A mi padre Juan González y a mi madre Severa Ruano, por ser seres espectaculares, ejemplos de vida, que me enseñaron el valor de la responsabilidad, la disciplina, el amor y la pasión para hacer las cosas, alentándome constantemente sin dejar que me desanimara, motivándome a cumplir meta tras meta y apoyándome en ellas. Ellos fueron, son y serán el apoyo fundamental en toda mi vida y ante su ausencia no sería la persona que soy, porque siempre han estado, están y estarán presentes, ¡con todo mi amor muchas gracias!

A mis hermanos Juan González Ruano y Julio Cesar González Ruano, las personas más especiales de mi vida, porque con ellos crecí, me enseñaron a salir adelante ante cualquier adversidad, personas de mi total admiración y que son mis ejemplos a seguir, brindándome sus consejos, su apoyo, teniendo momentos de risas, tristezas, enojos, logros y derrotas, ellos son de esas personas que agradeces día con día que estén en tu vida y sin su gran apoyo estaría muy lejos de donde estoy ahora. ¡Gracias!

A la Dra. Pilar Durán, gracias a ella he crecido constantemente en el ámbito académico, por sus sabios consejos, sus regaños, su apoyo, comprendí como debe ser un científico, a compartir el conocimiento diariamente, una amiga incondicional en mi desarrollo como investigador y profesionalista.

A la Bióloga Dulce J. Bustamante, porque desde que llegué al Laboratorio de Biología Animal Experimental, me brindó su apoyo constante. En los momentos de júbilo y de tristeza estaba ahí, una persona que fue fundamental en el desarrollo del proyecto, pero sobre todo, una excelente amiga con la que he compartido muchos momentos, por todo eso y más.

Al M. en C. Enrique Moreno, desde que lo conocí en la materia de fisiología animal, me inspiró a estudiar esa área y además me acercó al magnífico mundo de la Cronobiología, sin dejar de lado su constante apoyo a lo largo del proyecto.

Al Biólogo Martín, porque a partir de que llegué al laboratorio me brindó una mano amiga, apoyándome en varios ámbitos de mi vida, siempre al pendiente del desarrollo de mi proyecto y de mi persona, un gran amigo con el que siempre se puede contar.

A la Bióloga Nayeli, por extenderme tu mano amiga, tu apoyo incondicional, preocupándote por mi desarrollo personal, animándote a continuar constantemente y sin dejar de lado tus aportaciones al proyecto que llevé a cabo, por eso y más.

A la Dra. Elsa Escamilla, porque desde que la conocí en Biología de Animales II, fue una profesora inspiradora en el mundo de la fisiología, además de sus aportaciones en el proyecto.

Al M. en C. Agustín Carmona por brindarme una mano amiga y su apoyo en el bioterio de la Facultad de Ciencias, brindándome las enseñanzas necesarias para el cuidado de los animales.

A mi mejor amigo Juan J. Castillo, porque desde que nos hablamos el primer día siempre ha estado en las buenas y en las malas, a pesar de que hemos tenido problemas y proyectos que no resultaron como esperábamos, es una persona firme que no se rinde y continua.

A mi mejor Ulises Vega, es una gran persona que nunca te abandona y ha estado en los buenos y en los malos momentos, aquél que le pides una mano y sin pensarlo te da las dos, por ser lo que eres.

A mi mejor amiga Diana P. Cruz, nos conocimos en segundo semestre, y desde entonces me has brindado todo tu apoyo, por cada risa que hemos tenido, por cada lágrima, por cada momento que hemos disfrutado, por enseñarme a perderle el miedo a varias cosas, pero sobre todo por ser esa mano incondicional día con día.

A mi gran amiga Vanessa Huitrón, porque con ella cada momento es de risa, ayudándome siempre que ha tenido la disponibilidad, por brindarme sus conocimientos sin nada a cambio, por ser de esas personas que estimas y admiras por lo que son.

A mis amigos injueros Juan Carlos y Alejandra Cruz, por los partidos de básquet que jugamos, por las salidas que tuvimos y por cada momento que hemos disfrutado desde que nos conocimos.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Biología Animal Experimental, Alma, Roberto, Mariana, Magdalena, por todos los momentos que vivimos, disfrutamos y compartimos, sin dejar de lado, las veces que me apoyaron con mi protocolo de investigación.

A mis amigas Samantha y Marisol, por compartir parte de su vida conmigo, por las salidas, los momentos que me han acompañado, las invitaciones pero sobre todo las risas de cada día.

A mis amigas Victoria y Andrea, por estar a lo largo de mi carrera y en la misma compartir muchos grandes y buenos momentos en mi vida, que a pesar de las dificultades que se han presentado, siempre están ahí.

A todos los que han estado presentes a lo largo de mi vida, con los cuáles he construido historias.

¡MUCHAS GRACIAS!

I. ÍNDICE

I. ÍNDICE	8
II. ÍNDICE DE FIGURAS	10
III. ÍNDICE DE TABLAS.....	11
IV. ÍNDICE DE ANEXOS.....	12
V. RESUMEN	13
1. ANTECEDENTES.....	14
1.1 Ritmos biológicos	14
1.1.1 Características de los ritmos	14
1.1.2 Clasificación de los ritmos biológicos geofísico dependientes	15
1.2 Sistema circadiano	16
1.3 Ritmo de ingesta de agua y sus estudios	18
1.4 Cadmio	18
1.4.1 Características del Cadmio	18
1.4.2 El Cadmio en el desarrollo	20
1.5 Células ganglionares de la retina y las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGC)	22
1.5.1 Células ganglionares de la retina	22
1.5.2 ipRGC	22
1.6 Acantilado visual	24
1.7 Periodos críticos y eventos del desarrollo	25
1.8 Amígdala, ansiedad y estrés	26
1.8.1 Amígdala	26
1.8.2 Ansiedad y estrés	28
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	28
3. HIPOTESIS	29
4. OBJETIVOS	29
4.1 Objetivo general	29
4.2 Objetivos específicos	29
5. METODOS	30

5.1 Animales, gestación y administración	30
5.2 Marcadores del desarrollo	31
5.3 Percepción visual, ansiedad y estrés	32
5.4 Ritmo de ingesta de agua, parámetros y sincronización.....	33
5.5 Análisis estadísticos	34
6. RESULTADOS.....	35
6.1 Desarrollo.....	35
6.1.1 Talla y peso.....	35
6.1.2 Marcadores del desarrollo	37
6.2 Agudeza y percepción visual	38
6.3 Ansiedad, estrés y miedo.....	43
6.4 Ritmo ingesta de agua y su sincronización.	44
7. DISCUSIONES	50
7.1 Efectos del Cd en el desarrollo y estado temprano de la rata.	50
7.2 Efectos del Cd en la percepción visual	51
7.3 Ansiedad, estrés, evaluación de riesgo y miedo.....	53
7.4 Ritmos de ingesta de agua, características y sincronización.....	58
8. RESUMEN DE RESULTADOS	60
9. CONCLUSIONES	62
10. REFERENCIAS	63
11. ANEXOS.....	69

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Parámetros de una oscilación rítmica.....	15
Figura 2. Sistema circadiano en mamíferos	17
Figura 3. Representación esquemática del TRH	17
Figura 4. Efecto del la administración de Cd, sobre neurotransmisores.....	19
Figura 5. Microfotografía electrónica, células ganglionares de la retina de ratón	21
Figura 6. Morfología de las ipRGC de las CGR típicas.....	23
Figura 7. Acantilado visual.....	24
Figura 8. Complejo amigdalino	27
Figura 9. Fases del ciclo estral mediante frotis vaginalis.....	30
Figura 10. Fotos que muestran la longitud naso anal de animales.....	31
Figura 11. Descripción del acantilado visual.....	33
Figura 12. Esquema de las condiciones de del protocolo.....	34
Figura 13. Talla naso anal	36
Figura 14. Peso corporal	36
Figura 15. Tiempo de permanencia en cada zona del laberinto	40
Figura 16. Latencia de entrada a las diferentes zonas del laberinto.....	41
Figura 17. Latencia de entrada de la cabeza al abismo	42
Figura 18. Tiempo de congelamiento	43
Figura 19. Respuestas emocionales en el acantilado visual	44
Figura 20. Distribución de los componentes del periodo del ritmo de ingesta de agua en las diferentes condiciones de iluminación.....	45
Figura 21. Actogramas representativos de registro del ritmo de ingesta de agua	46
Figura 22. Días transitorios.....	47
Figura 23. Promedios del índice de la relación α/ρ	48
Figura 24. Consumo de agua y alimento	49

III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución del receptor TrkC en distintas estructuras durante el desarrollo perinatal y en el estado adulto.....	26
Tabla 2. Indices de los marcadores del desarrollo para el grupo control y el experimental.....	37

IV. ÍNDICE DE ANEXOS

11.1 Marcadores del desarrollo	69
11.2 Parámetros conductuales	71
11.3 Actogramas individuales	74

V. RESUMEN

El Cadmio (Cd) es un metal pesado, cuyo desecho inadecuado al ambiente provoca que sus concentraciones en agua, en el aire y en los alimentos hayan incrementado en los últimos años afectando a la salud, generando alteraciones en algunos sistemas por ejemplo, el circulatorio, el urinario, el óseo y el nervioso. Por otro lado, los ritmos biológicos son la expresión temporal repetitiva en intervalos de tiempo más o menos regulares que se produce como una respuesta, a un fenómeno y/o evento del medio y que puede sincronizarse a éste. En un estudio en ratas adultas se observó que los ritmos circadianos de liberación de neurotransmisores se vieron modificados por la administración crónica de Cd, éste genera efectos en sistemas maduros y se ha cuestionado si en el desarrollo especialmente, dónde hay periodos críticos del desarrollo que son vulnerables a factores ambientales, puede producir efectos nocivos en la salud, ya sea a nivel anatómico, conductual, fisiológico y celular, como es el caso de la apoptosis en las células ganglionares de la retina (CGR) de ratón. Se ha comprobado que en las CGR, hay un subgrupo encargado de recibir la información fótica para sincronizar los ritmos endógenos.

Conociendo lo anterior, surge la incógnita si la administración única de Cd a ratas *Sprague-Dawley* gestantes en el día embrionario 14 (E14), tiene efectos en la descendencia en etapas tempranas, juveniles y adultas. Para conocerlo se evaluaron algunos parámetros conductuales y fisiológicos de las estructuras que se desarrollan en ese día, como la amígdala y las CGR, tal como respuestas de ansiedad, estrés, miedo, la percepción visual y además la sincronización circadiana.

En este estudio fue posible establecer que la administración prenatal aguda de Cd a ratas gestantes, a su descendencia no se le modificó la percepción visual, no afectó los estados de ansiedad, sin embargo, si cambió la evaluación de riesgo, aumentando en machos y disminuyendo en hembras, ambos del grupo experimental. A su vez, la respuesta de miedo tal como la inmovilidad o tiempo de congelamiento ante un factor peligroso o estresante, se vio alterada, debido a que los animales del grupo experimental, tienen un tiempo de congelamiento (no hay movimiento) menor que los controles, dándoles una característica de “temeridad”. Por último, la endogeneidad del ritmo circadiano de ingesta de agua, así como el mayor consumo de ésta, durante la escotofase y el componente homeostático, no se vieron modificados, pero sí la sincronización, retardándose de un día a dos según la condición de iluminación.

Se concluye que la administración prenatal CdCl₂ con una dosis de 1.0 mg/kg peso corporal en el E14, tiene efectos en la progeñe en sus estados tempranos, juveniles y adultos, modificando los marcadores del desarrollo, mayor evaluación de riesgo, menor miedo ante condiciones adversas y alteraciones en la sincronización por luz.

Palabras clave: cadmio, periodos críticos del desarrollo, marcadores del desarrollo ipRGC, miedo, ritmo de ingesta de agua y sincronización.

1. ANTECEDENTES

1.1 Ritmos biológicos

1.1.1 Características de los ritmos

Existen fenómenos en la naturaleza que se presentan de manera rítmica, con una periodicidad constante, por ejemplo, la duración del día y la noche. La variación temporal de estos fenómenos, tiene en los seres vivos efectos a nivel fisiológico, metabólico, conductual, etc., (Cardinalli y Golombek, 1994).

Los seres vivos presentan una organización temporal que se puede mostrar a través de los diversos ritmos biológicos, éstos se manifiestan en las células, los tejidos, los órganos o incluso en las poblaciones (Aschoff, 1981). Un ritmo biológico es la expresión temporal repetitiva que se produce como una respuesta, ya sea interna o a un fenómeno o evento del medio. Esta respuesta se repite de manera constante en intervalos de tiempo más o menos regulares, y puede o no sincronizarse a fenómenos geofísicos y/o factores ambientales (Aschoff, 1981; Cardinalli y Golombek, 1994).

En todos los ritmos biológicos su oscilación presenta características paramétricas, tales como la amplitud, que se define como la diferencia existente entre el valor máximo y el mínimo o viceversa (Brady, 1979), el periodo es el intervalo de tiempo en el cual se completa una oscilación (Marques *et al*, 1997), además todas las oscilaciones tienen un punto máximo y un punto mínimo denominados acrofase y batifase respectivamente y finalmente al valor medio entre estos dos, se le conoce como mesor y fase que es cualquier punto de la oscilación (figura 1).

Los ritmos biológicos se pueden dividir de acuerdo a su naturaleza en geofísico dependientes y en geofísico independientes. Los ritmos del primer tipo, son los procesos biológicos que se sincronizan con los movimientos cíclicos ambientales, por ejemplo la duración del día y la noche, las estaciones, las mareas y la duración del ciclo lunar. Los ritmos geofísico independientes son aquellos que no dependen de factores ambientales para oscilar y que son intrínsecamente homeostáticos (Durán *et al*, 2013).

1.1.2 Clasificación de los ritmos biológicos geofísico dependientes

Como se ha descrito previamente, todos los ritmos tienen un periodo con el que oscilan, éste se puede utilizar para clasificarlos y generalmente se hace en relación a la duración de un día (24 hrs). Los ritmos circadianos (del latín *circa*: cercano a, y *diem*: día, es decir cercano a un día) son aquellos cuyo periodo es de aproximadamente 24 horas. Si la oscilación o periodo no se completa en este lapso de tiempo se les denomina infradianos y por el contrario, si varias oscilaciones se completan en un día se les llama ultradianos. Éstos también están conformados por otros ritmos biológicos que no dependen de las oscilaciones geofísicas, sin embargo, esos se clasifican de manera diferente (Aschoff, 1981; Durán *et al*, 2013).

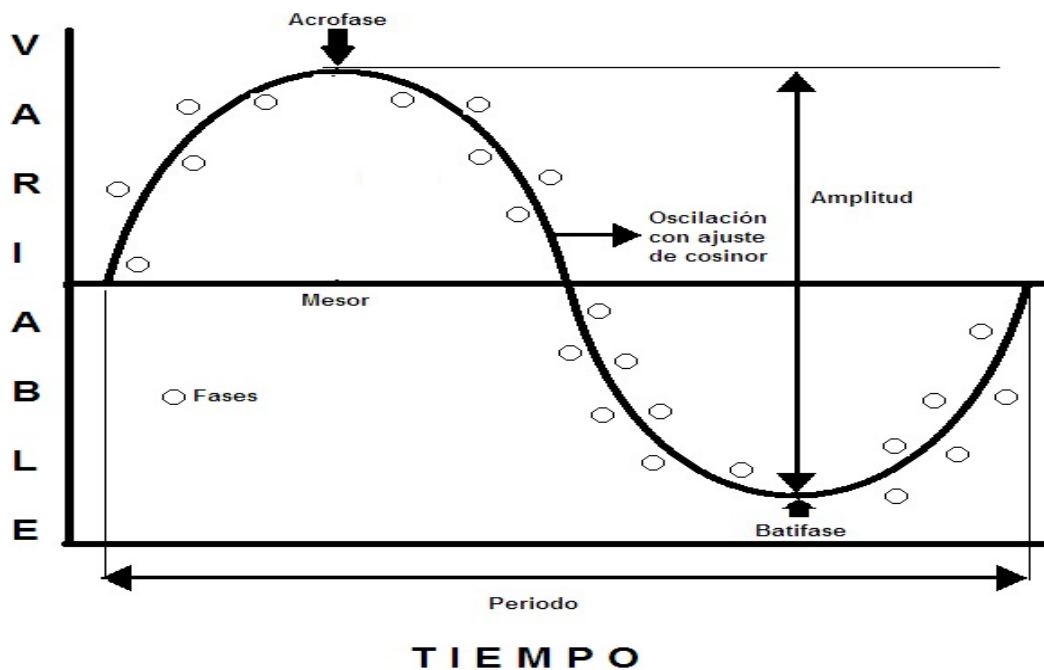


Figura 1. Parámetros de una oscilación rítmica de periodo constante utilizando un algoritmo matemático como el ajuste de Cosinor (modificado de Durán *et al*, 2013).

Los ritmos circadianos se asocian al movimiento de rotación de la Tierra, que corresponde a un ciclo diario de Luz/Oscuridad (LO) (Marques *et al*, 1997). En el área de la investigación estos ritmos son los más estudiados de los seres vivos. Muchas respuestas fisiológicas oscilan de manera circadiana y es por ello que se pueden abordar no solo en biología sino en la biomedicina, abriendo un panorama nuevo en el cuidado de la salud (Durán *et al*, 2013).

Los ritmos circadianos como ritmos biológicos presentan las características: 1) ubicuos, es decir propios de cada especie y 2) heredables que tienen una base genética. Además como ritmos circadianos sus características: 1) son endógenos, es decir, que éstos en condiciones constantes (ausencia de factores ambientales), siguen oscilando y/o expresándose, lo cual se conoce como libre corrimiento, 2) compensan la temperatura, es decir, que la duración del periodo no se ven afectados por cambios en la temperatura, debido a que existen mecanismos internos que permiten que se ajusten y otra característica más es que 3) se pueden sincronizar perfectamente a los sincronizadores ambientales (llamados *Zeitgebers* o dadores de tiempo), como el inicio del día o el encendido de las luces (Brady, 1979; Durán *et al*, 2013).

El principal zeitgeber que afecta a los seres vivos es la luz y los cambios en la duración de ésta (fotoperiodo), como es el caso del ciclo Luz/Oscuridad (Dunlap *et al*, 2004). Las señales ambientales producen distintas variaciones fisiológicas en los diversos animales, debido a que durante el proceso evolutivo, se desarrolló un complejo de mecanismos adaptado a dichos cambios ambientales cuya función es proveer a los organismos un ritmo biológico, a éste se le conoce como sistema circadiano (Toledo *et al*, 2004).

1.2 Sistema circadiano

El sistema circadiano es un conjunto de estructuras y mecanismos necesarios para que los ritmos circadianos oscilen y se sincronicen a un factor ambiental de manera adecuada (Toledo *et al*, 2004). Dicho sistema está conformado por una vía de entrada, un oscilador central y una vía de salida (figura 2).

En el sistema circadiano la vía de entrada es aquella que recibe la información del sincronizador, en los mamíferos, la señal fótica es recibida por la capa de células ganglionares de la retina (CGR), para posteriormente enviar la señal mediante el tracto retinohipotalámico (TRH) al siguiente componente del sistema, el oscilador central, también conocido como reloj biológico o marcapasos central y que es el núcleo supraquiasmático (NSQ) (figura 3).

El NSQ es un núcleo hipotalámico, dorsal al quiasma óptico (QO) y ventral al tercer ventrículo (3V), está conformado por dos componentes, una región central y una corteza (Toledo *et al*, 2004, Soria y Urretavizcaya, 2009; y Golombek *et al*, 1997).

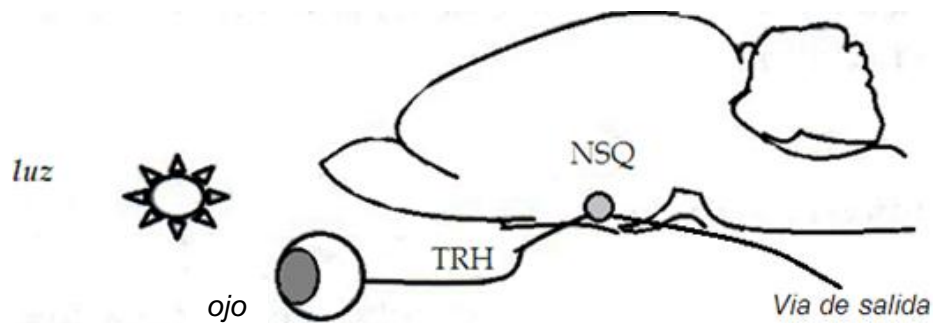


Figura 2. Sistema circadiano en mamíferos. La señal fótica entra por la retina y viaja a través del tracto retinohipotalámico (**TRH**) hasta llegar al núcleo supraquiasmático (**NSQ**). Aquí se sincroniza el ritmo endógeno con la señal ambiental y posteriormente se emite una respuesta conductual o fisiológica que se expresa por la vía de salida (modificado de Durán *et al*, 2013).

Por último, la vía de salida del sistema circadiano es la expresión del ritmo biológico y puede ser una respuesta fisiológica, metabólica, celular y/o conductual del organismo, por ejemplo ritmo de actividad/reposo, el ritmo de sueño/vigilia, la liberación de cortisol, la ingesta de alimento, la ingesta de agua, entre otros.

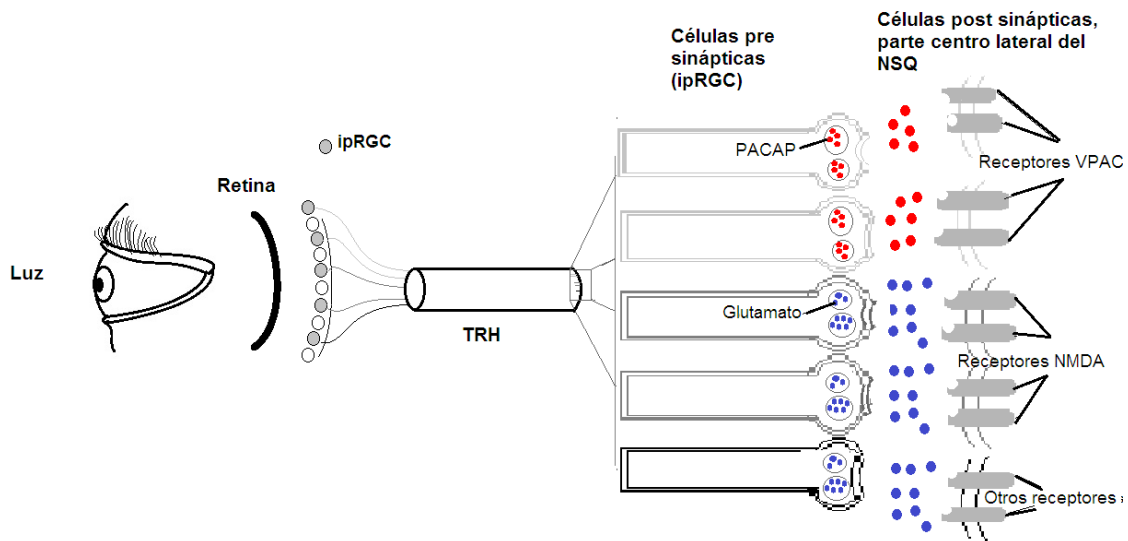


Figura 3. Representación esquemática del tracto retinohipotalámico (TRH). Transmisión de la información fótica hacia el NSQ (modificado de Golombek y Rosenstein, 2009).

1.3 Ritmo de ingesta de agua y sus estudios

En 1972 Stephan y Zucker buscaron en el hipotálamo de ratas alguna región en donde se podría hallar el marcapasos u oscilador central, lesionaron distintas regiones de esta estructura para observar cómo respondían ante los cambios de fotoperiodo en los ritmos de actividad locomotora e ingesta de agua (ya se había demostrado que éstos son generados por un oscilador central). Los investigadores asumieron que si se dañaba la estructura que los generaba, la expresión del ritmo desaparecería, concluyeron que la región ventromedial del hipotálamo es importante para el control del ritmo de ingesta de agua y el de actividad locomotora, porque al lesionarla, éstos presentaron arritmia.

En otro estudio (Johnson y Johnson, 1990) se relacionó la expresión del ritmo de ingesta de agua con el inicio del ritmo de ingesta de alimento. Sin embargo, concluyeron que las ratas seguían consumiendo agua sin necesidad de haber ingerido alimento previamente, lo cual les indicó que el ritmo de ingesta de agua no necesita de otro ritmo o algún otro factor para expresarse.

Ambos estudios confirman que el ritmo de ingesta de agua es endógeno, que su expresión es generada por un oscilador central y no por algún otro factor y se sincroniza con las condiciones de luz. Considerando todo lo anterior, dicho ritmo sirve para estudiar y hacer investigación en el área de los ritmos circadianos.

1.4 Cadmio

1.4.1 Características del Cadmio

El cadmio (Cd) es un metal que forma parte del grupo IIB de la tabla periódica, con un peso atómico de 112.41; su forma iónica (Cd^{2+}) está usualmente combinada con formas iónicas del oxígeno (óxido de cadmio CdO_2), cloruro (cloruro de cadmio, $CdCl_2$) o sulfuros (sulfato de cadmio $CdSO_4$); aunque también se ha encontrado que está asociado al cobre (Cu), hierro (Fe) o zinc (Zn) (Martínez *et al*, 2013).

El Cd es un metal pesado que en los últimos años ha aumentado sus concentraciones ambientales, debido al mal desecho de artículos que lo contienen (como baterías, plásticos, pinturas, entre otros) en lugares inadecuados (Nava-Ruiz y Méndez-Armenta, 2011), además esta liberación es cada vez mayor debido a algunos

procesos de industrialización, como la quema de los combustibles fósiles, la minería, la producción industrial, los fangos de aguas residuales, el desarrollo de fertilizantes con fosfatos, el plateado de metales, la producción de pigmentos para pinturas, los estabilizadores de plásticos y las baterías de níquel-cadmio (Ni-Cd) (García *et al*, 2005). Otro producto que incrementa la concentración de Cd en la atmósfera es el cigarro y el humo que desprende, ya que la planta de tabaco bioacumula Cd del suelo, ésta misma es utilizada en la fabricación de cigarros y además este metal es uno de los componentes que se le adicionan al producto final (Wills *et al*, 2008).

El Cd provoca efectos dañinos a la salud, principalmente porque se ingiere en la dieta, mediante los alimentos que consumimos a diario (vegetales, carnes, mariscos, entre otros) debido a que éstos lo bioacumulan a partir de los fertilizantes y abonos (García *et al*, 2005). Además de la ingesta de alimentos, existen otras vías de entrada como la respiratoria y a través la piel (Nava-Ruiz y Méndez-Armenta, 2011). También se sabe que éste metal durante la gestación puede generar efectos adversos en la progenie (Samarawickrama, y Webb, 1981).

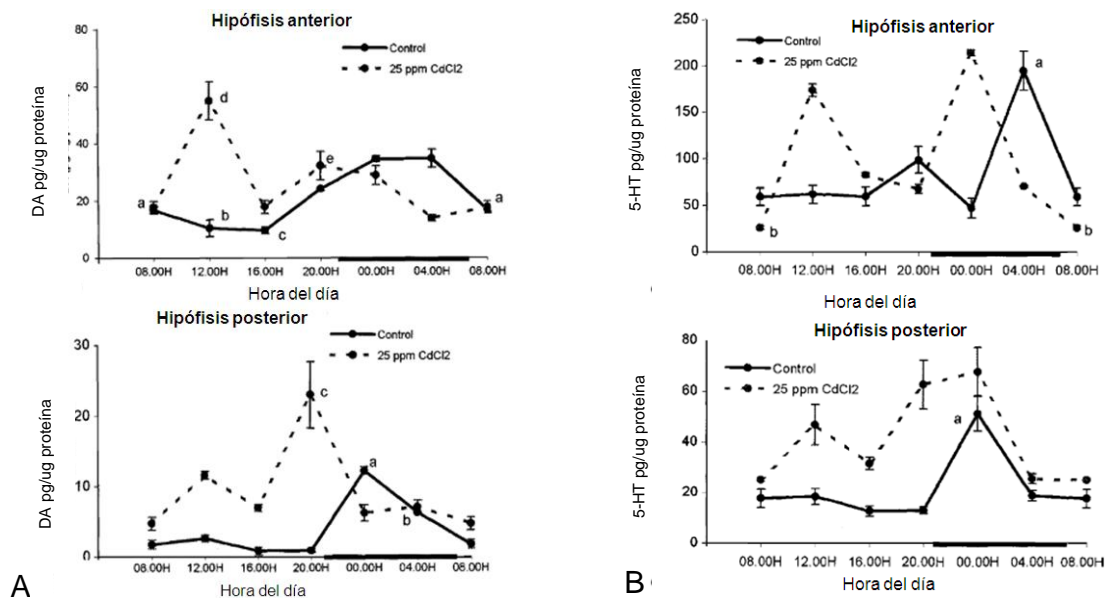


Figura 4. Alteraciones ocasionadas por el Cd en los niveles de A) dopamina y B) serotonina en la hipófisis anterior y posterior en grupos controles (línea continua) y experimentales (línea punteada). Se observa que los animales experimentales, tienen adelantos en las acrofases (modificado de Lafuente *et al*, 2005).

También se ha observado que organismos expuestos a Cd modifican la expresión de sus ritmos, por ejemplo, en un estudio realizado por Lafuente y colaboradores, (2005) observaron que al administrar cadmio de manera crónica (30 días) en ratas macho de 60 días de edad, se modifica en la glándula hipófisis anterior y en la posterior la concentración de dopamina y de serotonina a lo largo del día, desfasando sus acrofases con respecto al grupo control (figura 4).

1.4.2 El Cadmio en el desarrollo

En la rata, la gestación y el desarrollo embrionario, representan un periodo de alta susceptibilidad a la acumulación de metales pesados, cómo el Cd (Samarawickrama y Webb, 1979) debido a que este metal atraviesa la barrera hemato-placentaria (Somawane *et al*, 1975). En un estudio realizado por Chernoff, (1973), demostró que las crías de ratas gestantes de la cepa CD, después de una administración crónica con diferentes dosis (4, 6, 8 o 12 mg/kg peso corporal), de CdCl₂ entre días embrionarios 13 y 19 (E13-19), mostraron que la mortalidad de los fetos aumenta cuando la dosis se administra entre los días E14 y E17, además, los efectos resultantes en las crías dependen de la concentración de la dosis, mientras es más alta, aumenta la absorción de fetos, es mayor el número de crías muertas y por ende disminuye el número de crías vivas al nacer, las que nacieron tuvieron mayores efectos teratogénicos, su peso y talla es menor con respecto a los animales controles.

Samarawickrama y Webb, en 1981, confirmaron los experimentos de Chernoff, de 1973, demostrando que una dosis de concentración alta, provocará y aumentará los efectos contraproducentes en la progenie. También describieron que en los últimos estados de la gestación, los fetos son más susceptibles a la absorción de Cd y que parte de la dosis de este metal se retiene en la placenta.

En el día E9, se producen mayores efectos teratogénicos y éstos se pueden observar a partir de una dosis de 1.25mg/kg de peso corporal, dichos efectos variarán dependiendo de la dosis, la nutrición del animal, la cepa que se maneje y la edad (Chernoff, 1973; Samarawickrama, y Webb, 1981; y Piasek, y Laskey, 1994). Almasi-Tork y colaboradores en 2007 describieron que la administración de Cd provoca

teratogénesis y anomalías en el sistema esquelético, en la formación del tubo neural, en el sistema renal, en el corazón y en el sistema inmune.

También se ha demostrado que la administración subcrónica (cuando la aplicación no es continua, en este caso la administración fue de 5 veces por semana, durante toda la gestación) de Cd en diferentes concentraciones (0.04, 0.4 y 4.0 mg/kg) a través del agua de consumo de los animales, no generó modificaciones en el número de fetos reabsorbidos, el número de fetos vivos, el peso y la talla (Baranski *et al*, 1983), entre animales del grupo control y del grupo experimental.

En los últimos años se ha demostrado que el Cd se almacena en el epitelio pigmentario de la retina y además podría estar vinculado a la degeneración macular y problemas en la visión (Erie *et al*, 2005). Bajo este antecedente Almasi-Tork y colaboradores (2007) evaluaron los efectos de Cd en el desarrollo de ratones, contemplando los periodos críticos del desarrollo, evaluando dos concentraciones de CdCl₂ (3 mg/kg y 5 mg/kg de peso corporal) administrados en el día E9 (día embrionario 9, periodo crítico de proliferación de células ganglionares de la retina en ratón). El experimento demostró que al inyectar ambas dosis de Cd en ese día, en las crías aumentó la muerte de las CGR (figura 5). Concluyeron que el Cd es un promotor de apoptosis y ésta incrementa si la concentración es mayor (Almasi-Tork *et al*, 2007).

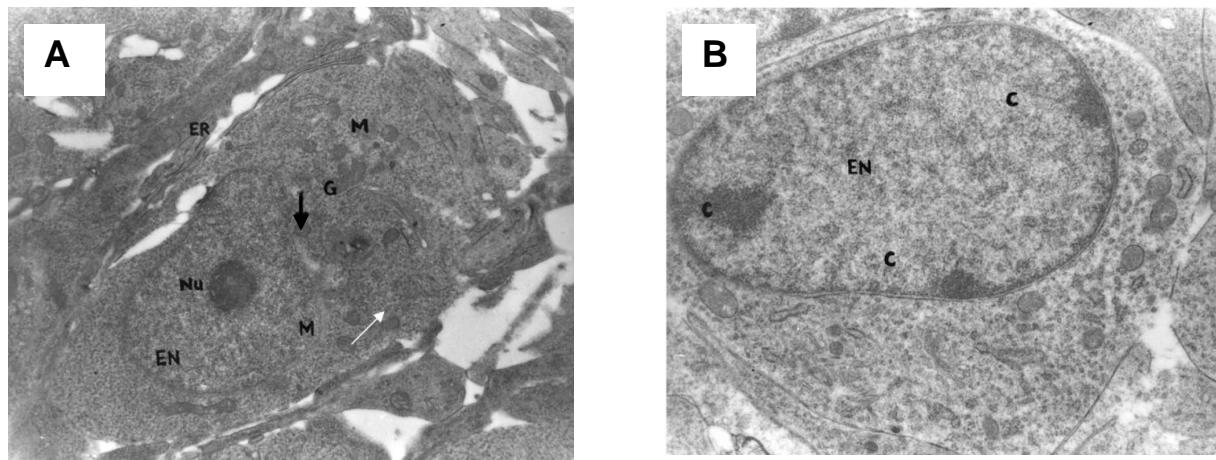


Figura 5. Microfotografía electrónica, células ganglionares de la retina de ratón. A). CGR (grupo control) y B). CGR (grupo con administración aguda de Cd en el E9) (x12000) EN: núcleo eucromático, Nu: núcleo, M: mitocondria, G: Golgi, ER: retículo endoplásmico, ribosomas libres. C: cromatina, al observar la cromatina libre en el núcleo, se habla de estados de apoptosis (tomado de Almasi-Tork *et al*, 2007).

1.5 Células ganglionares de la retina y las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGC)

1.5.1 Células ganglionares de la retina

Las células ganglionares de la retina (CGR), son las principales receptoras de la información proveniente de las células bipolares y amacrinas, éstas a su vez de los fotorreceptores que son los conos y bastones. Las CGR continuamente están disparando potenciales de acción (Urtubia, 2006), mismos que se propagan a través de sus axones que conforman el nervio óptico, éste sale de cada globo ocular, para posteriormente formar el entrecruzamiento de ambos nervios, conocido como quiasma óptico, cada uno de estos nervios viaja a su parte ipsilateral, llegando al área pretectal del cerebro medio, al colículo superior y al cuerpo geniculado lateral del tálamo (Pérez y Salceda, 2008). Las células de la retina, durante el desarrollo embrionario conforman sus conexiones con las estructuras previamente mencionadas, que constituyen la vía visual (Chew *et al*, 2017). Morfológicamente las células ganglionares se dividen en ganglionares difusas (polisinápticas) y ganglionares enanas (monosinápticas) (Urtubia, 2006).

1.5.2 ipRGC

Hay un subgrupo de CGR que no intervienen en la vía visual. En 2002 Berson y colaboradores y Hattar y colaboradores encontraron que las células de este subgrupo que reciben el estímulo fótico que permite la sincronización de los ritmos biológicos, las cuales llamaron células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles o ipRGC (figura 6) por sus siglas en inglés (Pérez-León y Lane, 2009).

Las ipRGC contienen melanopsina (fotopigmento), la cual está almacenada en varicosidades a lo largo de las dendritas, en el soma y en parte del axón (Hattar *et al*, 2002), estas células tienen respuestas intrínsecas a la luz, de esta manera se les puede considerar como fotorreceptoras. Su morfología (figura 6) es parecida a las de las CGR comunes, sin embargo, tienen menor cantidad de dendritas (Berson *et al*, 2002).

Al final de sus proyecciones axónicas liberan el neurotransmisor péptido activador de la adenilato ciclasa (PACAP) (Hattar *et al*, 2002), dichos axones forman el TRH (Durán *et al*, 2013) que establece conexiones con las neuronas del NSQ,

estructura donde se lleva a cabo la sincronización de la información ambiental con cualquier ritmo circadiano (Pérez León y Lane, 2009).

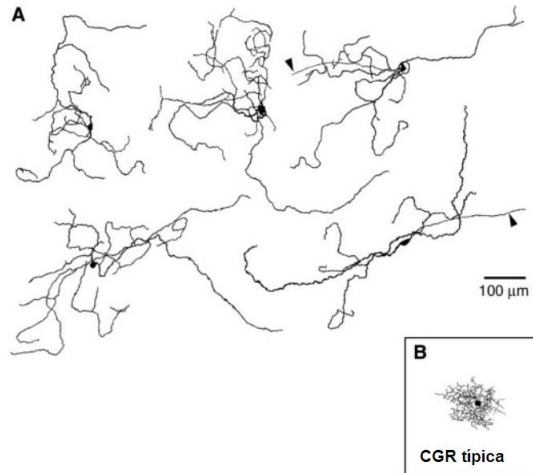


Figura 6. A. Morfología de las ipRGC A y B. morfología de CGR típicas. La flecha señala el axón de las células. Obtenida con cámara lúcida (modificado de Berson *et al*, 2002).

Las ipRGC se pueden dividir en cinco subtipos: M1, M2, M3, M4, M5. Las M1, son las que principalmente tienen mayores conexiones con la parte ventromedial del NSQ, el resto tienen otra función que podría estar relacionada a la visión (Ecker *et al*, 2010; Chew *et al*, 2017). Las ipRGC son importantes en la maduración del reloj circadiano durante el desarrollo, debido a que son las que indican la presencia de luz y que de esta manera establecen un periodo circadiano, además puede ser un regulador neural de las CGR típicas, cuyas proyecciones van hacia el tálamo (Chew *et al*, 2017).

En resumen en las CGR, existen las ipRGC y las típicas, las del primer grupo ayudan en la maduración del reloj circadiano y una vez maduro el sistema son primordiales para que se lleve la sincronización mientras que las del segundo grupo, que son las más comunes, tienen la función principal de llevar la información proveniente de las otras células de la retina, para dar información visual. Si hay daño en las CGR, no habrá transmisión de la señal neural y podría hablarse de deficiencias en la visión. Muchos investigadores evalúan la visión en roedores mediante la percepción visual a través de la percepción de la profundidad, como lo hicieron Walk y Gibson en 1961.

1.6 Acantilado visual

Walk y Gibson en 1961, fueron de los primeros investigadores en diseñar y elaborar un sistema para evaluar y describir en diferentes grupos de mamíferos las conductas visuales, tal como la percepción visual (Routtenberg y Glickman, 1964). Ésta se puede determinar a partir de la percepción de la profundidad, para ello diseñaron un dispositivo que llamaron visual Cliff que en español se traduce como acantilado visual (figura 7).

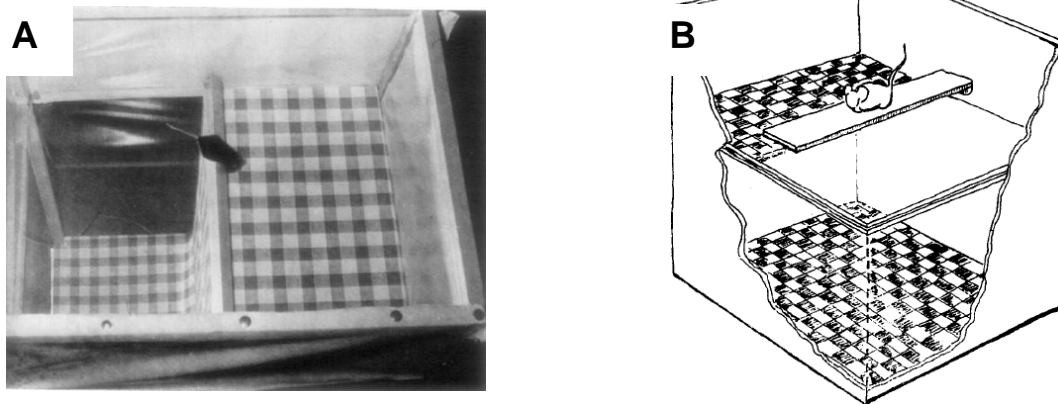


Figura 7. Acantilado visual, dispositivo para evaluar percepción visual a partir de la determinación de la profundidad. En ratón, uno de los dispositivos carece de riel A) y el otro tiene un riel B). Tomado de Carr y McGuigan 1965; y Fox, 1965.

El sistema es un cuadrado o rectángulo, cuenta con una lámina de vidrio o acrílico en la parte superior rodeada por paredes. El dispositivo cuenta con dos plataformas una superior cuya característica es tener un patrón (cuadrados blancos con negro) pegado a la misma, este patrón es el mismo en la base y en las paredes aledañas del sistema, esta segunda zona es la plataforma profunda. Si los animales tienen una buena percepción de profundidad, evitarán pisar el cristal que está sobre la plataforma profunda, el caso contrario, indicaría que tienen deficiencia de visión (Walk y Gibson, 1961). El acantilado visual ha sido modificado por varios autores, pero conserva el objetivo primordial de determinar la percepción de la profundidad.

1.7 Periodos críticos y eventos del desarrollo

Un periodo crítico se puede entender como una ventana de desarrollo que sólo sucede una vez en el tiempo, se da la mayor tasa de cualquier evento en ese estado y puede efectuarse de manera más rápida. En el cerebro de mamíferos muchos procesos pueden acelerar su actividad por periodos cortos (Morgane *et al*, 1993).

En las ratas la mayor proliferación de células ganglionares tipo alfa es en el día embrionario 14 (E14) debido a que hay una mayor proliferación en el centro de la retina (Reese y Colello, 1992). En el día E14 suceden otros eventos importantes, en un estudio evaluaron la presencia del receptor TrkC en diferentes días del desarrollo, este receptor se acopla a la neurotrofina 3, misma que se expresa en el desarrollo del sistema nervioso porque es un factor de crecimiento y especialización neuronal. Durante el periodo perinatal, se ha observado al receptor TrkC en el tálamo y en la corteza cerebral. En el trabajo que desarrollaron, dieron a conocer los días en que apareció por primera vez el receptor, en qué estructuras y además la concentración del mismo. El marcaje de las células al microscopio fue determinado en el cerebro anterior. La evaluación se llevó en cada punto del desarrollo y la intensidad de la tinción fue analizada de la siguiente manera: ninguna tinción (-), tinción baja (+), tinción intermedia (++) y tinción abundante (+++) (Tabla 1) (Hassink, *et al*, 1999).

La exposición de agentes tóxicos durante la ontogenia o desarrollo embrionario de un organismo, puede generar modificaciones en la cascada de eventos que se dan o desarrollan en ese periodo y por ende habrá efectos colaterales en las crías (Rice y Barone, 2000). La teratogénesis que sufran los organismos a causa del Cd, dependerá de varios factores. La administración de este metal pesado en el desarrollo puede ser letal, puede generar cambios morfológicos, en la talla, en el peso y a nivel celular, lo cual puede repercutir en alteraciones fisiológicas a corto, mediano o largo plazo, aunque no hay muchos estudios de este tipo.

Por tal motivo cuando se hacen experimentos donde hay administración de Cd, se debe considerar la cepa que se maneje, la dosis, la concentración, la nutrición del animal, la edad del mismo, el tiempo de exposición, los periodos críticos en el día o días de la administración, las estructuras que pueden ser afectadas por el metal pesado y la

función de las mismas (Chernoff, 1973; Samarawickrama, y Webb, M 1981; y Piasek, M. y Laskey, J. 1994).

Tabla 1. Distribución del receptor TrkC en distintas estructuras durante el desarrollo perinatal y en el estado adulto (modificado de Hassink, *et al*, 1999).

Estructura	Primera aparición	Edad					
		E15	E17	E19	PNI	PN 8/9	Adulto
Septum (S)	E13	+	+	+	-	-	-
Lateral Septum (LS)	E16		+	+	+	+	+
Medial Septum (MS)	E14	+	++	+	+	+	++
Zona estriada subventricular	E14	+	+	+			
Estriado	E13	+++	+++	++	++	++	+
Tálamo	E13	+	+	+	-	-	-
Hipotálamo medial	E12	+	+	+	+	+	+
Núcleo preóptico medial	E14	+	+	+	+	+	++
NSQ	E17		+	++	++	++	++
Cama del núcleo estriado terminal	E14	+	+	+	+	+	+
Hipotálamo posterior	E12	+	+	+	+	+	--
Hipocampo	E13	+	+	+	-	-	-
Amígdala	E12	+	+	+	-	-	-
Amígdala central	E15	+	+	+	+	++	++
Amígdala basomedial	E14	+	+	+	+	++	++
Amígdala basolateral	E15	+	+	+	+	++	++

1.8 Amígdala, ansiedad y estrés

1.8.1 Amígdala

La amígdala es una estructura ubicada en el lóbulo temporal, en la parte ventral del hipocampo en ambos hemisferios y forma parte del sistema límbico. Se le ha relacionado con las emociones en animales humanos y otros mamíferos, entre las que se incluyen las respuestas de miedo y/o placer. Se considera que tiene la función de un procesamiento emocional, debido a que en ella se inervan proyecciones de otras áreas de asociación sensorial, es decir que en ella se llevan a cabo los procesos de asociación, estímulo, recompensa y castigo (Castro-Sierra *et al*, 2005).

Se sabe que el complejo amigdalino está conformado por 13 núcleos y algunas áreas corticales (Chareyron *et al*, 2011), cada uno de éstos tiene una función individual, sin embargo, se han agrupado por su posición anatómica entre sí, se puede considerar el complejo basal (B), lateral (L), central (CE) y el medial (M) (figura 8), éste último está conectado con núcleo basal de la estría terminal (NBET) que comunica el núcleo cortical (o corticomedial, NC), o “amígdala olfativa”, el NBET contiene neuronas similares a las del CE y constituye la “amígdala extendida”, junto con el núcleo accumbens y otros núcleos basales, el NBET se halla en el cerebro anterior basal. con algunos de los núcleos amigdalinos principales (Castro-Sierra *et al*, 2005).

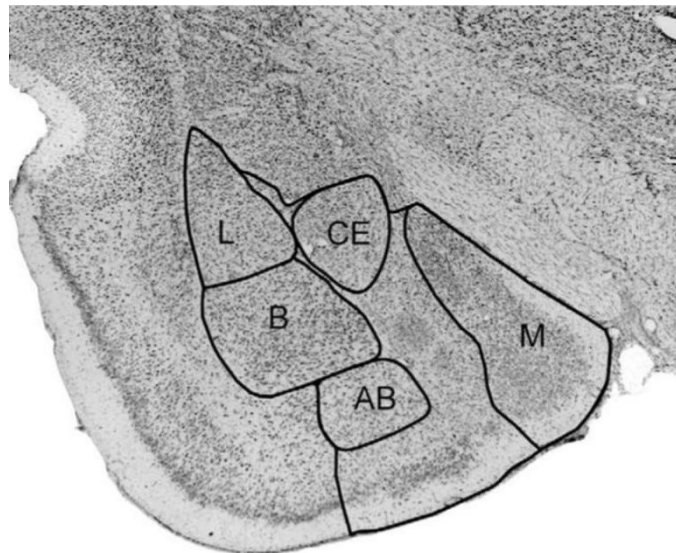


Figura 8. Complejo amigdalino. Corte coronal a través de la amígdala de la rata, núcleo central (**CE**), núcleo medial (**M**), núcleo lateral (**L**), núcleo basal (**B**), núcleos accesorios (**AB**), zonas sin letra son otros núcleos (tomado de Chareyron *et al*, 2011).

Por otro lado se considera que alteraciones como la ansiedad, el autismo, la depresión, la narcolepsia, el trastorno por estrés postraumático, las fobias y la esquizofrenia, son producto de una lesión, trastornos del desarrollo o un desequilibrio de distintos neurotransmisores en la amígdala (Sánchez- Navarro y Román, 2004; Castro-Sierra *et al*, 2005).

1.8.2 Ansiedad y estrés

En roedores se han realizado muchos estudios e investigaciones que involucran conductas como repuestas de estrés y de ansiedad. El estrés, se define como la respuesta que tiene un organismo ante un estímulo que puede ser agresivo o no, debido a que éste puede ser amenazante para la homeostasis (Duval *et al*, 2010). Con la respuesta al estrés, el objetivo es restablecer la homeostasis que se ha alterado. Dentro del estrés, está el positivo o eustrés (se da cuando el estresor es controlable) o el negativo o diestrés (donde el estresor no es controlable) (Aboitiz y Dagnino-Subiabre, 2007; y Dagnino-Subiabre, 2012).

La ansiedad, es la respuesta o conjunto de respuestas que exhibe un organismo ante una amenaza real o bien ante un factor que le parece desagradable y ante el cual, huiría, generalmente es externa y puede poner en un gran riesgo la estabilidad de la homeostasis, las investigaciones de esta área son importantes y se utilizan modelos animales no humanos que permiten imitar los procesos psicológicos normales y anormales (Becerra-García *et al*, 2007; y Polanco *et al*, 2011).

En el presente trabajo de investigación, se ahondará en los efectos a corto, mediano y largo plazo de una dosis única de Cd, administrada de manera intraperitoneal a nivel inguinal en ratas gestantes de la cepa *Sprague-Dawley*, en el día E14, considerado el periodo crítico de las CGR, dentro de las cuales hay un subgrupo encargado en recibir la información fótica para la sincronización de varios ritmos biológicos y además que en ese día hay estructuras que comienzan a especializarse, por la presencia del receptor TrkC, como son la amígdala y el septum, estructuras involucradas en la regulación de la respuestas de estrés y ansiedad.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El desarrollo embrionario es un periodo de alta susceptibilidad a metales pesados como el Cd que puede modificar la secuencia normal de eventos, provocando alteraciones morfológicas, fisiológicas e incluso celulares. Se sabe que en la rata durante el día E14 se presentan varios eventos del desarrollo como la formación de la amígdala encargada de conductas de estrés, ansiedad y miedo, por otro lado ese día también es el periodo

crítico de proliferación de CGR, en éstas hay un grupo que ayuda a sincronizar a los ritmos biológicos. Conociendo lo anterior ¿será posible que la administración aguda de Cd en el día E14 pueda generar alteraciones del desarrollo de los individuos, las respuestas de ansiedad, el estrés, el miedo, la percepción visual y la sincronización a la luz del ritmo de ingesta de agua?

3. HIPOTESIS

Se sabe que el Cd en el desarrollo provoca alteraciones celulares, fisiológicas e incluso conductuales entonces al administrar una dosis única de CdCl₂ en el día E14 (periodo donde se da la proliferación de las CGR y el desarrollo de la amígdala), en la progenie podrán observarse modificaciones morfológicas, así como efectos en la percepción y agudeza visual, en conductas relacionadas con el estrés, la ansiedad, el miedo y la sincronización a la luz del ritmo de ingesta de agua.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar si la administración aguda de Cd en el día E14, provoca efectos en la percepción visual, en las respuestas conductuales de estrés, de ansiedad, de miedo y genera deficiencias en la sincronización a la luz del ritmo de ingesta de agua en la progenie juvenil.

4.2 Objetivos específicos

Después de la administración aguda en el día E14.

En ratas machos y hembras desde el PN1-PN35:

1. Realizar un seguimiento del desarrollo postnatal (PN1-30)
2. Evaluar y determinar la percepción y agudeza visual (PN30-35).
3. Evaluar las conductas de exploración en campo abierto (PN30-35).

En ratas macho desde los 30 a los 90 días:

- Determinar si hay modificaciones en el ritmo de ingesta de agua.

- Determinar la sincronización a la luz del ritmo de ingesta agua.
- Determinar el consumo de agua y alimento.

5. METODOS

5.1 Animales, gestación y administración

Los animales que se utilizaron en este experimento fueron proporcionados por el bioterio de la Facultad de Ciencias, UNAM. Se emplearon seis ratas hembras adultas de la cepa *Sprague-Dawley*, de 4-5 meses de edad con un peso entre 260 y 280 g y tres machos de 3-5 meses con un peso de 250 a 320 g. Se determinó la fase del ciclo estral por medio de la técnica de frotis vaginales, en las fases del proestro y/o estro (en ésta última las hembras son receptivas al macho) (figura 9A), se colocaron en cajas de acrílico en una proporción de 2♀:1♂ para el apareamiento. Un día posterior a la cruce, se realizaron nuevamente los frotis vaginales para la búsqueda de espermatozoides, ante la presencia de éstos (figura 9B), se consideró que la hembra estaba gestante y a ese día se le asignó como embrionario 1 o E1.

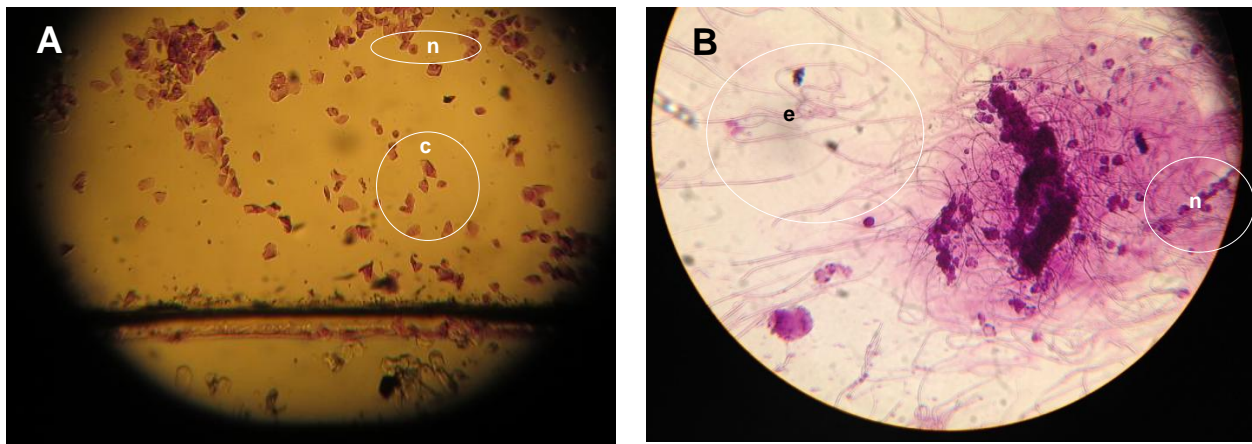


Figura 9. Determinación de las fases del ciclo estral mediante frotis vaginalis. A) Transición de proestro/estro, se observan células cornificadas (c) y nucleadas (n) (100x). B) Frotis vaginalis efectuado después de la cruce, se observan leucocitos (l) y espermatozoides (e) (200x). Las células se tiñeron con violeta de cresilo.

Aleatoriamente se seleccionaron tres ratas gestantes para el grupo control y tres para el grupo experimental. Cada rata se alojó en una caja de acrílico de 52x15x20 cm con

agua y alimento (LabChow, Purina 5008) *ad libitum*, con un fotoperiodo 12:12 donde el ZT0 (6am) correspondió al encendido y el ZT12 (6pm) al apagado de las luces.

En el día E14 tanto a las hembras gestantes del grupo control y del grupo experimental se les administró mediante una inyección intraperitoneal en el cuadrante inferior derecho de la región inguinal los siguientes tratamientos.

- Grupo control (Con): Se inyectó solución salina 0.1mL (vehículo) +0.9 mL de agua inyectable.
- Grupo experimental (Cd): Se inyectó CdCl₂ con una dosis de 1mg/kg peso corporal (pc) 0.1mL + 0.9 mL de agua inyectable.

5.2 Marcadores del desarrollo

El nacimiento de las crías ocurrió entre los días E21 y E23 (correspondiente al día postnatal 1 o PN1), se observó y registró si éstas presentaron alguna alteración teratogénica. Del día PN1 al día PN 30 se midió la longitud nasoanal (figura 10) y el peso corporal (pc), también se registró el día PN en el que se presentaron los siguientes marcadores del desarrollo: la aparición de las vibrisas, la separación de las orejas, la aparición de pelaje, la erupción de los dientes incisivos superiores e inferiores, la apertura del ojo izquierdo y derecho y el tiempo en el que comenzaron a caminar.



Figura 10. Foto que muestran el procedimiento para medir la longitud naso anal en los animales.

5.3 Percepción visual, ansiedad y estrés

Cuando las crías cumplieron entre 30 y 35 días fueron divididas en los siguientes grupos: ♂Con=18, ♀Con=12, ♂Cd=18, y ♀Cd=10), una vez teniendo éstos, se llevó a cabo la prueba de acantilado visual (modificado de Carr y McGuigan, 1965; Fox, 1965; y Baroncelli *et al*, 2013). Este dispositivo mide 69.3cm x 53cm x 17.5 cm (figura 11A) y consiste en un campo abierto dividido en tres zonas, el piso (*p*) formado por una plataforma de acrílico que tiene pegado un fondo de cuadrados (figura 11C), el abismo (*a*), es la continuación del acrílico, donde el fondo está pegado a la base del dispositivo de la plataforma y el riel (*r*), es la barrera visual que divide ambas zonas, tiene 5 cm de elevación. El piso y el abismo tienen sus respectivas orillas, orilla piso (*op*) y orilla abismo (*oa*) (figura 11B). Las pruebas de se llevaron entre el ZT 5 y ZT8, con luz blanca difusa (no es la luz total, 50lux).

Para las pruebas de percepción, agudeza visual, estrés, ansiedad y miedo, se efectuaron en los cuatro grupos dos ensayos, uno con riel (punto de inicio en el riel) y uno sin riel (punto de inicio en la orilla del piso) (figura 11B). Para determinar si las ratas tienen una buena percepción y agudeza visual mediante la percepción de la profundidad, se registró el tiempo de permanencia en cada una de las zonas, el número de entradas a cada zona, la latencia de entrada al abismo y a cada una de las zonas, considerando el paso de todo el cuerpo así como únicamente el paso de la cabeza del animal.

Para evaluar las respuestas de ansiedad y de estrés se registró el tiempo de congelamiento total del animal (es decir, que el animal estaba paralizado y no tenía movimiento) y en cada una de las zonas, la distancia total recorrida y en cada una de las zonas, la latencia de entrada de la cabeza al abismo, el número de veces que entró la cabeza a esa misma zona, además se contabilizó el número de micciones, de acicalamientos, de bolos fecales y se obtuvo un índice.

Para evaluar las respuestas de ansiedad y de estrés se registró el tiempo de congelamiento total del animal (es decir, que el animal estaba paralizado y no tenía movimiento) y en cada una de las zonas, la distancia total recorrida y en cada una de las zonas, la latencia de entrada de la cabeza al abismo, el número de veces que entró

la cabeza a esa misma zona, además se contabilizó el número de micciones, de acicalamientos, de bolos fecales y se obtuvo un índice.

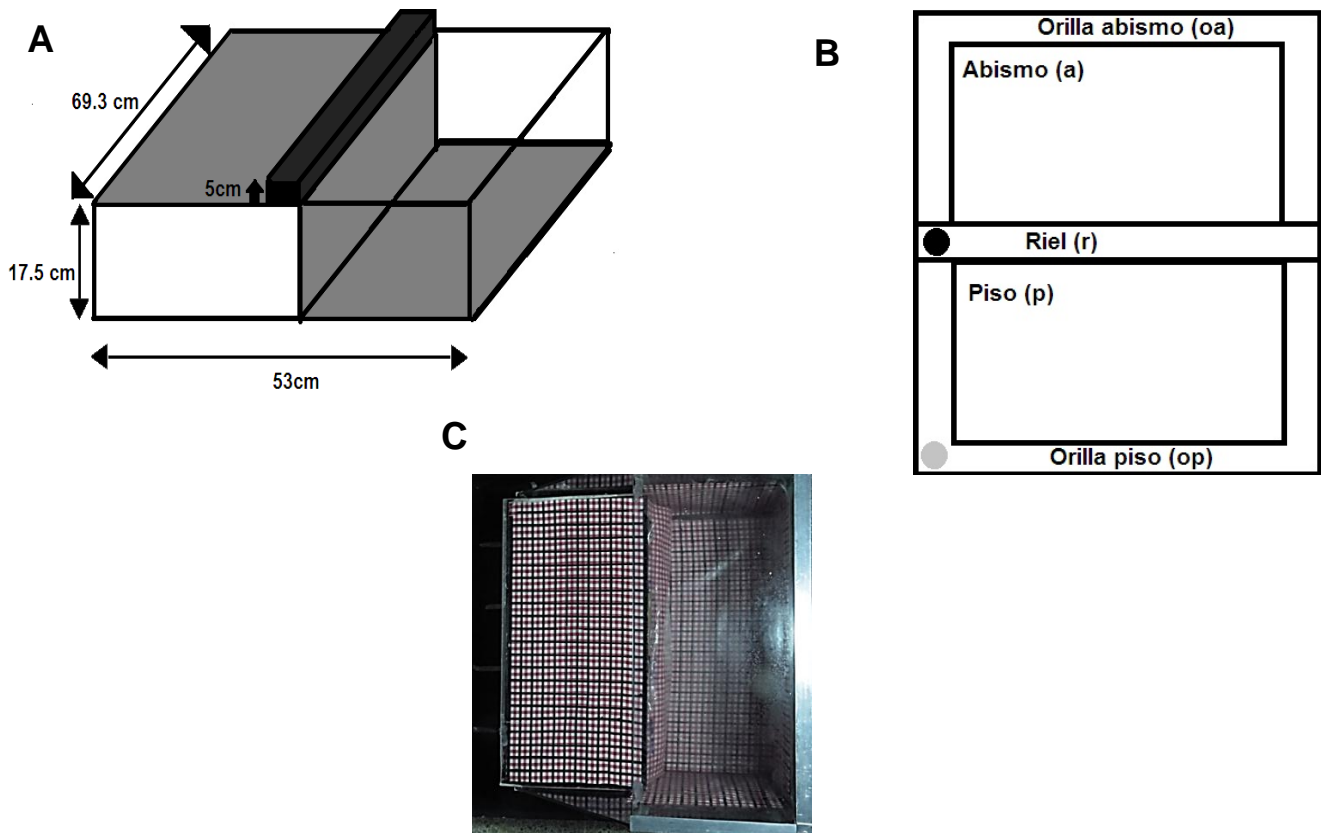


Figura 11. Acantilado visual A) se indican las medidas del dispositivo, el color gris representa el patrón. B) muestra las zonas que integran el laberinto, el punto negro es el punto de partida del ensayo con riel y el punto gris es el lugar de inicio del ensayo sin riel. C) Foto del dispositivo con el fondo de cuadrados.

5.4 Ritmo de ingesta de agua, parámetros y sincronización

Posterior a la prueba del acantilado visual los machos fueron divididos en dos grupos: Con (n=4) y Cd (n=4). Se registró el ritmo de ingesta de agua, los animales de ambos grupos pasaron por diferentes condiciones de iluminación: Luz/Oscuridad (LO) durante 7 días con encendido y apagado de luces ZT 0 (7am) y ZT12 (7pm) respectivamente, oscuridad constante (OO) (15 días), Luz/Oscuridad (LO2) (15 días) con encendido y apagado de ZT 0 (7am) y ZT12 (7pm), y por último se llevó a cabo una condición de Luz/Oscuridad donde se atrasó el encendido de las luces de 6 y 10 horas (1 mes) con

encendido y apagado de las luces de ZT 0 (1pm) y ZT12 (1am) ó ZT 0 (4pm) y ZT12 (4am) (figura 12). El registro se hizo con el software de Actibio y con focos a una intensidad de luz de 148 lux. Una vez que concluyó el registro circadiano bajo diferentes condiciones de iluminación, se obtuvo el índice alpha/rho (el cuál mide la cantidad de actividad/reposo) de los últimos 5 días de la condición de LO2. Durante el protocolo de registro circadiano se midió el consumo semanal de agua y alimento.

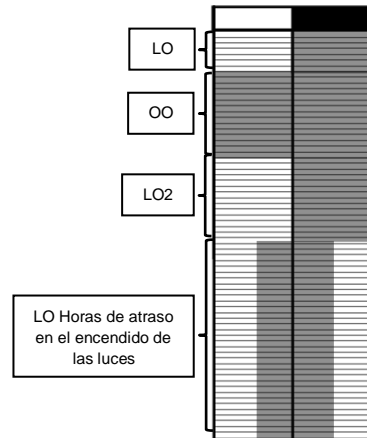


Figura 12. Esquema que muestra las diferentes condiciones de luz a lo largo del tiempo de registro: LO (7 días), OO (15 días), LO2 (15 días) y LO con atraso (1 mes).

5.5 Análisis estadísticos

Los datos obtenidos de talla y peso se normalizaron para ser analizados con una prueba de ANOVA de dos vías, comparando ambos grupos por día. Para los marcadores del desarrollo se calculó un índice (Índice= n/N , donde n es el número de animales que presentaron ese marcador para ese día postnatal y N el total de animales de cada grupo) y posteriormente se realizó una prueba de X^2 comparando el número de animales que presentaron ese marcador, en ese día.

Para las pruebas de percepción visual, se utilizó una ANOVA de dos vías y se compararon los individuos de cada grupo. ♂Con vs ♂Cd vs ♀Con vs ♀Cd, en el ensayo con riel y sin riel, de esta misma manera se evaluaron algunas conductas de estrés y de ansiedad. Por otro lado, para las conductas de defecación, micción y acicalamiento, se obtuvo un índice (Índice= $n/N \times 100$, donde n es el número de animales que presentaron

esa conducta y N el total de animales de cada grupo) y posteriormente se realizó una χ^2 .

Para la sincronización a la luz del ritmo de ingesta de agua se obtuvo el número de días transitorios existentes de la condición de OO a LO2 y de LO2 a LO con retraso en el encendido de las luces, con los días contados se realizó la prueba estadística *t* de *Student* no paramétrico. Por último se obtuvieron periodogramas de los últimos 5 días de cada condición y se hizo una gráfica, donde se distribuyeron los mismos.

Para el análisis de alpha/rho, se obtuvo el índice de los últimos 5 días de la condición LO2, para los 4 animales del grupo Con y del grupo Cd y se compararon con una *t* de *Student* no paramétrica.

Para conocer si la administración prenatal de Cd generó modificaciones en la composición homeostática, se hizo una *t* de *Student* no paramétrica, comparando el consumo semanal de agua y de alimento.

6. RESULTADOS

6.1 Desarrollo

6.1.1 Talla y peso

En la figura 13, se observa que la talla naso-anal por día de las crías (machos y hembras) del PN1-30 es diferente en algunos días después del nacimiento, entre ambos grupos, los animales del grupo control son más grandes que los experimentales. Se utilizó la prueba estadística ANOVA de dos vías y arrojó que en ambos grupos, en los días PN 3, 7, 8, 9, 16, 17, 28, 29 y 30 (valor de $p < 0.04$) son significativamente diferentes.

En la figura 14 se observa el peso por día de las crías (machos y hembras) del grupo control y del grupo experimental del PN1-30, se comparó el peso de los animales por día de ambos grupos con una ANOVA de dos vías. La prueba indicó que si hay diferencias estadísticamente significativas, en el grupo Con se observó una mayor masa corporal en los días PN 20, 24, 27, 28, 29 y 30 (valor de $p < 0.05$).

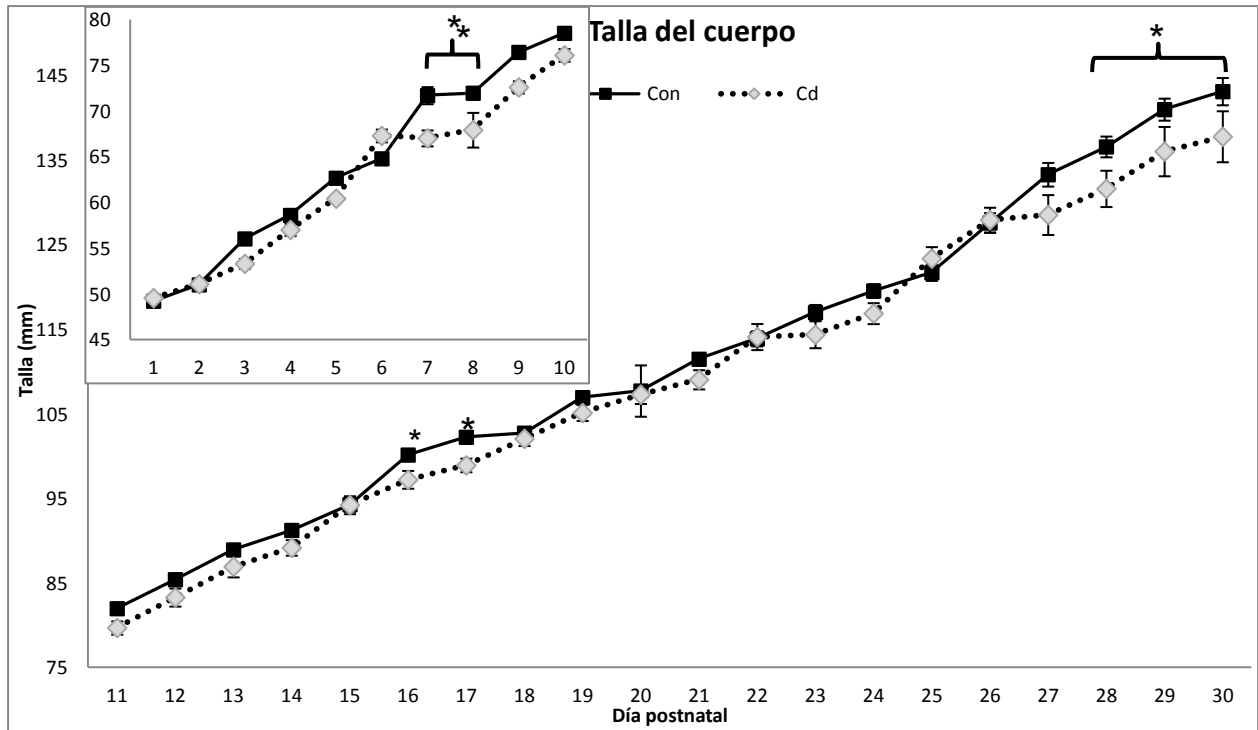


Figura 13. Gráfica que muestra el promedio la talla naso-anal de los animales Con (■) y Cd (□). PN3 $p=0.017$, PN7 $p=0.0035$, PN 8 $p=0.0073$, PN9 $p=0.0080$, PN17 $p=0.0374$, PN28 $p=0.0015$, PN 29 $p=0.0040$ y PN30 $p=0.0045$ Los datos muestran promedios \pm error estándar de la media, * $p<0.05$.

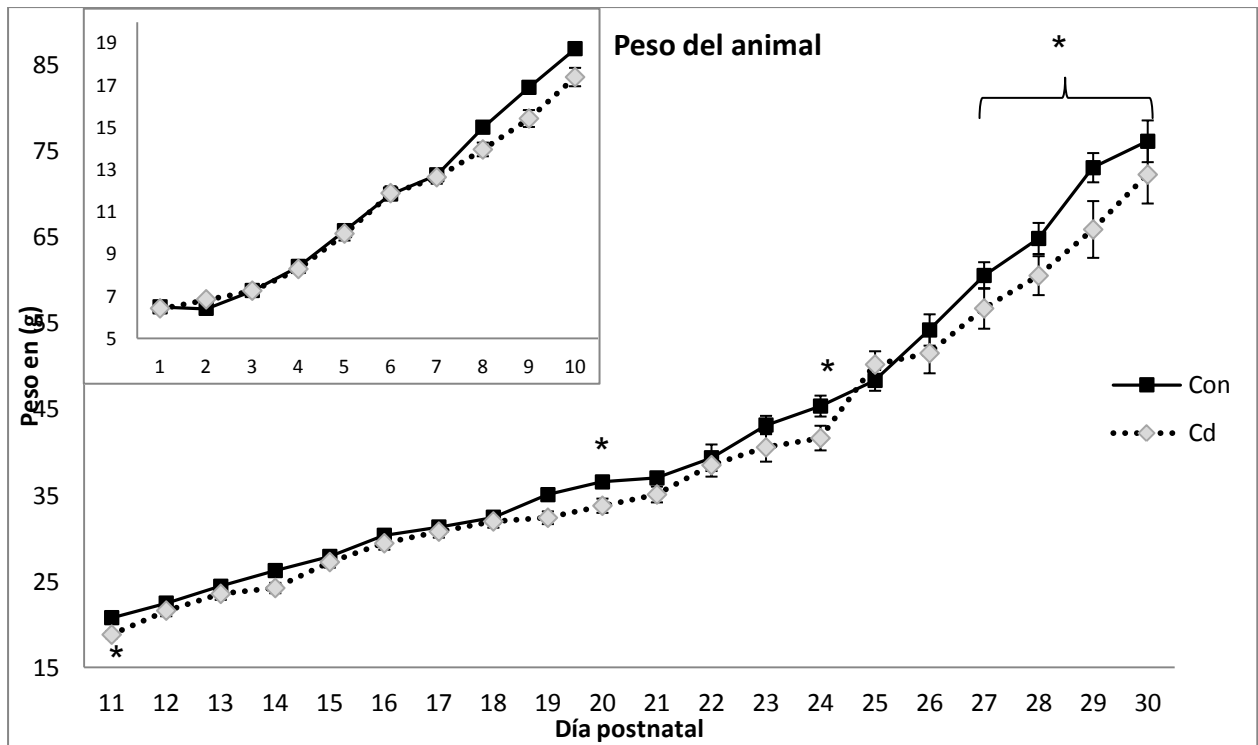


Figura 14. Gráfica que muestra el promedio de la masa corporal de los animales de (■) y Cd (□). PN20 $p=0.0057$, PN24 $p=0.0048$, PN27 $p=0.0157$, PN28 $p=0.0029$, PN29 $p<0.0001$ y PN30 $p=0.0147$. Se presentan promedios \pm error estándar, * hay diferencias estadísticamente significativas.

6.1.2 Marcadores del desarrollo

Se registraron los marcadores e índices del desarrollo en los primeros días de vida de las crías en ambos grupos, se evaluó si se presentaron en diferentes días entre ambos grupos con una X^2 (tabla 2). En ésta se puede observar el evento del desarrollo, el día en que se presentó, el número de individuos en los cuales se observó ese evento, el total de animales registrados en ese evento (el número encerrado entre paréntesis).

Tabla 2. Índices de los marcadores del desarrollo para el grupo control y el experimental (índice=n/N dónde n es el número de animales que presentaron ese evento en ese día, y N el total de animales. Se hizo una X^2 y se obtuvieron los valores de P), los datos señalados en negritas son significativos.

Evento	Día	C O N		C D		X ² Valor P
		No. de individuos	Índice	No. de individuos	Índice	
Vibrisas	1	51(51)	1	48(48)	1.00	
Separación de la oreja	3	13(20)	0.65	4(14)	0.29	0.0057*
	4	0(20)	0.00	10(14)	0.71	<0.0001*
	5	7(20)	0.35	0(14)	0.00	0.013*
Aparición de pelaje	4	7(32)	0.22	14(34)	0.41	0.224
	5	18(32)	0.56	8(34)	0.24	0.0721
	6	7(32)	0.22	0(34)	0.00	0.0094*
	7	0(32)	0.00	12(34)	0.35	0.0017*
Erupción incisivos superiores	7	4(33)	0.12	0(16)	0.00	0.1714
	8	6(33)	0.18	6(16)	0.38	0.262
	9	15(33)	0.45	1(16)	0.06	0.0369*
	10	8(33)	0.24	9(16)	0.56	0.1379
Erupción incisivos inferiores	8	3(30)	0.10	3(8)	0.38	0.1281
	9	11(30)	0.37	0(8)	0.00	0.0962
	10	0(30)	0.00	5(8)	0.63	0.0003*
	11	16(30)	0.53	0(8)	0.00	0.0468*
Apertura del ojo derecho	14	1(36)	0.03	0(28)	0.00	0.3807
	15	11(36)	0.31	6(28)	0.21	0.63
	16	18(36)	0.50	22(28)	0.79	0.2639
	17	6(36)	0.17	0(28)	0.00	0.0365*
Apertura del ojo izquierdo	15	10(31)	0.32	8(29)	0.28	0.772
	16	17(31)	0.55	21(29)	0.72	0.5037
	17	4(31)	0.13	0(29)	0.00	0.0601
Caminar	15	19(33)	0.58	7(29)	0.27	0.084
	16	4(33)	0.12	15(29)	0.58	0.0138*
	17	6(33)	0.18	4(29)	0.15	0.6899
	18	4(33)	0.12	0(29)	0.00	0.0677

En la aparición de las vibrisas no hay diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

En la separación de las orejas, se observa que en el grupo control el mayor índice de animales que presentan ese evento fue en el día PN3, mientras que en el

grupo experimental el mayor índice de este evento es en el día PN4, retraso de un día y el periodo en que se desarrolla el marcador, se ve reducido a dos días (Anexo 1).

En la aparición del pelaje, el índice máximo de este evento fue en el día PN5 en el grupo control, mientras que en el grupo experimental, fue el día PN4, con un día de adelanto (Anexo 2), aunque la prueba estadística no indicó diferencias significativas. Además se puede observar que el periodo en el que se desarrolló dicho marcador es de tres días para el grupo control y de cuatro días para el grupo experimental.

En el marcador de la erupción de dientes incisivos superiores, para el grupo control y el grupo experimental el índice máximo se dio en los días PN9 y PN10 respectivamente, mostrando este último un día de retraso (Anexo 3). El periodo en el que se desarrolló el marcador es 4 días para el grupo control y 3 días para el grupo experimental.

En la erupción de dientes incisivos inferiores, se observó el mayor índice en el día PN11 para el grupo control, mientras que para el grupo experimental fue el día PN10, con un día de adelanto (Anexo 4). En ambos grupos el evento del desarrollo presenta un periodo de 4 días.

Para la apertura del ojo derecho en ambos grupos, el máximo índice fue en el día PN16. El periodo de este marcador, es de 4 días para el grupo control, mientras que para el grupo experimental se desarrolla únicamente en 2 días (Anexo 5). Mientras que en la apertura del ojo izquierdo, no se encontraron diferencias significativas en los índices por día (Anexo 6). En ambos grupos su periodo duró 3 días aproximadamente.

Para el caso del tiempo para empezar a caminar, se observó el máximo índice en el día PN15 en el grupo control y en el PN16 en el grupo experimental, presentando este último un día de retraso, además el periodo fue de 4 y de 3 días respectivamente (Anexo 7).

6.2 Agudeza y percepción visual

Para evaluar la percepción visual se utilizó el dispositivo de acantilado visual, en éste se determinó el tiempo de permanencia en cada zona de los animales de cada grupo. En la zona del abismo (a) se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el

ensayo con riel, donde los machos control, permanecieron más tiempo en esta zona, ♂Con vs ♂Cd $p=0.0159$, las hembras de ambos grupos permanecieron un tiempo similar, debido a que no existen diferencias (figura 15A). En la orilla del abismo (*oa*) los animales de ambos grupos, permanecieron un tiempo similar (figura 15B).

En la zona piso (*p*) del laberinto, los machos Con, permanecieron más tiempo que los machos Cd, la ANOVA de dos vías arrojó diferencias estadísticamente significativas en el ensayo sin riel, ♂Con vs ♂Cd $p=0.0392$ (figura 15C), caso que no sucedió con las hembras En la orilla del piso (*op*), los animales de ambos grupos permanecieron un tiempo similar, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (figura 15D). El tiempo de permanencia en la zona riel, sólo se midió para el ensayo que tuvo éste, donde los machos experimentales estuvieron más tiempo en esa zona (♂Con vs ♂Cd $p= 0.0293$), mientras que para las hembras de ambos grupos mantuvieron tiempos de permanencia similares, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

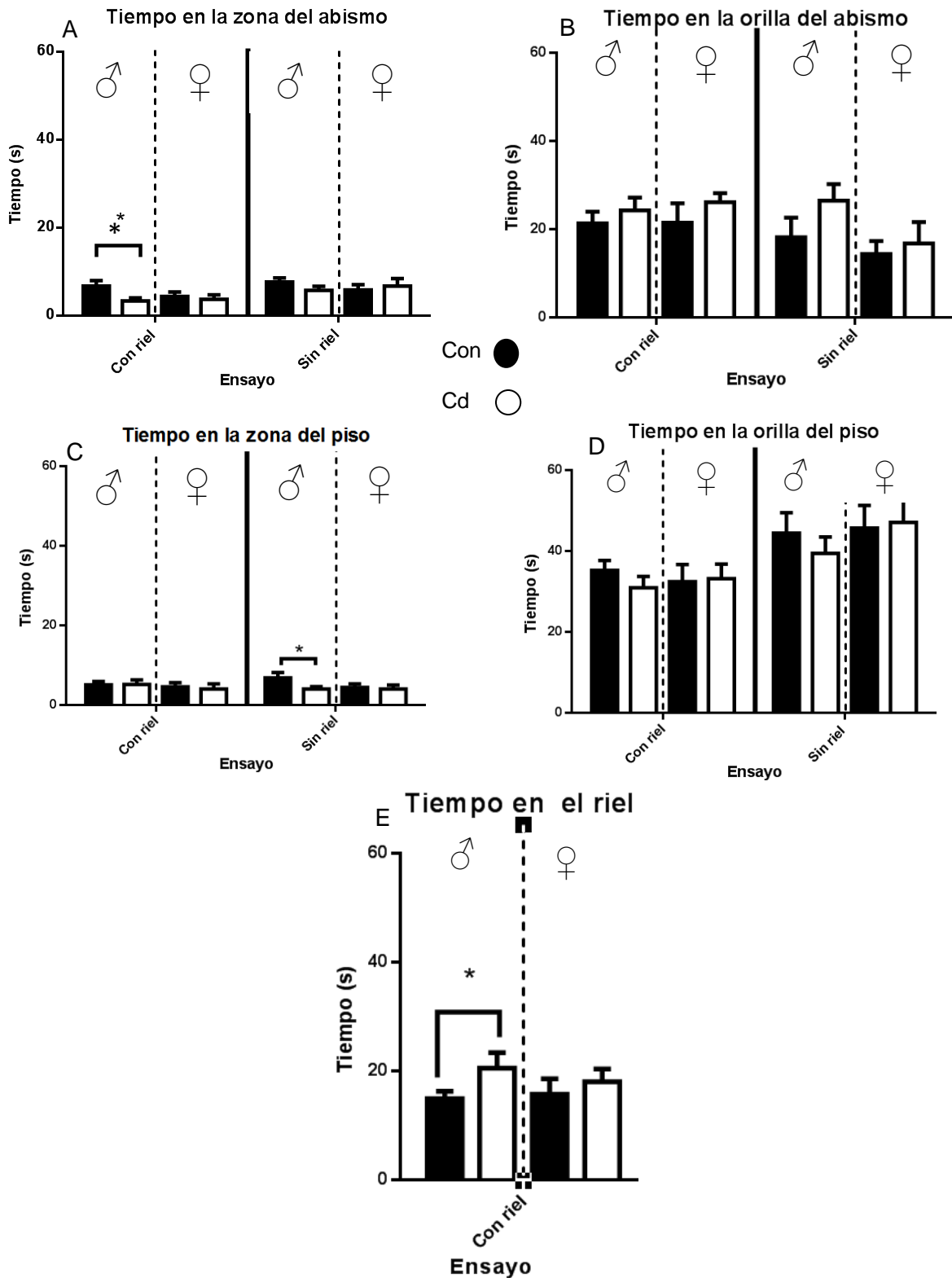


Figura 15. ANOVA de dos vías. Tiempo de permanencia de los animales del grupo control y del grupo experimental en cada una de las zonas del laberinto: A) Zona a (centro), ensayo con riel ♂Con vs ♂Cd con una $p= 0.0159$. B) Oa. C) Zona p, ensayo sin riel ♂Con vs ♂Cd con una $p= 0.0392$. D) Op. E) Riel, únicamente el ensayo con riel, ♂Con vs ♂Cd con una $p= 0.0293$. Los datos que se muestran son los promedios \pm error estándar de la media * hay diferencias estadísticamente significativas.

Otra de las respuestas que se midió para determinar la percepción visual, fue la latencia de entrada a la zona *a* y *oa*. En la zona *a* la latencia de entrada es similar en el ensayo con riel y sin riel para ambos grupos (figura 16A), sin embargo, si se observan diferencias estadísticamente significativas entre ensayos, puesto que los animales (machos y hembras) en el ensayo con riel su latencia es mayor para entrar al abismo, con respecto al ensayo sin riel, lo cual podría indicar que el riel tiene un papel fundamental para la agudeza visual. Mientras que en la latencia de entrada a *oa* (figura 16B) es similar entre los animales control, respecto a los experimentales, así mismo comparándolo con el ensayo sin riel, debido a que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos .

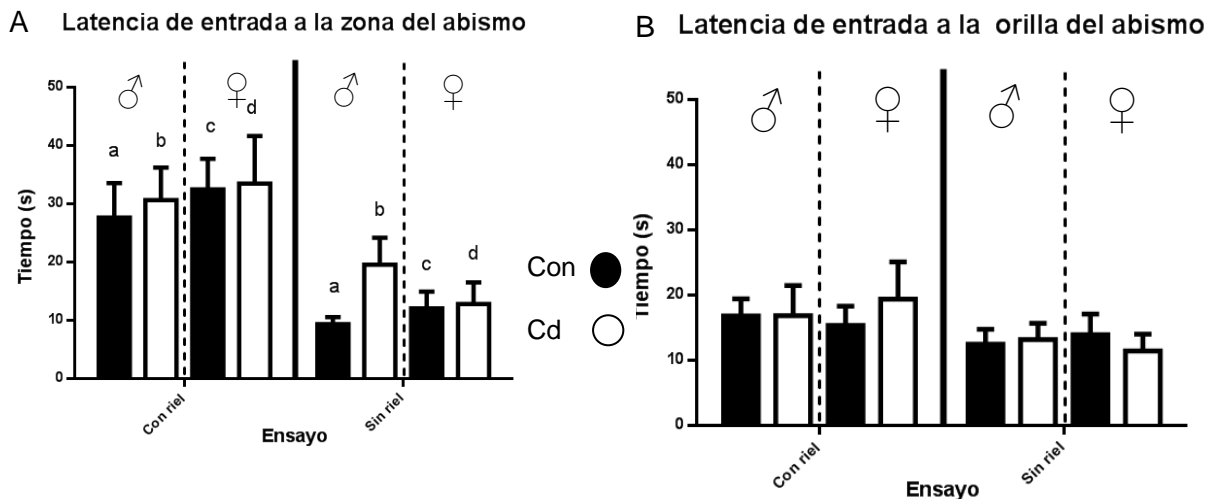


Figura 16. ANOVA de dos vías. Latencia de entrada de los animales del grupo control y del grupo experimental a las diferentes zonas. A) La zona abismo, hay diferencias estadísticamente significativas entre los ensayos, **a, b, c, y d** indican que hay diferencias entre ensayos: ♂Con/riel vs ♂Con/sin riel con una $p= 0.0045$; ♀Con/riel vs ♀Con/sin riel $p=0.0105$ y ♀Cd/riel vs ♀Cd/sin riel $p=0.0161$. B) La orilla del abismo no existen diferencias estadísticamente significativas. Los datos que se muestran son los promedios \pm error estándar de la media, * hay diferencias estadísticamente significativas.

Por otro lado para determinar la percepción visual y evaluación de riesgo dentro del laberinto, se evaluó la latencia de entrada únicamente de la cabeza a la zona *a* y *oa*, además el número de veces que la cabeza del animal entro en *a*. En el tiempo de latencia de entrada de la cabeza de los animales de ambos grupos en *a* (figura 17 A), únicamente en el ensayo con riel, se observa que los machos experimentales aumentaron esta conducta, mientras que las hembras de ese mismo grupo la

disminuyeron. La prueba de ANOVA de dos vías arrojó que existen diferencias estadísticamente significativas para ♂Con vs ♂Cd $p=0.0404$ y ♀Con vs ♀Cd $p=0.0165$. Mientras que la latencia de entrada de la cabeza y el número de entradas de la cabeza (figura 17B y figura 17C respectivamente) en oa, los animales de ambos grupos en los dos ensayos los resultados son similares.

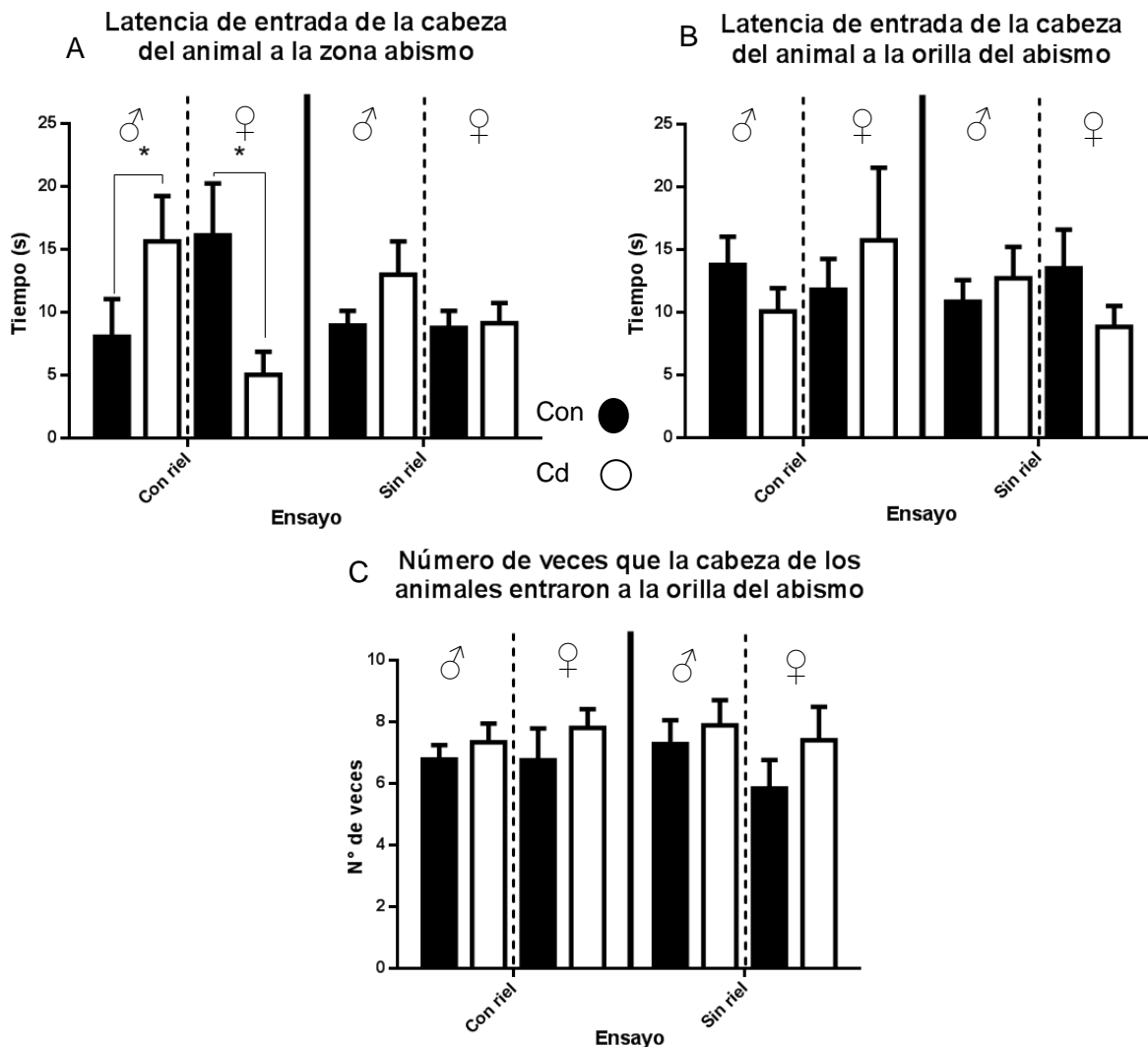


Figura 17. ANOVA de dos vías. Latencia de entrada de la cabeza de los animales de ambos grupos en dos ensayos, con riel y sin riel. A) Zona abismo hay diferencias estadísticamente significativas: ♂Con vs ♂Cd $p=0.0404$, ♂Cd vs ♀Cd $p=0.0125$ y ♀Con vs ♀Cd $p=0.0165$. B) La orilla del abismo existen estadísticamente significativas. C) Número de veces que la cabeza de los animales de ambos grupos entró a la orilla del abismo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas. Los datos que se muestran son los promedios \pm error estándar de la media, * hay diferencias estadísticamente significativas.

6.3 Ansiedad, estrés y miedo

Para conocer si los animales de cada grupo presentaron estrés en las pruebas de campo abierto, se midieron diferentes parámetros como la distancia, el tiempo de congelamiento total y en cada una de las zonas. Además se realizó un índice a partir de las respuestas emocionales que mostraron los animales (hacer micciones, defecar y acicalarse) en este laberinto. Dicho índice se obtuvo mediante la siguiente fórmula: número de animales que presentaron esa conducta (n), entre el total de animales a los cuales se les aplicó la prueba (N); índice=n/N.

En el tiempo total de congelamiento se observó que los animales del grupo experimental permanecieron menos tiempo “paralizados”, esto lo corroboró la prueba estadística indicando que hay diferencias estadísticamente significativas en el ensayo con riel, para ♂Con vs ♂Cd $p=0.0369$ y ♀Con vs ♀Cd $p=0.0078$; mientras que en el ensayo sin riel ♂Con vs ♂Cd $p=0.0297$ y ♀Con vs ♀Cd $p=0.0166$ (figura 18A). En el tiempo de congelamiento por zona, se encontró que hay diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el experimental en el ensayo con riel y sin riel en *a* (Anexo 8), en *oa* (Anexo 9), en *p* (Anexo 10) y en *op* (Anexo 11).

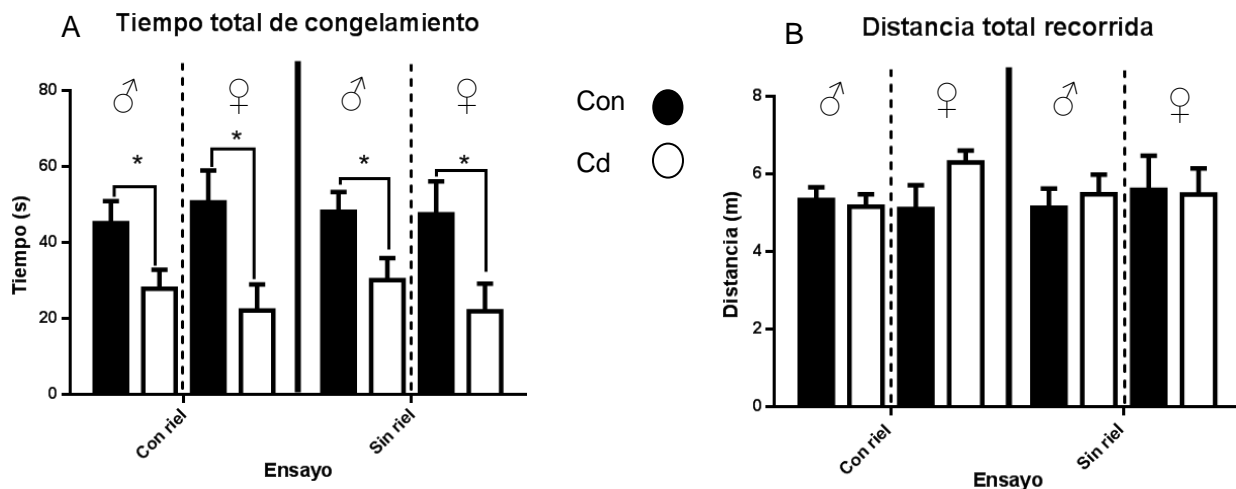


Figura 18. ANOVA de dos vías. A) tiempo total de congelamiento de los animales de ambos grupos en dos ensayos, con riel para ♂Con vs ♂Cd con una $p=0.0369$, ♀Con vs ♀Cd con una $p=0.0078$; mientras que en el ensayo sin riel ♂Con vs ♂Cd hay una $p=0.0297$ y finalmente ♀Con vs ♀Cd con una $p=0.0166$. B) Distancia total recorrida. Los datos que se muestran son los promedios \pm error estándar de la media, * hay diferencias estadísticamente significativas.

Acerca de la distancia recorrida y la total, los animales de ambos grupos tuvieron distancias similares en los dos ensayos, la ANOVA de dos vías no mostró diferencias estadísticamente significativas en el total (figura 18B), ni en las zonas: *a* (Anexo 12), en *oa* (Anexo 13), *p* (Anexo 14), en *op* (Anexo 15), sin embargo, si existen diferencias estadísticamente significativas en el riel (Anexo 16).

Con respecto a las respuestas emocionales observadas en la prueba del acantilado visual, fungiendo como un campo abierto, se evaluaron únicamente por grupo (sin distinción de machos y hembras), resultado que en el ensayo con riel, las conductas examinadas de ambos grupos presentan índices similares, mientras que en el ensayo sin riel, el índice de bolos fecales, aumenta en el grupo Con ($p=0.0268$) (figura 19).

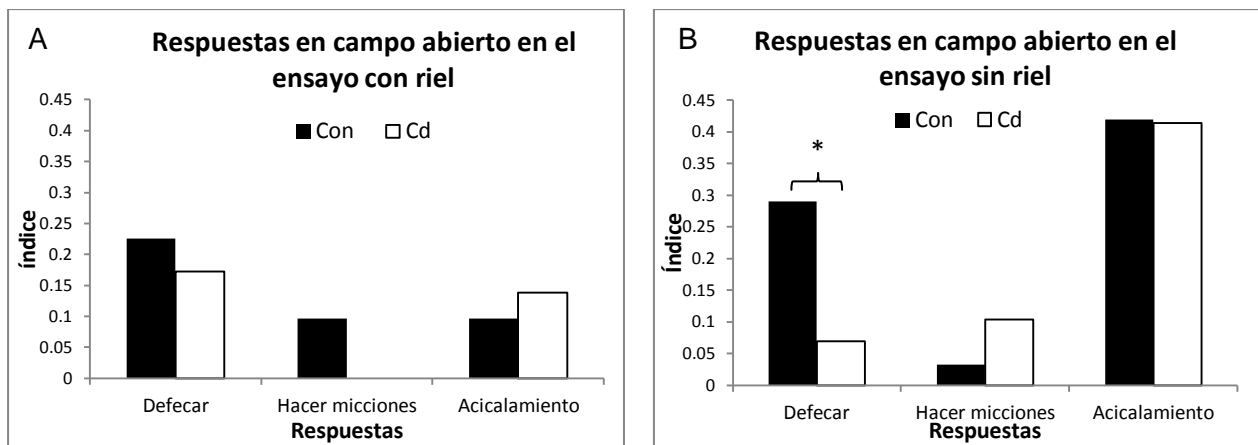


Figura 19. Índices de los animales (machos y hembras) que presentaron las respuestas de bolos fecales, micciones y acicalamiento, en la prueba de campo abierto, A) ensayo con riel, B) ensayo sin riel, se puede visualizar que existen diferencias estadísticamente significativas en el índice de los bolos fecales, donde el grupo Con presenta un mayor índice (0.29) al grupo Cd (0.06), $X^2 p= 0.0268$, * hay diferencias estadísticamente significativas.

6.4 Ritmo ingesta de agua y su sincronización.

En el ritmo de ingesta de agua se evaluó cada uno de sus componentes y el periodo de los mismos, bajo las diferentes condiciones de iluminación: LO, OO, LO2 y LO con atraso de encendido de las luces. Bajo la condición LO, los periodos duran 24 horas aproximadamente (figura 20A), bajo ausencia de luz el periodo circadiano del ritmo no desaparece (figura 20C) su oscilación dura alrededor de las 24 horas, que indica el periodo endógeno del ritmo y que no se vio afectado, en el caso de la LO2, se observa

que la duración del periodo va de las 22 a las 26 (figura 20C) y en LO con atraso de encendido de luz, el periodo está marcado en 24 horas, para ambos grupos (figura 20D). En todas las condiciones se pueden observar armónicos (es decir elementos o componentes, que forman parte de la oscilación) cuya duración es de 4-8 horas aproximadamente.

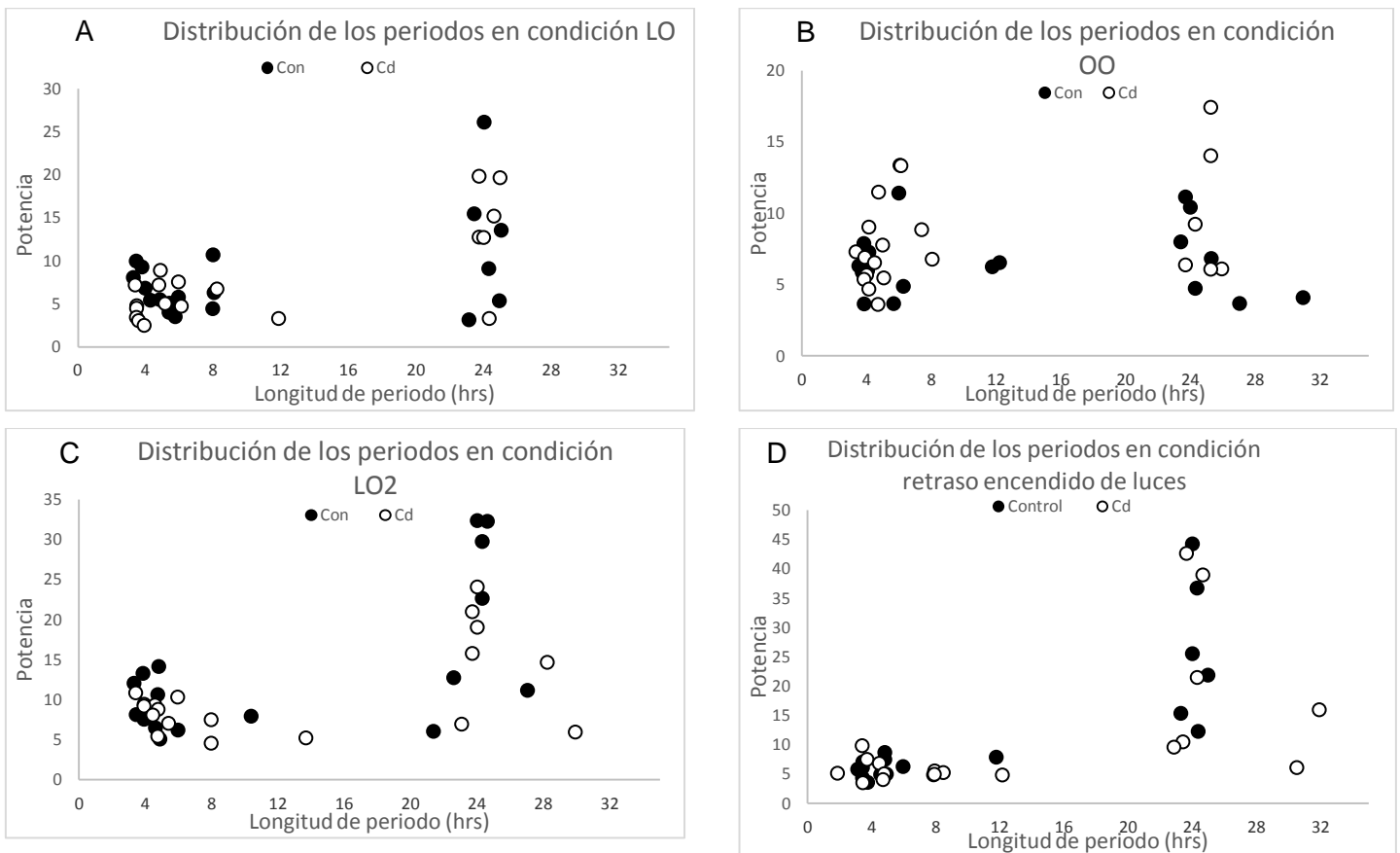


Figura 20. Potencias de los diferentes componentes del ritmo de ingesta de agua, sus longitudes de periodo y su distribución, en las diferentes condiciones de luz A) LO, B) OO, C) LO2 y D) atraso del encendido de las luces. En las cuatro condiciones se puede observar que existen componentes alrededor de las 24 hrs, lo que indica de un periodo circadiano.

Por otro lado, se presentan dos actogramas representativos del ritmo de ingesta de agua, uno de un animal del grupo Con (figura 21A) y otro de un animal del grupo Cd (figura 21B), bajo las diferentes condiciones de iluminación, se observa claramente como los animales de ambos grupos se sincronizaron al cambio del encendido y apagado de luces, 6/18 hrs (condiciones de bioterio) a 7/19 hrs (primeros 7 días) respectivamente, posteriormente ante la condición constante (15 días) su ritmo entró en

libre corrimiento, es decir, se expresó la duración de su periodo endógeno, éste dura más de 24 horas, debido a que al pasar los días, la actividad inicia después, lo que habla de un retraso de inicio de fase. Al regresar al fotoperiodo anterior (15 días), los animales lograron sincronizarse los primeros días, en esta condición se pueden observar los transitorios (días que tarda en sincronizarse a una nueva condición de iluminación), de esta manera se puede decir que el ritmo está sincronizado con el encendido/apagado de las luces, y por último, cuando se retrasó el encendido de las luces (en los actogramas representativos fueron 6 horas), los animales tuvieron transitorios los primeros días, casi al terminar el registro, el ritmo de ingesta de agua está sincronizado, el mayor consumo se da en la escotofase (en el anexo 17A, B, C, D, E y F, se pueden observar los actogramas de todos los animales que se estuvieron bajo registro del ritmo de ingesta de agua).

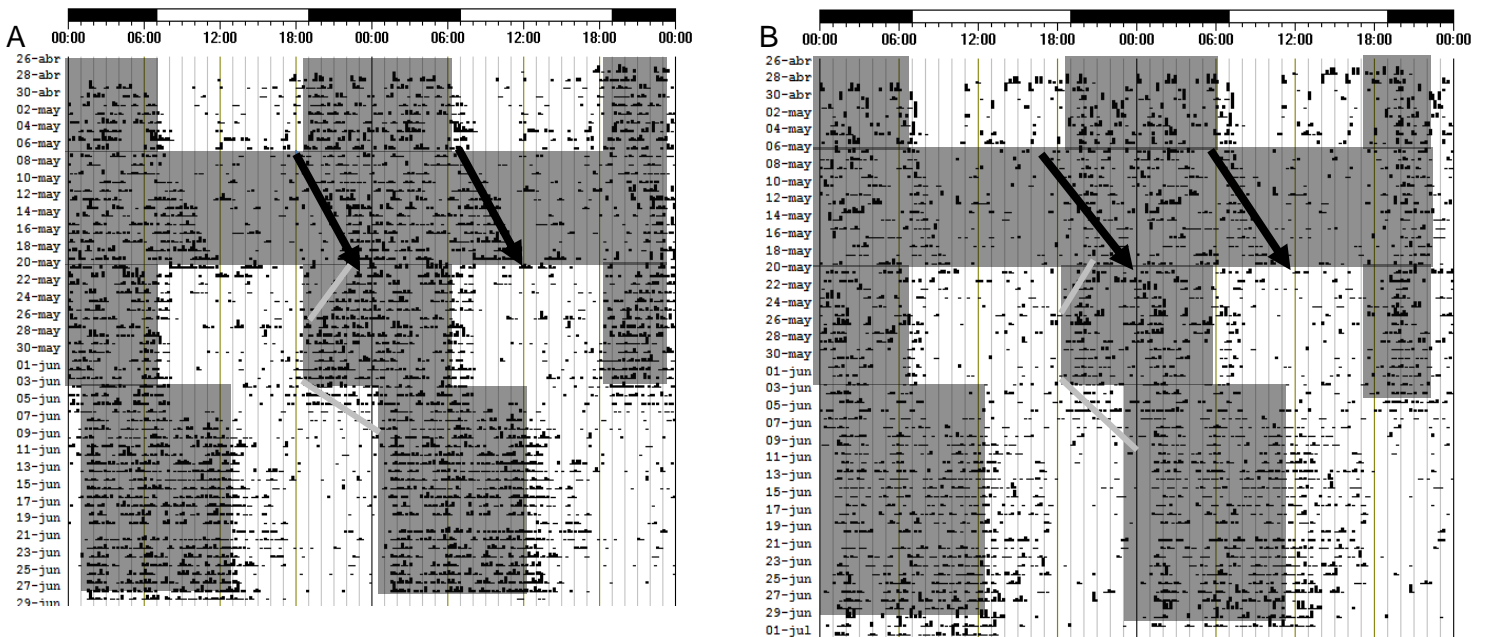


Figura 21. Actogramas representativos del ritmo de ingesta de agua A) control y B) experimental, bajo diferentes condiciones de luz, LO (7 días) con encendido y apagado de luces 7:19, OO (15 días), LO (15 días) con encendido y apagado de 7:19 y retraso del encendido de las luces con 6 horas de atraso (15 días) con encendido y apagado de las luces de 13 a 1 (la zona sombreada corresponde a la escoto fase líneas grises son los transitorios y flechas negras muestran el libre corrimiento del ritmo).

Para la sincronización del ritmo de ingesta de agua, se contabilizaron los días transitorios existentes entre el final de la condición de luz hasta que el ritmo fue estable en la nueva condición. De OO/LO2, el grupo control presentó un promedio de 7 días

± 0.70 mientras que el experimental, una media de 9.25 días ± 0.45 y ambos tienen una $p=0.0388$, esto indica que a los animales del grupo experimental les toma aproximadamente de un día y medio a dos a sincronizarse a un nuevo fotoperiodo (figura 22A). De la condición LO2/LO 6-10 horas de retraso del encendido de las luces, el grupo control presentó una media de 8 días ± 0.40 y para el grupo experimental 9.25 días ± 0.25 con una $p=0.0401$, es decir que para la condición de iluminación donde se retrasó el encendido de las luces, los animales experimentales requirieron de al menos un día más para sincronizarse (figura 22B).

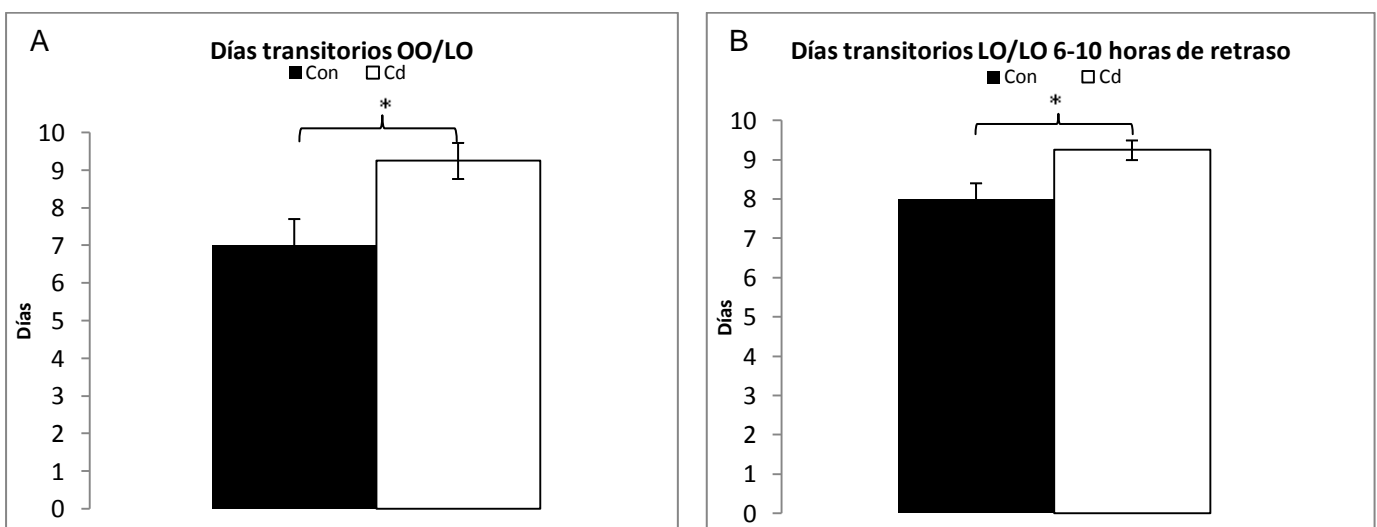


Figura 22. Días transitorios que tardaron los animales en volver a sincronizar el ritmo de ingesta de agua después de finalizar una condición de luz. A) De Oscuridad constante a luz oscuridad (OO/LO2) con diferencias estadísticamente significativas, $p= 0.0388$ y B) de Luz Oscuridad 2 a Luz Oscuridad con 6 horas de retraso en el encendido de las luces, $p=0.0401$, * hay diferencias estadísticamente significativas.

Por otro lado se obtuvo el índice de la relación α/ρ del ritmo de ingesta de agua en condición LO2 12:12 con el encendido y apagado de las luces de 7/19 hrs respectivamente. En la prueba de t de *Student* no se obtuvieron diferencias significativas (figura 23), lo cual explica que los animales de ambos grupos son nocturnos y que el ritmo no se vio modificado por la administración prenatal de Cd debido a que tiene actividad en el día, pero el mayor consumo se llevó a cabo en la escotofase.

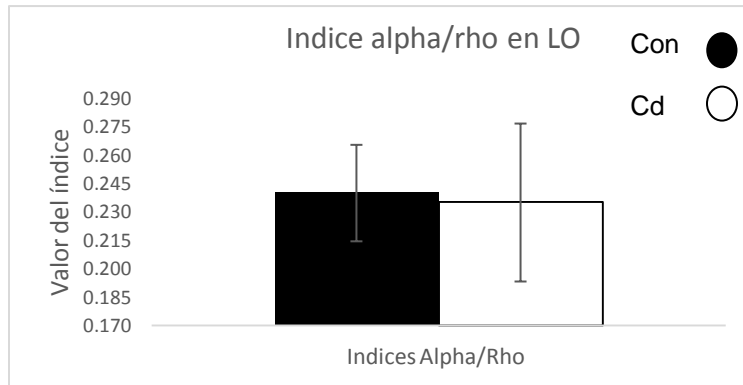


Figura 23. Promedios del índice de la relación alpha/rho en el grupo control y experimental, con un error estándar de la media de 0.025 y 0.041 respectivamente, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Los datos que se muestran son los promedios \pm error estándar de la media.

Para determinar si el cadmio modificó el consumo de agua y de alimento, se midieron éstos a lo largo de las semanas de registro del ritmo de ingesta de agua, a medida que crecieron los animales, tuvieron un requerimiento mayor de agua, sin embargo, al comparar ambos grupos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (figura 24).

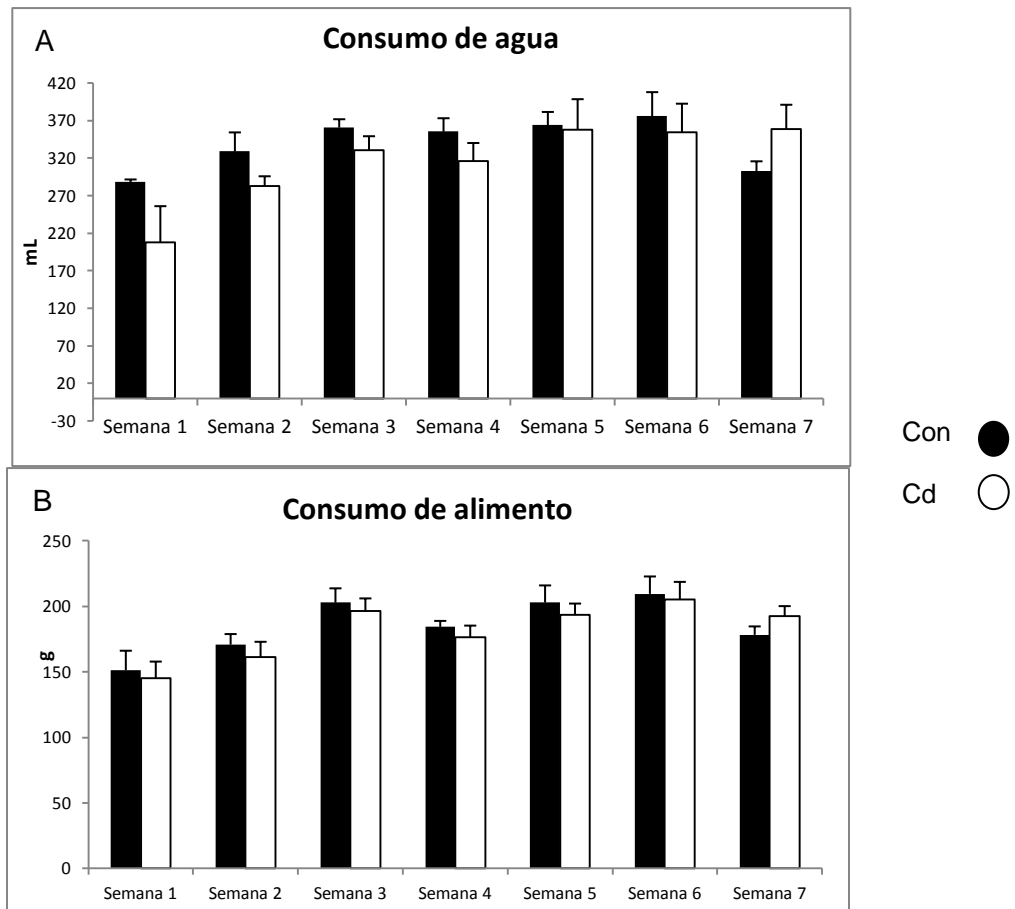


Figura 24. Consumo de A) agua y B) alimento durante 7 semanas de registro circadiano. Los datos que se muestran son los promedios \pm error estándar de la media.

7. DISCUSIONES

7.1 Efectos del Cd en el desarrollo y estado temprano de la rata.

En el trabajo presentado no se encontraron malformaciones teratogénicas en el cuerpo de las crías, lo cual indica que la dosis utilizada de Cd no las generó, estos hallazgos coinciden con los resultados encontrados en el estudio de Samarawickrama y Webb (1979), en este trabajo ellos determinaron que una dosis con concentración de 1.1 mg/kg pc no resultó ser letal, cosa que si lo fue una concentración igual o mayor a 1.35 mg/kg pc. Posteriormente en 1981, estos mismos autores administraron de manera aguda varias dosis en varios grupos dependiendo su condición (nulliparas, ratas viejas, lactantes, preñadas en varios días embrionarios) de esta manera conocerían la dosis letal al 50% (LD_{50}). En ratas gestantes de 12-16 días la LD_{50} que les correspondió fue de 2.5 mg/kg pc, por lo cual indujeron que para evaluar los efectos de Cd, sin ser letal en ratas gestantes durante esos días, la dosis tuvo que ser la mitad de la LD_{50} es decir de 1.25 mg/kg pc, con la misma observaron mayor número de malformaciones teratogénicas y mientras se acercaban al día PN 16, aumentaba el porcentaje de crías muertas al nacer.

Por otro lado, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo experimental en la talla (figura 13), en el peso (figura 14) en algunos días posnatales y en diversos marcadores del desarrollo tales como la separación de la oreja, la aparición de pelaje, la erupción de incisivos superiores, la apertura del ojo derecho y el tiempo para empezar a caminar (Tabla 2), quizá estas alteraciones sean causadas por el Cd que ingresó durante el desarrollo. Samarawickrama y Webb (1979) en su trabajo describen que después de una administración aguda de Cd con una dosis de 1.25 mg/kg pc en el día E12, el metal pesado se puede observar en la sangre de la madre 4 y 24 horas posteriores a la inyección, el Cd está en menor porcentaje con respecto a lo inyectado, ellos asumieron que el metal pesado puede bioacumularse en el cuerpo de la madre, en algunos órganos (hígado y riñón), en la placenta y algún porcentaje ingresa al feto. Somawane y colaboradores (1975) describieron que con la administración intravenosa a partir de una dosis igual o mayor a 0.4 mg/kg pc a una rata gestante, el metal pesado ingresa al embrión, también encontraron que mientras la concentración sea más alta, aumentará

la bioacumulación de dicho metal en los fetos. Cuando se hacen administraciones con dosis que tienen concentraciones altas, hay más efectos perjudiciales en las crías, particularmente en el peso corporal, tal como lo observaron estos mismos autores, pues al administrar una dosis de 1.6 mg/kg provocó un menor peso por camada en el E20 y una dosis con una concentración de 1.25 mg/kg pc la dosis provocó un menor peso corporal por cría durante el mismo día embrionario.

Sin embargo, hay otros factores que ocasionan diferentes efectos en la progenie, por ejemplo, el día de la administración, mientras ésta sea de 1.25 mg/kg y se acerque al día E15 el peso es menor, quizá se deba a que el metal pesado pueda atrofiar algunos músculos (Samarawickrama y Webb, 1979).

En la investigación que se realizó la dosis administrada fue similar, 1.0 mg/kg pc en el día E14 y se encontró el peso corporal era menor postnatalmente. Con los estudios anteriores se puede afirmar que en este trabajo, un porcentaje de Cd de la dosis utilizada si ingresó en la progenie y logró causar los retrasos y adelantos en los marcadores del desarrollo, así como la reducción del peso y de la talla, quizá se deba que al bioacumular el Cd, no permite la absorción y la integración del Zn, desplazándolo y a su vez, evitando que cumpla las funciones que tiene, tales como el crecimiento o la regulación fisiológica de muchos procesos (Ojars *et al*, 1972) o bien la posible atrofia de músculos y órganos, por ejemplo, se ha reportado que el Zn ayuda a la neurogénesis, a la migración neuronal, a la formación y estructuración del cerebro (Bhatnagar y Taneja, 2001), si el Cd, desplaza al Zn, la ausencia de éste último puede modificar el desarrollo por ejemplo en el atraso o adelanto de los marcadores del desarrollo, modificar el tamaño, el peso postnatal e funcionalidad de varias estructuras y órganos.

7.2 Efectos del Cd en la percepción visual

Por otro lado, en la parte de percepción visual uno de los parámetros para determinar si ésta fue deficiente o no, fue el tiempo de permanencia en cada una de las zonas, el cual no resultó estadísticamente significativo entre ambos grupos, es decir que la percepción de profundidad y por ende la percepción visual no fue modificada por la administración de Cd, se observa que para ambos grupos es similar. En un estudio

realizado por Routtenberg y Glickmam en 1984, demostraron que la pigmentación de los ojos es importante para la percepción visual, encontraron que las ratas de la cepa *hotted* (sus ojos son pigmentados) en etapas tempranas y adultas pasan menos tiempo en la zona profunda, sin embargo, con ratas de la cepa *Sprague-Dawley* (ojos despigmentados), sucede lo contrario, permanecen más tiempo y más veces en esa misma zona, durante las mismas etapas, concluyendo la importancia de la pigmentación para la percepción de profundidad y por ende de la agudeza visual, debido a esto en ratas albinas su visión es deficiente.

Los animales utilizados en esta investigación fueron las ratas de la cepa *Sprague-Dawley* mismas que son parcialmente ciegas debido a la falta de pigmentación en sus ojos, por lo cual no tienen una adecuada percepción y agudeza visual, probablemente por eso se observó que los tiempos de permanencia y el número de veces en cada una de las zonas, principalmente en el abismo, son muy similares entre ambos grupos, esto indicaría que el Cd no alteró la visión; en caso de que este metal hubiese generado alguna afectación en la estructura anatómica de la capa de CGR, se observarían modificaciones en la visión, debido a que se sabe que en esta capa se conjunta toda la información de la señal fótica que llega a los fotorreceptores (Urtubia, 2006).

Quizá el Cd generó afectaciones en la integridad de la capa, de ser el caso, puede ser una disminución en el número de este tipo de células pues la administración de dicho metal puede inducir apoptosis (la administración de una dosis con una alta concentración en un evento único, provoca apoptosis en las CGR) (Almasi-Tork *et al*, 2007), sin embargo, la prueba conductual no lo determinó, en caso de que se haya modificado alguna capa de la retina podrá dilucidarse a través de un estudio histológico de la retina.

Por otro lado la investigación que se presenta se observó que la administración prenatal de Cd en el día E14 no modificó el tamaño o la forma de las vibrisas, mismas que les pueden estar ayudando a los animales de ambos grupos a crearse un mapa y por tal motivo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de permanencia ni en la latencia de entrada a la zona del abismo. Tal como Schiffman y colaboradores en 1970, describieron que en ratas albinas de la cepa Wistar, debido a

su parcial ceguera utilizan las vibrisas para formar un mapa del medio, pero, en ausencia de éstas, las ratas se pierden en el ambiente en el que están y no pueden formar un mapa de él.

En la prueba de percepción y agudeza visual, se observó que el riel tiene un papel importante para los animales puedan discernir la profundidad, cuando éstos fueron colocados sobre el riel para iniciar el ensayo, hubo una mayor latencia para entrar en la zona centro del abismo y en ausencia de dicho riel, cuando el punto de partida del animal fue más lejos, la latencia de entrada a esa misma zona fue menor (figura 16A), los resultados presentados son similares a lo que observaron Carr y McGuigan en 1965, mediante el “Visual Cliff” estudiaron a ratas albinas de la cepa *Sherman* de 28-30 días, el dispositivo contaba con un riel que estaba 10 cm sobre la plataforma base, en sus dos pruebas (moviendo el patrón del piso después del riel y antes del mismo), los animales no descendieron a la zona profunda, porque el riel al parecer aumentó la profundidad, ésta es detectada por sus vibrisas, ya que su parcial ceguera no les ayudaría mucho.

Como se ha descrito previamente en esta investigación donde se administró 1.0 mg/kg en pc prenatalmente, el tiempo de latencia de entrada al abismo en el ensayo sin riel fue menor, mientras que con el riel ese tiempo es mayor (como lo reportado por Carr y McGuigan, 1965), quizá se deba a cuatro posibles circunstancias: 1) las ratas han aprendido que el abismo es seguro, 2) no distinguen una profundidad por su visión pobre, 3) las vibrisas no les están ayudaron a discernir la profundidad como cuando están sobre el riel o 4) se modifica la respuesta de ansiedad al aumentar su evaluación de riesgo con la conducta de asomar la cabeza.

7.3 Ansiedad, estrés, evaluación de riesgo y miedo

Sestakova y colaboradores en 2013 describieron que cuando los animales son más ansiosos, permanecen más tiempo en la periferia y menos en el centro de la zona o del laberinto, similar a los resultados observados en la investigación que se presenta, donde se observa que ambos grupos esta característica es similar, a excepción del tiempo de permanencia de los machos del grupo control, en p del ensayo sin riel, donde

permanecieron más tiempo en el centro, con respecto a los demás grupos, probablemente esto se deba a que ese mismo grupo tuvo mayor tiempo de congelamiento en la misma zona (Anexo 10), sin embargo, podría dar una pauta de que sus niveles de ansiedad son similares.

En los animales de ambos grupos existe una respuesta de ansiedad que es parte de un complejo que se observa en todos los organismos y es un estado que se observa cuando éstos se encuentran ante una situación de peligro (Becerra-García *et al*, 2007). Para saber si hay modificaciones en esta respuesta es necesario hacer pruebas que nos brinden información de la misma, en este caso es necesario un laberinto conocido como elevado en cruz (Sestakova *et al*, 2013), si se compara este laberinto con el acantilado visual, donde los brazos abiertos son como la zona *a*, es decir un lugar no seguro y los brazos cerrados como la zona *p*, donde es un lugar seguro, la zona no segura o brazos abiertos generarán ansiedad.

En algunos experimentos se evaluó la ansiedad con diferentes protocolos, por ejemplo Kamel y colaboradores en 2011, observaron como la administración crónica de CdCl₂ durante la gestación, provocó en la progenie adulta que se incrementaran las respuestas de ansiedad, por ejemplo, en el tiempo de congelamiento fue mayor, el número de bolos fecales también incrementó, entre otras. Dentro del laberinto elevado en cruz, aumentó el tiempo en los brazos cerrados y disminuyó en los brazos abiertos. En otro trabajo realizado en la cepa *Wistar* generaron dos linajes, uno con individuos muy ansiosos y uno más con individuos de bajos niveles de ansiedad (Liebsch *et al*, 1998). Leret, Millán y Antonio en 2003 realizaron otro experimento donde se administró a ratas preñadas Cadmio y Plomo durante la gestación y la lactancia, provocando que las crías en edades adultas presentaran ansiedad. Todos estos estudios, utilizaron el laberinto elevado en cruz para evaluar la ansiedad, se observó que los animales ansiosos pasan menos tiempo en los brazos abiertos (zona no segura) y más en los brazos cerrados (zona segura) dado lo anterior, al evaluar los resultados y observar que el tiempo de permanencia en cada una de las zonas es similar para ambos grupos (sea segura o no), estas pruebas son indicativas de que la administración aguda de CdCl₂ 1.0 mg/kg pc en el día E14 no generó ansiedad en estados tempranos.

Se sabe que bajos niveles de ansiedad disminuyen la locomoción, esto se puede observar en la distancia recorrida (Liebsch *et al*, 1998). Como se describió previamente, la dosis utilizada en esta tesis fue similar a las utilizadas por otros autores (Somawane *et al*, 1975; Samarawickrama y Webb, 1979 y 1981), aquellas que no generaron malformaciones morfológicas o motoras observables, mismas que puedan modificar el movimiento y por ende la distancia recorrida, caso contrario al de dosis mayores a 1.25 mg/kg pc. En un estudio (Salvatori *et al*, 2004), utilizaron una dosis crónica de 20mg/mg, encontraron que algunos animales del grupo experimental (10/64 animales) presentaron modificaciones teratogénicas en los huesos metacarpales, cuando se les aplicó la prueba de campo abierto y se evaluó la locomoción entre el grupo control y el experimental, no se encontraron diferencias significativas, lo cual indica que a pesar de las malformaciones presentadas su locomoción resultó similar.

A pesar de que no se registró teratogénesis a nivel morfológico y no se realizaron procedimientos para buscar a nivel anatómico, la distancia no fue modificada, los resultados (figura 18 B) de este trabajo se asemejan a los del estudio de Salvatori y colaboradores en el 2004, donde en la prueba de campo abierto, no hay diferencias significativas en la distancia recorrida por ambos grupos, considerando a ésta como un indicador de ansiedad y de movimiento que haya sido afectado por las alteraciones en estructuras motoras. Se puede afirmar lo siguiente, la dosis empleada de Cd no modificó la ansiedad entre los animales, si hubieran modificaciones teratogénicas óseas, al parecer no modificaron la locomoción.

Como se describió previamente, al parecer los animales de ambos grupos tienen la misma visión deficiente y debido a ésto, utilizan las vibrisas para formar un mapa, es por eso que se midió la latencia de la entrada de la cabeza de los animales a las zonas del abismo. En la figura 17A se observa que en el ensayo con riel el tiempo de latencia de la cabeza a la zona centro de los machos del grupo experimental y las hembras del grupo control, fue mayor con respecto a su contra parte (♂Control y ♀Cd). Tanto la latencia en las orillas del laberinto como el número de veces que entró la cabeza en oa fue similar en ambos grupos para ambos ensayos, sabiendo que los animales ansiosos pasan más tiempo en la zona segura y que en este experimento su tiempo es similar, se descarta la ansiedad. Las diferencias observadas en la latencia de entrada de la

cabeza, quizá se deba a otra conducta, como el miedo o la temeridad. Schiffman y colaboradores (1970) describieron que las vibrisas tienen un papel importante en la evasión de la profundidad y que en pruebas de acantilado visual, las ratas responden por la palpación de la zona profunda con estas estructuras. Según Becerra-García y colaboradores (2007) explican que utilizan las vibrisas cuando el peligro está más remoto, en este caso, los animales están sobre el riel y tiene una zona no segura próxima a ellos y el “asomar” la cabeza ésta se puede considerar una evaluación de riesgo (Griebel *et al*, 1997), en la investigación realizada, se demostró que los machos del grupo Cd, al parecer tienen una mayor evaluación de riesgo con respecto a los machos del grupo Con, sin embargo, en las hembras pasa lo contrario, las control tienen una mayor evaluación de riesgo.

Los resultados de la investigación realizada fueron que la mayor evaluación de riesgo mediante la latencia de entrada de la cabeza incrementó en los machos y disminuyeron en las hembras, ambos del grupo experimental con respecto a su contraparte en el grupo control. En el caso de las hembras control, quizá se deba a que las hembras llegan a tener más actividad que los machos. Liebsch y colaboradores en 1998 crearon dos linajes de ratas altos niveles de ansiedad y bajos niveles de ansiedad, la hembras de este último grupo presentaron mayor actividad en el laberinto elevado en cruz, con respecto a los machos de ese mismo linaje, por otro lado, Blizard, Lippman y Chen (1975) encontraron que en ratas de la cepa *Sprague-Dawley*, la actividad es mayor en las hembras conforme avanza la edad con respecto a los machos. Anderson (1941) explica que las hembras tienen una alta respuesta emocional y a su vez un alto nivel de actividad, debido a esto, probablemente en el acantilado visual las hembras del grupo control, tengan una mayor evaluación del riesgo y los machos no. Si en el grupo experimental (machos y hembras) pasa lo contrario a lo que se observa en los animales del grupo control, quizá hay una estructura relacionada con la evaluación del riesgo que fue afectada por la administración de Cd en el día E14, como podría ser la amígdala (Becerra-García *et al*, 2007).

Acerca del congelamiento/parálisis de los animales, su tiempo de congelamiento puede indicar una conducta de miedo, esta respuesta también está relacionada con medida por la presión arterial, la frecuencia cardíaca, la respiración, entre otros. Las

conductas de miedo son reguladas por el complejo amigdalino (Becerra-García *et al*, 2007; y Davis, 1992). El núcleo medio de la amígdala y el lecho de la estría terminal (estructuras de este complejo) ya son distinguibles a partir del día E14 y 24 horas antes es su pico de neurogénesis (Cooke y Simerlym 2005). Rice y Baron (2000) describieron que el desarrollo de la amígdala ocurre de los días E12 al E21, mientras que en el complejo amigdalino se observa al receptor TrkC del factor de crecimiento la neurotrofina 3 (importante para el crecimiento, la neurogénesis y especialización), este receptor se expresa entre los días E12-E14 y podría indicar la presencia de dicho factor (Hassink *et al*, 1999).

Con respecto al tiempo de congelamiento en los animales experimentales es mucho menor que el de los animales controles, quizá se deba a que los animales del grupo experimental probablemente tengan menor miedo, sin embargo, estos resultados son contrarios a los de otros estudios, Kamel y Razek (2011) encontraron que al administrar una dosis crónica en ratas gestantes (desarrollo embrionario y lactancia), las crías en edades de 30 días permanecen más tiempo congeladas con respecto a los animales del grupo control, el tiempo es mayor si la concentración de la dosis es alta. En un experimento similar al anterior realizado por Lehotzki y colaboradores (1990), demostraron que al administrar diferentes concentraciones de Cd (0.0, 0.2, 0.62 y 2 mg/kg pc) en una exposición crónica (E7-E15), encontraron que las crías expuestas prenatalmente a Cd, en el día PN 39 después de administrarles D-anfetamina (que reduce las situaciones de inmovilidad), permanecieron más tiempo congeladas o inmovilizadas en situación de nado estresante y mientras fue mayor la concentración que se administró a las madres, las crías permanecieron más tiempo inmovilizadas. En los tres casos, se observa que la conducta de miedo (congelamiento) está siendo modificada, eso quiere decir que el Cd administrado prenatalmente generó alteraciones en alguna de las estructuras del complejo amigdalino, sin embargo, se desconoce a qué nivel sea o bien en cuál proceso del desarrollo sucedió, ya sea modificando la neurogénesis, provocado apoptosis, necrosis, menores conexiones sinápticas o algún otro fenómeno dentro de este complejo, pero esto se podría corroborar mediante la histología del mismo.

Dentro de las conductas de estrés y miedo como respuestas emocionales se encuentran la defecación, las micciones y los acicalamientos, mismas que se evaluaron (figura 19B), en el segundo ensayo (sin riel), el número de bolos fecales disminuyó en los animales del grupo experimental y aumentó en los animales del grupo control. La defecación está considerada como una respuesta emocional de los organismos, cuando éstos están expuestos a un ambiente peligroso, es acompañado con altos niveles de defecación (Hall, 1934; Sestakova *et al*, 2013). Como se ha descrito previamente, la zona *p* no es segura y pudo provocar incrementar las conductas en los animales del grupo control, éstas parecieran estar disminuidas en los animales experimentales, en el segundo ensayo, si la defecación es una respuesta emocional, nos indica que ante un ambiente peligroso, ésta disminuye en los animales experimentales.

7.4 Ritmos de ingesta de agua, características y sincronización

Por otro lado en la distribución de la potencia del periodo del ritmo de ingesta de agua en las diferentes condiciones de fotoperiodo (figura 19), se observa claramente que dentro de éstas, tanto los animales del grupo control y los animales del grupo experimental, presentan periodos de 24 horas lo cual indica que la administración de 1.0 mg/kg pc de Cd no afectó el desarrollo ni la integridad del NSQ, ya que si fuese así, la ritmicidad habría desaparecido, similar a las ratas adultas que sufrieron una lesión en el NSQ, los periodogramas del ritmo ante esta lesión, no presentaron un periodo de 24 horas. El ritmo únicamente se expresó en ratas sanas y en aquellas que tuvieron una lesión y posteriormente recibieron el trasplante de dicha estructura. La “reaparición” del ritmo sucedió posterior al trasplante o incluso después de varias semanas (Drucker-Colin *et al*, 1984), aunque en algunos experimentos, no todos los animales expresaron el ritmo de 24 horas, se sincronizaron o incluso la expresión del ritmo tardó más (Boer *et al*, 1993).

En ambos experimentos se observa la importancia del NSQ para la expresión de los ritmos circadianos. En los actogramas del ritmo de ingesta de agua (figura 20), se observa que en los animales de ambos grupos, hubo sincronización a la primera condición de luz (LO) en los primeros días, además la mayor “actividad” del ritmo

sucedió en la escotofase (figura 22), tal como lo han descrito otros autores (Stephan y Zucker, 1972 y Johnson y Johnson, 1990). Se puede observar que posteriormente ante la condición de oscuridad constante (OO), el ritmo presenta libre corrimiento, éste fue robusto en el animal control que en el experimental. En la siguiente condición, ambos animales se vuelven a sincronizar (LO2) y cuando fue el retraso del encendido de las luces, de igual manera, los animales de ambos grupos se sincronizaron al mismo. A pesar de que el ritmo se presenta de manera muy similar en los animales de ambos grupos, hay diferencias en el tiempo de sincronización ante esta última condición (figura 22). Las modificaciones de la sincronización fótica, a veces son producto de la vía de entrada del sistema circadiano, por ejemplo, Stephan y Sucker en 1975, observaron que ratas enucleadas de un ojo y con lesiones en el nervio óptico, tardan más en sincronizarse a un nuevo fotoperiodo, debido a que, para que se lleve la sincronización es importante la vía de entrada. En esos años no se conocía el tracto retinohipotalámico, Johnson, Moore y Morin (1988), observaron en el hámster que al destruir y/o dañar el TRH, la sincronización era casi nula, ocasionando que el ritmo entrara en libre corrimiento, debido a que estos axones tenían comunicación con la parte ventro-lateral del NSQ.

En ese momento aún se desconocía cuál era la vía de entrada exacta, actualmente se sabe que esta vía está conformada por las ipRGC (Hattar *et al*, 2002, y Berson *et al*, 2002), éstas, son un tipo de células ganglionares de la retina, mismas que tienen su neurogénesis a partir del día E14 (Reese y Colello, 1992). Si las dosis con concentraciones altas de Cd son administradas prenatalmente generan apoptosis en las células ganglionares de ratón (Almasi-Tork *et al*, 2007), puede que en la rata también haya sucedido algo similar, resultando que la dosis administrada afectó a las ipRGC, (que son la vía de entrada) y por ende el tiempo de sincronización se retrasó, 2.25 días de OO a LO y de 1 a 1.25 días en el caso de LO a LO con retraso del encendido de las luces (figura 22) e incluso, el periodo también se pudo haber modificado, debido a la maduración del sistema circadiano y de los ritmos que expresa, debido a que las ipRGC, son importantes para la maduración de ambos (Chew *et al*, 2017).

Por otro lado, la administración de Cd no está interfiriendo con la parte homeostática de este ritmo, debido a que no hubo alguna modificación en el consumo de agua y alimento.

8. RESUMEN DE RESULTADOS

<i>Parámetro medido</i>	<i>Descripción</i>
<i>Talla y peso</i>	Al acercarse al día 30, los animales del grupo experimental disminuyeron su talla nasoanal y su peso corporal.
<i>Marcadores del desarrollo</i>	En los animales experimentales las vibrisas no se modificaron, la separación de la oreja se presentó un día después, la aparición del pelaje se adelantó un día, en la erupción de incisivos superiores e inferiores se acortó el periodo, al igual que la apertura del ojo derecho, pero no del izquierdo y por último hubo un retraso en el tiempo para empezar a caminar.
<i>Percepción visual</i>	La percepción visual no fue modificada, ya que no se observaron diferencias entre los grupos en las distintas zonas y donde las hubo <i>a</i> y <i>p</i> (♂Con vs ♂Cd ensayo con riel y ♂Con vs ♂Cd ensayo sin riel, respectivamente) pueda deberse al tiempo de congelamiento. Mientras que la latencia de entrada a la zona <i>a</i> fue modificado para ambos grupos debido al riel, ya que en ausencia de éste, la latencia es menor.
<i>Conductas de miedo</i>	Para este tipo de conductas se observó que en el grupo experimental se modificó la evaluación de riesgo utilizando el tiempo de entrada de la cabeza del animal, debido a que los machos aumentaron y las hembras disminuyeron esa latencia con respecto al control. El tiempo de congelamiento de los animales experimentales fue mucho menor, habla de una condición de temeridad.

Ansiedad y estrés

Las respuestas emocionales por estrés en el campo abierto son modificadas por el riel, en los animales de ambos grupos se observó que en ausencia de éste las respuesta, de defecar disminuye en los experimentales y aumenta en los controles, mientras que la respuesta de acicalarse aumentan en ambos grupos.

Sincronización a la luz del ritmo de ingesta de agua

La endogeneidad del ritmo no se ve modificada, su periodo en condiciones de LO dura 24, en OO, dura más de 24 horas y los animales experimentales tardan de 1 a 2.5 días más en sincronizarse a un nuevo fotoperiodo y la parte homeostática, es decir el consumo de agua no se vio modificado.

9. CONCLUSIONES

La administración de Cd a ratas gestantes, en el día E14 generó varias modificaciones en la progenie. La dosis utilizada no es letal y aparentemente no provocó teratogénesis a nivel morfológico, sin embargo, aún se desconoce si esta concentración induce modificaciones anatómicas, debido a que este aspecto no fue evaluado, sin embargo, dicha dosis si modificó en las crías su talla y su peso en algunos días postnatales, ocasionó retrasos en la separación de la oreja, en la aparición del pelaje, en la erupción de dientes incisivos superiores, adelantó la apertura del ojo derecho y retrasó el tiempo para comenzar a caminar. Los efectos de este metal pesado dependen de varios factores como: la especie empleada, la cepa de la especie, la edad del espécimen, la edad de la madre cuando está gestando, la vía de administración, las concentración de la dosis, entre otros.

Por otro lado, se concluye que la dosis empleada no ocasionó problemas de visión porque no fue observado en la prueba conductual. En el acantilado visual, el cual funge como un laberinto de campo abierto no se observó alteraciones en las respuestas de ansiedad en estados juveniles, sin embargo, las respuestas emocionales, aumentaron sin el riel y la conducta de miedo se ve disminuida en animales expuestos prenatalmente.

La dosis de 1.0 mg/kg pc no modificó la endogeneidad del ritmo circadiano de ingesta de agua, sin embargo, hay retrasos en la resincronización a las nuevas condiciones de luz. Dentro del ritmo de ingesta de agua no se vio alterada la composición homeostática ya que el consumo de agua fue similar en ambos grupos, así como el consumo de alimento.

Este trabajo permite concluir acerca de los efectos inducidos con una dosis prenatal aguda de CdCl₂, a partir de lo cual fue posible obtener información de las modificaciones a nivel fisiológico y conductual en el corto, el mediano y el largo plazo, así poder correlacionarlas con el día de administración y su efecto toxicológico en los periodos críticos del desarrollo embrionario, sin embargo, a su vez, abre más incógnitas para estudios posteriores.

10. REFERENCIAS

1. Aboitiz, F., y Dagnino-Subiabre, A. (2007). The Neurobiology of Stress: An Evolutionary Approach. *Research Signpost. Trivandrum*, 695, pp 23.
2. Anderson. E. E. 1941. Sex differences in timidity in normal and gonadectomized rats. *The Journal of Genetic Psychology*, 69, pp 139-153.
3. Almasi-Tork S., Piryaee. A. y Sadeghi, Y. 2007. Effects of cadmium on photoreceptors and ganglionic cells of retinal layer in mice embryo an ultrastructural study. *Indian J Exp Biol.*, 45 (5), pp 469-74.
4. Aschoff, J. 1981. A Survey on Biological Rhythms. *En: Aschoff, J. (editor). Handbook of behavioral neurobiology. Biological Rhythm*, 4, pp 3-8.
5. Baranski, B., Stetkiewicz, I., Sitarek, K. y Szymczak, W. 1983. Effects of oral, subchronic cadmium administration on fertility, prenatal and postnatal progeny, development in rats. *Arch Toxicol*, 54, pp 297-302.
6. Baroncelli, L., Braschi, C. y Maffei, L. 2013. Visual depth perception in normal and deprived rats: effects of environmental enrichment. *Neuroscience*, 236, pp 313-319.
7. Becerra-García, A; Madalena, A; Estanislau, C; Rodriguez-Rico, J. y Dias, H. 2007. Ansiedad y miedo: su valor adaptativo y maladaptaciones. *Revista Latinoamericana de Psicología*, 39 (1), pp 75-81.
8. Berson, D; Dunn, F; y Takao, M. 2002. Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. *Science*, 295 (5557), pp 1070-1073.
9. Bhatnagar S, Taneja S. 2001. Zinc and cognitive development. *Br J Nutr*, 85, pp 139-145.
10. Blizard. D; Lippman, R. y Chen, J. 1975. Sex Differences in Open-Field Behavior in the Rat: The Inductive and Activational Role of Gonadal Hormones. *PhyMology and Behavior*, 14, pp 601-608.
11. Boer, G; Griffioen, H; Duindam, H; Van der Woude T. y Rietveld, W. 1993. Light/dark-induced effects on behavioral rhythms in suprachiasmatic nucleus-lesioned rats irrespective of the presence of functional suprachiasmatic nucleus brain implants, *Journal of Interdisciplinary Cycle Research*, 24 (2), pp 118-136.

12. Brady, J. 1979. Biological Timekeeping. Cambridge University. Londres, pp 1-33.
13. Carnidalli, D. y Golombek, D. 1994. Naturaleza y propiedades de los ritmos biológicos. Análisis de los ritmos circadianos. *En: Cardinalli, D; Catalá, J. y Sánchez, E. (Eds). Introducción a la Cronobiología*, pp 15-25.
14. Carr, J. y McGuigan, D. 1965. The stimulus basis and modification of visual cliff performance in the rat. *Animal Behaviour*, 13 (1), pp 25-29.
15. Castro-Sierra, E., Chico, F. y Portugal, A. 2005. Neurotransmisores del sistema límbico. I. Amígdala. primera parte. *Salud Mental*, 28 (6), pp. 27-32.
16. Chareyron, L., Lavenex P., Amaral, D. y Lavenex, P. 2011. Stereological analysis of the rat and monkey amygdala. *J Comp Neurol.*; 519 (16): 3218–3239
17. Chernoff, N. 1973. Teratogenic effect of cadmium in rats. *Teratology.*, 8, pp 29-32.
18. Chew, K., Renna, J., McNeil, D., Fernandez, D., Keenan, W., Thomsen, M., Ecker, J., Loevinsohn, G., Vanduck, C., Vicarel, D., Tufform A., Weng, S., Gray, P., Cayouette, M., Herzog, E., Zhao, H., Berson, D. y Hattar, S. 2017. A subset of ipRGCs regulates both maturation of the circadian clock and segregation of retinogeniculate projections in mice. *eLIFE*, pp 1-26.
19. Coke, B. y Simerly, R. Ontogeny of bidirectional connections between the medial nucleus of the Amygdala and the principal bed nucleus of the stria terminalis in the rat. *The journal of comparative neurology*. 489, pp 42-58.
20. Dagnino-Subiabre, A. 2012. Modelos animales para el estudio del estrés y las conductas depresivas. *Rev. Farmacol. Chile*, 5 (1), pp 19-26.
21. Dunlap, J., Loros, J. y DeCoursey, P. 2004. Overview of biological timing from unicells to humans. *En: Dunlap, J., Loros, J. y DeCoursey, P.(eds). Chronobiology*, pp 3-22.
22. Durán, P., Miñana, C. y Fuentes, M. 2013. Ritmos Biológicos, cronobiología y corteza prefrontal. *En: Hernández, M; Chacón, L; Barradas, J; y Guevara, M; (eds). Corteza Prefrontal: Cognición y Conducta*, pp 217-242.
23. Duval, F. González, F. y Rabia, H. 2010. Neurobiología del estrés. *REV CHIL NEURO-PSIQUIAT*; 48 (4), pp 307-318.

24. Drucker-Colin, R; Aguilar-Roblero, R; García-Hernández, F; Hernández-Cancino, F. y Bermudez, F. 1984. Fetal suprachiasmatic nucleus transplants: diurnal rhythm recovery of lesioned rats. *Brain Research*, 311, pp 353-357 353.
25. Ecker, J., Dumitrescu, O., Wong, Alam, N., Chen, S-K., LeGates, T., Renna, J., Prusky, G., Berson, D. y Hattar, S. 2010. Melanopsin-Expressing Retinal Ganglion-Cell Photoreceptors: Cellular Diversity and Role in Pattern Vision. *Neuron*, 67, pp 49–60.
26. Erie, J.C., Butz, J.A., Good, J.A., Erie, E.A., Burritt, M.F. y Cameron, J.D., 2005. Heavy metal concentrations in human eyes. *Am. J. Ophthalmol*, 139, pp 888-893.
27. Fox, M. 1965. The visual cliff test for the study of visual depth perception in mouse. *Animal behavioural*, 13 (1), pp 232-233.
28. García, J., Tortajada, J., Conesa, A. y Castell, J. 2005. Neurotóxicos medioambientales (y II). Metales: efectos adversos en el sistema nervioso fetal y posnatal. *Acta Pediatr. Esp*, 63, pp 182-192.
29. Golombek, D; Carnidali, D; y. Aguilar-Roblero, R. 1997. Mecanismos de temporización en los vertebrados. *En: Golombek, D. (Editor). Cronobiología: Principios y Aplicaciones*, pp 155-181.
30. Golombek, D. y Rosenstein, R. 2009. Physiology of Circadian entrainment. *Physiol Rev*, 90, pp 1063–1102.
31. Griebel, G., Rodgers, J., Perrault, G. y Sanger, D. 1997. Risk assessment behaviour: evaluation of utility in the study of 5-HT-related drugs in the rat elevated plus-maze test. *Pharmacology biochemistry and behavior*, 57 (4), pp 817-827.
32. Hall, C. S. 1934. Emotional behavior in the rat *Journal of Comparative Psychology*, 18(3), pp 385-403.
33. Hassink, G., Van esseveldt, K., Dijkhuizen, P., Verhaagen, J. y Boer G. 1999. Ontogeny of neurotrophin receptor trkc expression in the rat forebrain and anterior hypothalamus with emphasis on the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*, 92 (2), pp 704-712.

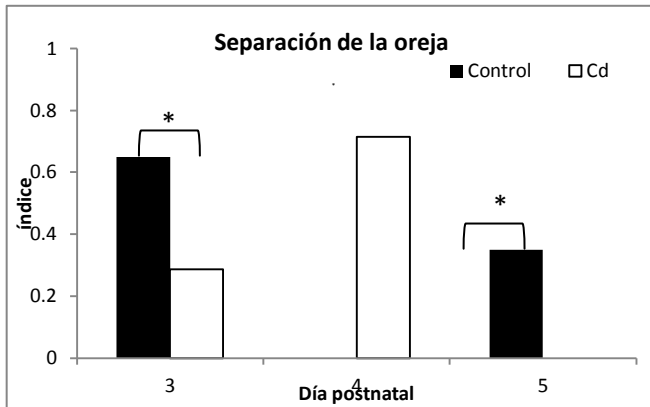
34. Hattar, S., Liao, H.-W., Takao, M., Berson, D., y Yau, K.-W. 2002. Melanopsin containing Retinal Ganglion Cells: Architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science*, 295 (5557), pp 1065–1070.
35. Johnson, R. y Johnson K. 1990. Light/dark cycle modulates food to water intake ratios in rats. *Physiol. Behav.*, 48 (5), pp 707-11.
36. Johnson, R; Moore, R; y Morin, L. 1988. Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retinohypothalamic tract R.F. 1, R.Y. Moore 2'3 and L.P. *Brain Research*, 460, pp 297- 313.
37. Lafuente, A., González-Carracedo, A., Romero, A. y Cabaleiro, T. 2005. Toxic effects of cadmium on the regulatory mechanism of dopamine and serotonin on prolactin secretion in adult male rats. *Toxicology Letters*, 155, pp 87-96.
38. Kamel, M. Abd El Razek, A; Ahmed, K. y Kamel, G. M. 2011. Exposure of adult male rats to cadmium: assessment of sexual behaviour, fertility, aggression as well as anxiety like behaviour with special reference to biochemical and pathological alterations. *Life Science Journal*, 8 (2), pp 106-119.
39. Kamel, M. Abd El Razek, A; Ahmed, K. y Kamel, G. M. 2011. Perinatal exposure to cadmium affects neurobehavioural development and anxiety like behaviour in rat offspring. *Life Science Journal*, 8 (4).
40. Leret, M; Millán, J. A. y Antonio, M. T. 2003. Perinatal exposure to lead and cadmium affects anxiety-like behaviour. *Toxicology*, 186, pp 125-130.
41. Lehotzky, K; Ungvary, G; Polin, D. y Kiss, A. 1989. Behavioral deficits due to prenatal exposure to cadmium chloride in cfy rat pups. *Neurotoxicology and Teratology*, 12, pp 169-172.
42. Liebsch, G; Montkowski, A; Holsboer, F. y Landgraf, R. 1998. Behavioural profiles of two Wistar rat lines selectively bred for high or low anxiety-related behavior. *Behavioural Brain Research*, 94, pp 301-310.
43. Marques, M., Golombek, D. y Moreno, C. 1997. Adaptación temporal. En Golombek, D (Editor). *Cronobiología: Principios y aplicaciones*, pp 57-98.
44. Martínez, K., Souza, V., Bucio, L., Gómez, L. y Gutiérrez, C. 2013. Cadmio: efectos sobre la salud. Respuesta celular y molecular. *Acta Toxicol. Argent.*, 21 (1), pp 32-48.

45. Morgane, P., Austin-Lafrance, R., Brozino, J., Díaz-Cintra, S., Cintra, L., Kempers, T. y Galler, J. 1993. Prenatal Malnutrition and Development of the Brain. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 17, pp. 91-128,
46. Nava-Ruíz, C. y Méndez-Armenta, M. 2011. Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Arch Neurocién.*, 16(3), pp 140-147.
47. Ojars, J., Ruta, L. y Zahir A. 1972. Cadmium and Zinc in Pregnancy and Lactation, *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 25 (1), pp. 14-22,
48. Pérez-León, J. y Lane, R. 2009. Las células con melanopsina: Nuevos fotorreceptores en la retina de los vertebrados. *Revista de Educación Bioquímica*, 28 (1), pp 9-18.
49. Perez, J. y Salceda, R. 2008. El proceso visual en invertebrados y vertebrados. *En: Fanjul, M. y García, M. (eds). Biología Funcional de los animales Vol. II*, pp 223-251.
50. Piasek, M. y Laskey, W. 1994. Acute cadmium exposure and ovarian steroidogenesis in cycling and pregnant rats. *Reproductive Toxicology*, 8 (6), pp. 495-507.
51. Polanco, L., Vargas-Irwin, C. y Góngora, M. 2011. Modelos animales: Una revisión desde tres pruebas utilizadas en ansiedad. *Suma Psicológica*, 18 (2): pp 141-148,
52. Reese, B. y Colello, R. 1992. Neurogenesis in the retinal ganglion cell layer of the rat. *Neuroscience* 46 (2), pp 419-429.
53. Rice, D. y Barone, S. 2000. Critical Periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environmental Health Perspectives*, 108 (3), pp 511-533.
54. Routtenberg, A. y Glickman, S. 1964. Visual cliff behavior in albino and hooded rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 58 (1), pp 140-142.
55. Salvatori, F., Talassi, C., Salzgeber, S., Spinosa, H. y Bernardi, M. 2004. Embryotoxic and long-term effects of cadmium exposure during embryogenesis in rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 26, pp 673-680.

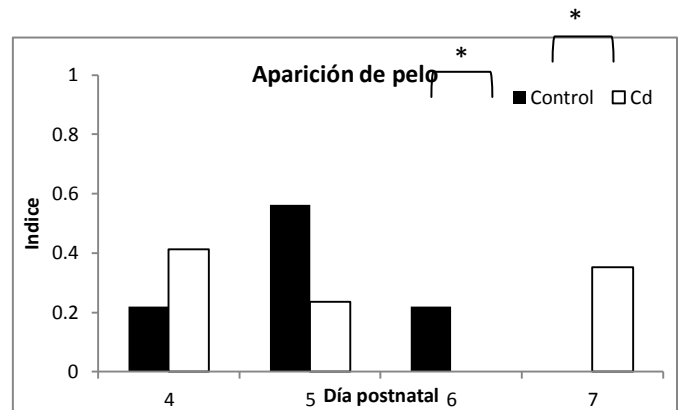
56. Samarawarickrama, G. y Webb, M, 1979. Acute effects of cadmium on the pregnant rat and embryo-fetal development. *Environmental Health Perspectives*, 28, pp 245-249.
57. Samarawarickrama, G, y Webb, M. 1981. The acute toxicity and teratogenicity of cadmium in the pregnant rat. *J Appl Toxicol.*, 1, pp 264-269.
58. Sánchez-Navarro, J. y Román, F. 2004 Amígdala, corteza prefrontal y especialización hemisférica en la experiencia y expresión emocional. *Anales de psicología*, 20 (2) pp 223-240.
59. Sestakova, N; Puzserova, A; Kluknavsky, M. y Bernatova, I. 2013. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdiscip Toxicol.*, 6 (3), 126–135.
60. Schiffman, H; Lor, R; Passafiume, J y Neeb, R. 1970. Role of vibrissae for depth perception in the rat (*Rattus norvegicus*) *Anim. Behav.*, 18, pp 290-292.
61. Somawane, R; Nordberg, M; Nordberg, G. y Lucier, G. 1975. Placental transfer of cadmium in rats: influence of dose and gestational age. *Environmental Health Perspectives*, pp 97-102.
62. Soria, V. y Urretavizcaya, M. 2009. Circadian rhythms and depression. *Actas españolas Psiquiatr*, 37(4), pp 222-32.
63. Stephan F. y Zucker, I. 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*., 69 (6), pp1583-1586.
64. Toledo, R., Aguilar-Roblero, R., Canchola, E. y Caba, M. 2004. Tracto Retinohipotalámico en el conejo, Retinohypothalamic tract in the rabbit. *Universidad y Ciencia*, 20 (40), pp 55-60.
65. Urtubia, C. 2006. Fisiología de la retina II. Mensaje visual en la segunda sinapsis: las células ganglionares. *Neurobiología de la vision*, pp 357-364.
66. Walk, R. y Gibson, J. 1961. A comparative and analytical study of visual depth perception. *Psychol. Monogr*, 75 (15).
67. Wills, N., Ramanujam, V. y Chang, J. 2008. Cadmium accumulation in the human retina: effects of age, gender, and cellular toxicity. *Exp Eye Res.*, 86 (1), pp 41-51.

11. ANEXOS

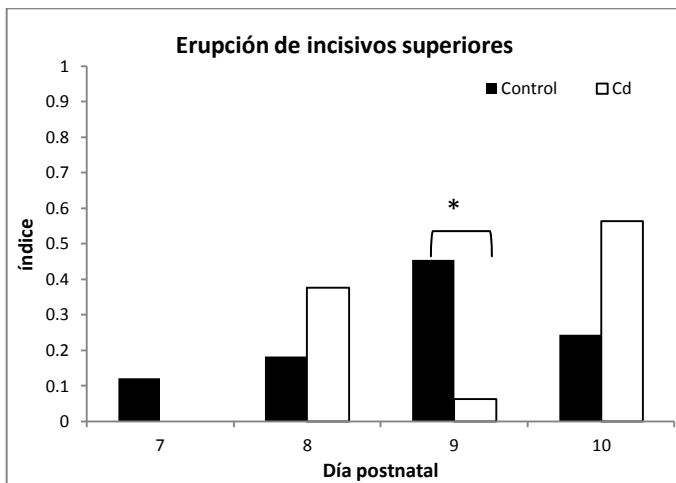
11. 1 Marcadores del desarrollo



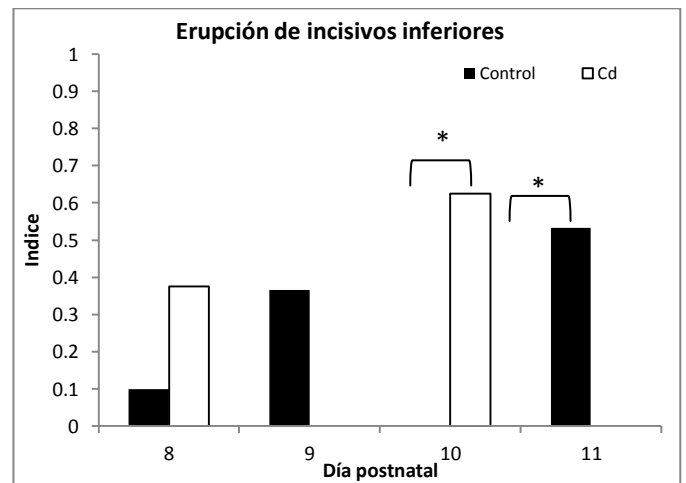
Anexo 1. Gráfica que muestra los índices de separación de la oreja, por día, índice= n/N donde n es el número de animales que presentaron ese marcador y N el total de animales que había. χ^2 , estadística: PN3 p=0.0057, PN4 p<0.0001 y PN5 p=0.013, * hay diferencias estadísticamente significativas.



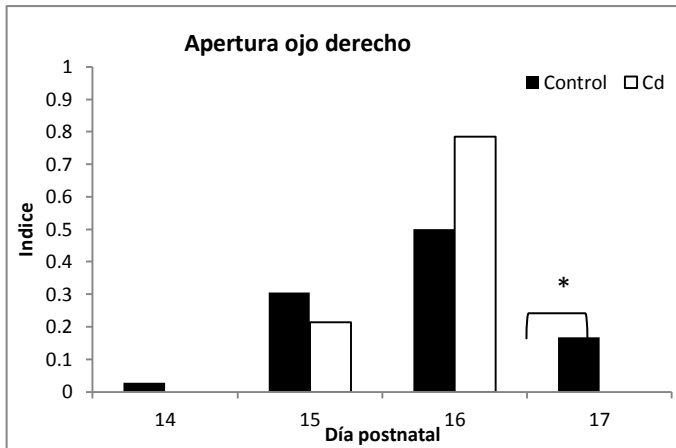
Anexo 2. Gráfica que muestra los índices de la aparición de pelo, por día, índice= n/N donde n es el número de animales que presentaron ese marcador y N el total de animales que había. χ^2 , estadística: PN4 p=0.224, PN5 p=0.0721, PN6 p=0.0094 y PN7 p=0.0017, * hay diferencias estadísticamente significativas.



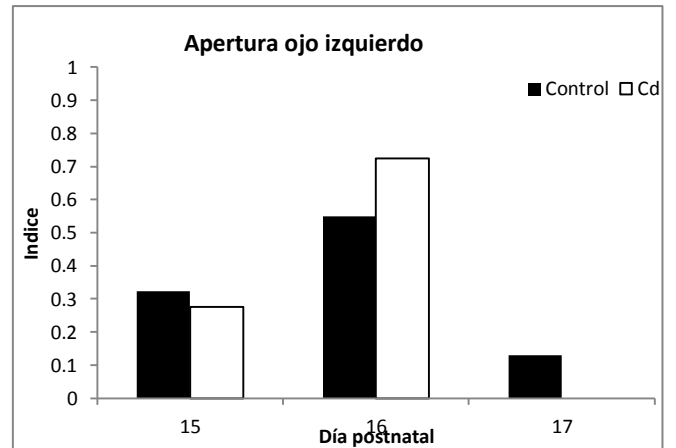
Anexo 3. Gráfica que muestra los índices de la erupción de dientes incisivos, por día, índice= n/N donde n es el número de animales que presentaron ese marcador y N el total de animales que había. χ^2 , estadística: PN7 p=0.1714, PN8 p=0.262, PN9 p=0.0369 y PN10 p=0.1379, * hay diferencias estadísticamente significativas.



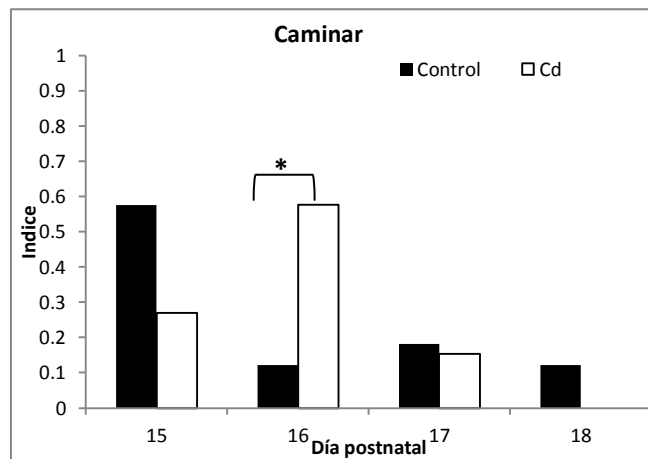
Anexo 4. Gráfica que muestra los índices de la erupción de dientes incisivos inferiores, por día, índice= n/N donde n es el número de animales que presentaron ese marcador y N el total de animales que había. χ^2 , estadística: PN8 p=0.1281, PN9 p=0.0962, PN10 p=0.0003 y PN11 p=0.0468, * hay diferencias estadísticamente significativas.



Anexo 5. Gráfica que muestra los índices de la apertura del ojo derecho, por día, índice= n/N donde n es el número de animales que presentaron ese marcador y N el total de animales que había. χ^2 , estadística: PN14 p=0.3807, PN15 p=0.63, PN16 p=0.2639 y PN17 p=0.0365, * hay diferencias estadísticamente significativas.

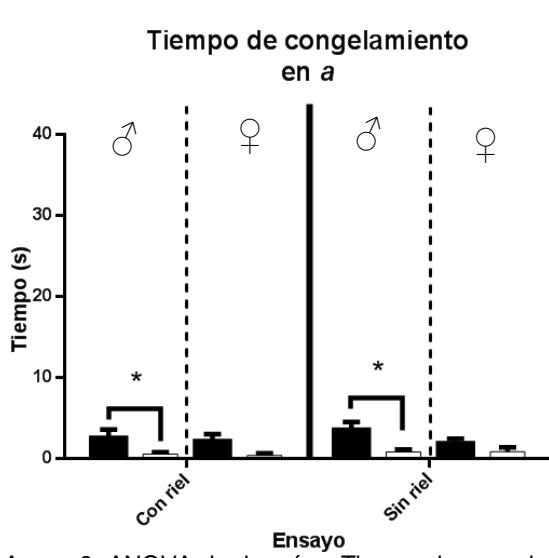


Anexo 6. Gráfica que muestra los índices de la apertura del ojo izquierdo, por día, índice= n/N donde n es el número de animales que presentaron ese marcador y N el total de animales que había. χ^2 , estadística: PN15 p=0.772, PN16 p=0.5037 y PN17 p=0.0601, * hay diferencias estadísticamente significativas.

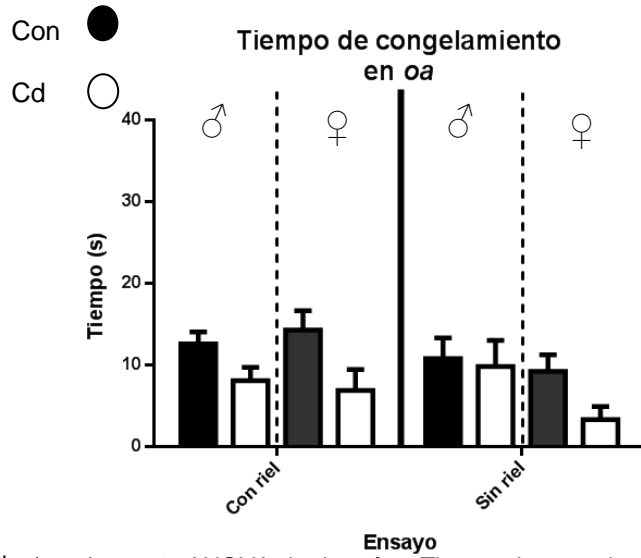


Anexo 7. Gráfica que muestra los índices de tiempo para empezar a caminar, por día, índice= n/N donde n es el número de animales que presentaron ese marcador y N el total de animales que había. χ^2 , estadística: PN15 p=0.084, PN16 p=0.0138, PN17 p=0.6899 y PN18 p=0.0677, * hay diferencias estadísticamente significativas.

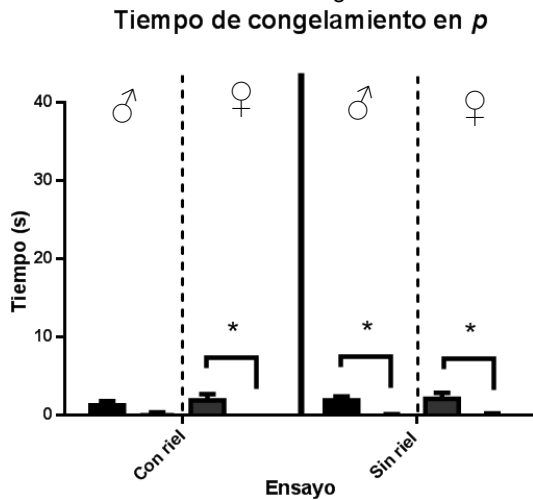
11.2 Parámetros conductuales



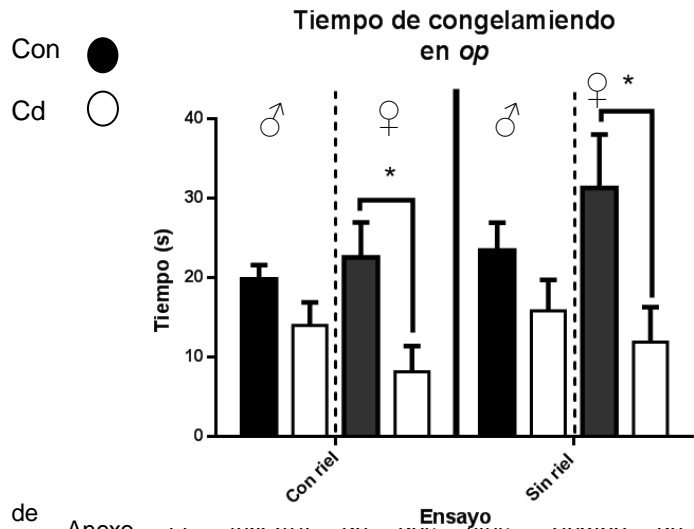
Anexo 8. ANOVA de dos vías. Tiempo de congelamiento en a, de los animales del grupo control y del grupo experimental. En el ensayo con riel, se encontró diferencias estadísticamente significativas en ♂Control vs ♂Cd con una $p=0.0325$ y en el ensayo sin riel ♂Control vs ♂Cd con una $p=0.0028$, los datos que se muestran son los promedios \pm error estándar de la media, *hay diferencias estadísticamente significativas.



Anexo 9. ANOVA de dos vías, Tiempo de congelamiento en oa, de los animales del grupo control y del grupo experimental. En el ensayo con riel, se encontró diferencias estadísticamente significativas en ♂Control vs ♂Cd con una $p=0.0325$ y en el ensayo sin riel ♂Control vs ♂Cd con una $p=0.0028$, los datos que se muestran son los promedios \pm error estándar de la media.

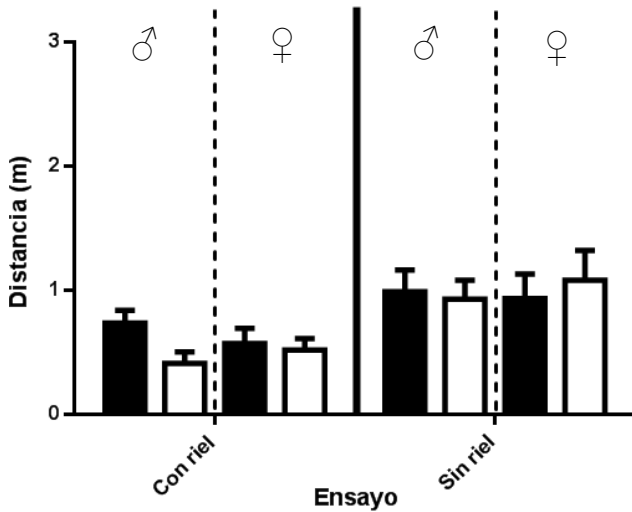


Anexo 10. ANOVA de dos vías. Tiempo de congelamiento en p de los animales del grupo control y del grupo experimental en el ensayo con riel, se encontró diferencias estadísticamente significativas en ♀Control vs ♀Cd con una $p=0.0130$, y en el ensayo sin riel se encontró diferencias estadísticamente significativas en ♂Control vs ♂Cd con una $p=0.0021$ y ♀Control vs ♀Cd con una $p=0.0080$, los datos que se muestran son los promedios \pm error estándar de la media, *hay diferencias estadísticamente significativas.



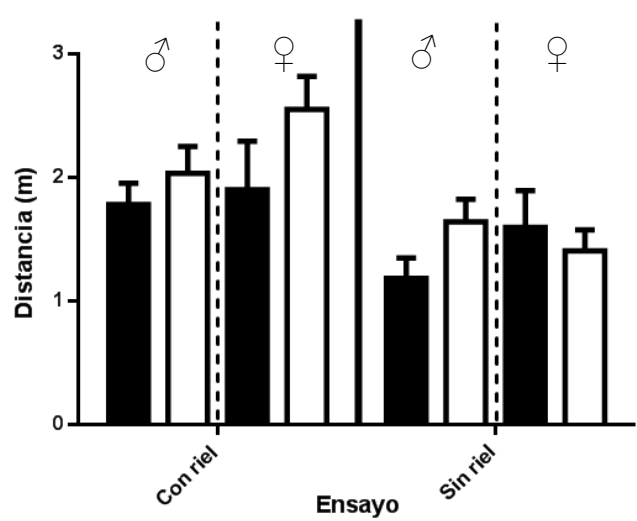
Anexo 11. ANOVA de dos vías. Tiempo de congelamiento en op de los animales del grupo control y del grupo experimental en los ensayos con riel, se encontró diferencias estadísticamente significativas en ♀Control vs ♀Cd con una $p=0.0229$, y en el ensayo sin riel se encontró diferencias estadísticamente significativas en ♀Control vs ♀Cd con una $p=0.0024$, los datos que se muestran son los promedios \pm error estándar de la media, *hay diferencias estadísticamente significativas.

Distancia recorrida en a



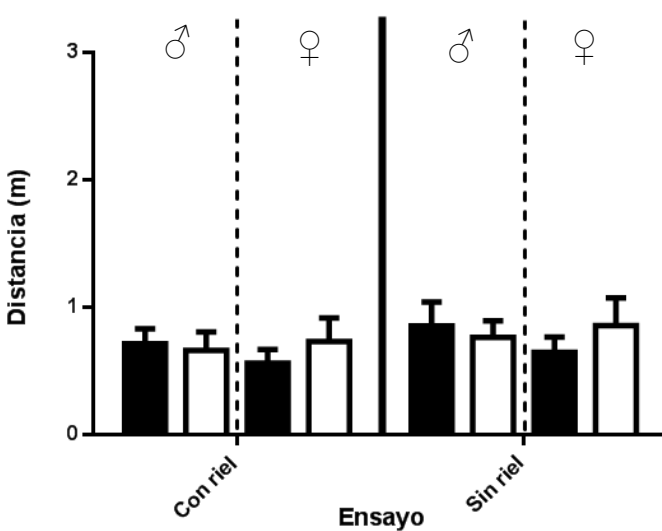
Anexo 12. ANOVA de dos vías. Distancia recorrida de los animales del grupo control y del grupo experimental en a, dos ensayos con riel, y sin riel, no hay diferencias estadísticamente significativas, los datos que se muestran son los promedios \pm error estándar de la media.

Distancia recorrida en oa



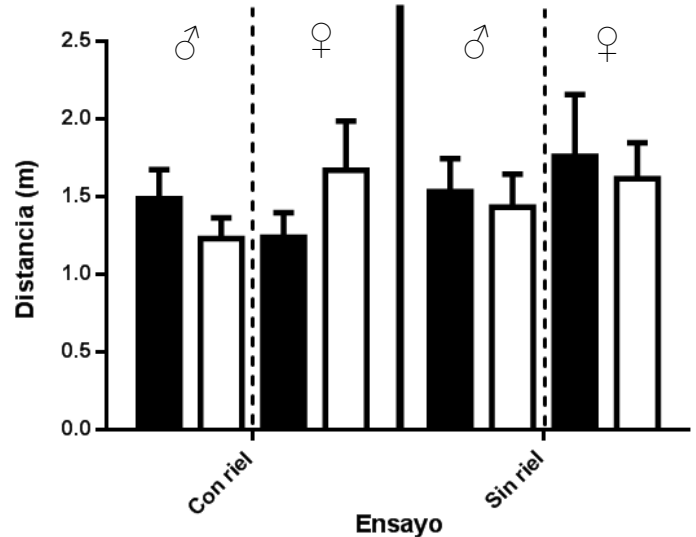
Anexo 13. ANOVA de dos vías. Distancia recorrida de los animales del grupo control y del grupo experimental en oa, dos ensayos con riel, y sin riel, no hay diferencias estadísticamente significativas, los datos que se muestran son los promedios \pm error estándar de la media.

Distancia recorrida en p

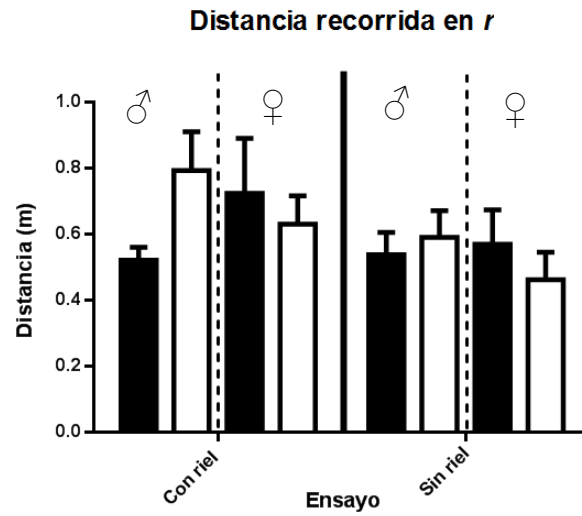


Anexo 14. ANOVA de dos vías. Distancia recorrida de los animales del grupo control y del grupo experimental en p, dos ensayos con riel, y sin riel, no hay diferencias estadísticamente significativas, los datos que se muestran son los promedios \pm error estándar de la media.

Distancia recorrida en op

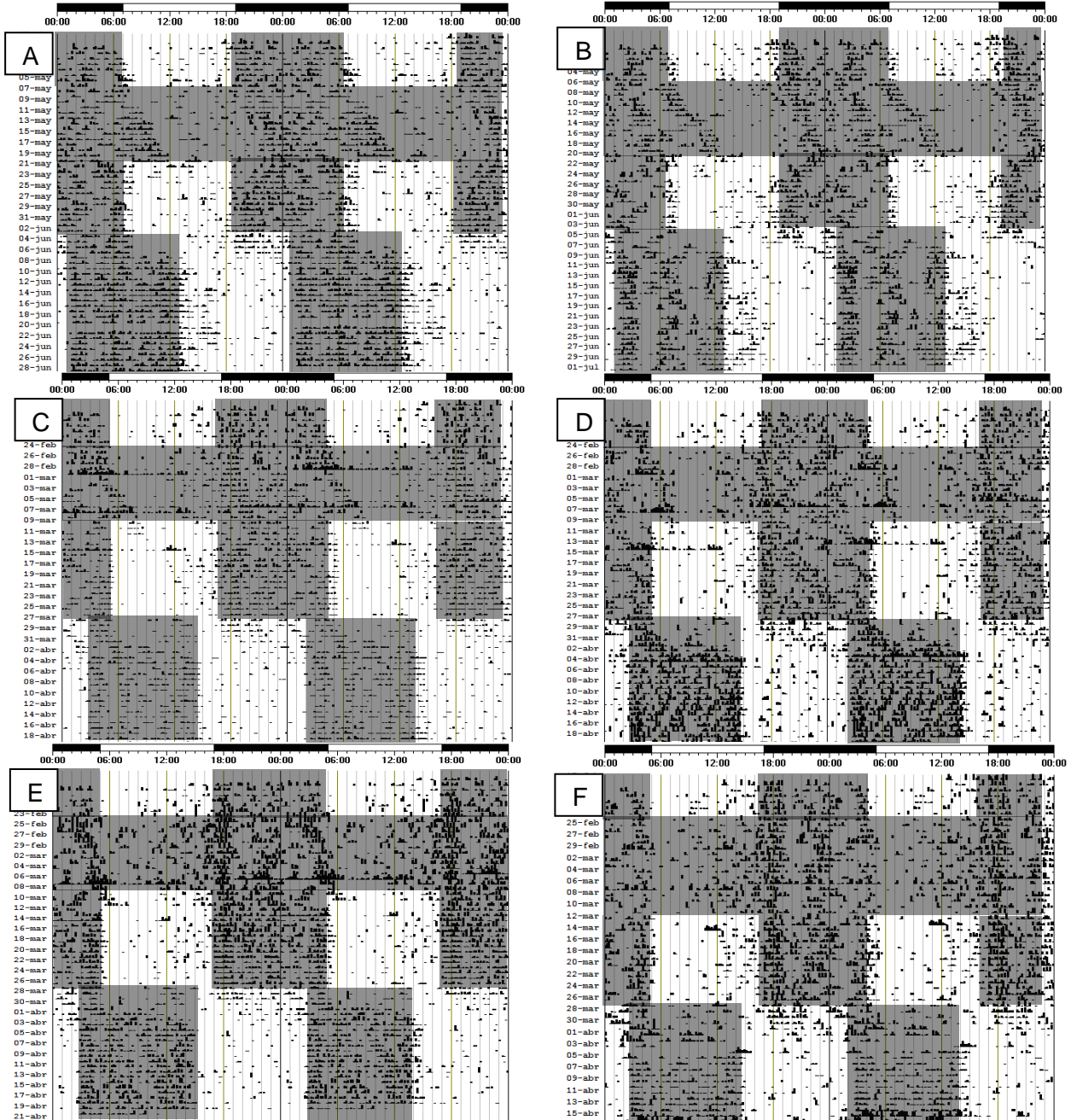


Anexo 15. ANOVA de dos vías. Distancia recorrida de los animales del grupo control y del grupo experimental en op, dos ensayos con riel, y sin riel, no hay diferencias estadísticamente significativas, los datos que se muestran son los promedios \pm error estándar de la media.



Anexo 16. ANOVA de dos vías. Distancia recorrida de los animales del grupo control y del grupo experimental en *r*, dos ensayos con riel, y sin riel, no hay diferencias estadísticamente significativas, los datos que se muestran son los promedios \pm error estándar de la media.

11.3 Actogramas individuales



Anexo 17. Actogramas de animales pertenecientes al grupo control (A, C y E) y al grupo experimental (B, D y F), bajo diferentes condiciones de luz, LO (7 días) con encendido y apagado de luces 7:19 (A y B) y 5:17 (C, D, E y F), OO (15 días), LO (15 días) con encendido y apagado de 7:19 y retraso del encendido de las luces con 6 horas de atraso (15 días) con encendido y apagado de las luces de 13 a 1 (A y B) y 8 horas de retraso con encendido y apagado de las luces de 3:15 (C, D, E y F).