



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

“Desincronización circadiana durante la lactancia
y su efecto en el metabolismo energético”.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS

PRESENTA:

MADAHÍ PALMA GÓMEZ

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Carolina Escobar Briones, Facultad de Medicina, UNAM.

PRESIDENTE

Dr. Mauricio Díaz Muñoz, Instituto de Neurobiología UNAM,
Campus Juriquilla, Querétaro

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Noviembre 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Agradecimientos.....	4
RESUMEN.....	5
ABSTRACT.....	6
Introducción.....	7
Antecedentes.....	10
El núcleo supraquiasmático y la sincronización a la luz.....	10
Genes reloj.....	12
Pérdida de ritmicidad circadiana por exposición a la luz constante.....	15
Desarrollo del sistema circadiano.....	16
Planteamiento del problema.....	18
Objetivo general.....	19
Hipótesis general.....	19
PUBLICACION #1.....	20
Objetivos específicos.....	20
Hipótesis específicas.....	20
PUBLICACIÓN #2.....	36
Objetivos.....	36
Objetivos específicos.....	36
Hipótesis específicas.....	37
Materiales y método.....	38
Animales y condiciones generales.....	38
Consideraciones Éticas.....	38
Diseño Experimental.....	39
Intercambio de madres lactantes.....	39
Registro automatizado de actividad general.....	40
Obtención de tejido.....	41
Histología de la retina.....	41
Proyecciones de la retina hacia el NSQ.....	42
Respuesta del NSQ a un pulso de luz.....	43

Resincronización ante un avance de fase de 6 horas.....	43
Análisis estadístico.....	44
RESULTADOS.....	45
La luz constante indujo alteraciones en la morfología de la retina a corto y a largo plazo.....	45
Las condiciones constantes de luz indujeron un decremento en la densidad de inervación hacia el NSQ.....	50
La respuesta de c-Fos en el NSQ después de un pulso de luz se redujo en animales expuestos a LL.....	51
Las ratas expuestas a condiciones de luz constante durante la lactancia Tardaron más ciclos transitorios para sincronizarse después de un avance de fase de 6 horas.....	52
DISCUSION.....	54
CONCLUSIONES.....	60
LISTA DE ABREVIATURAS.....	61
AGRADECIMIENTOS.....	62
REFERENCIAS.....	63

AGRADECIMIENTOS

"La gratitud es el sentimiento que más humildad concentra y más amor expande"

(Anónimo)

La elaboración de esta Tesis Doctoral hubiese sido imposible sin el apoyo de familiares, amigos, maestros y colegas.

Gracias Papá y Mamá por ayudarme a ser un mejor ser humano, por apoyar mis valores y decisiones, por darme su apoyo constante y sin condiciones, los AMO, los admiro y estoy orgullosa de ambos. Gracias a mi hermano, por su paciencia y tolerancia tanto en las buenas como en las no tan buenas. Por compartir cosas más allá de lo académico y ser mi amigo, también te Amo. A Goyito, Isma y Villa...hasta donde estén, muchas muchas gracias por todo.

Gracias a la UNAM por darme la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral e investigación en sus instalaciones (474129/276019 CONACYT).

Gracias a mis grupos de amigas y amigos que han sido parte de esta Tesis Doctoral, especialmente a los que han permanecido hasta que esta Tesis se concluyera, gracias por seguir apoyándome para todo lo que aún viene. Gracias por la escucha, por enseñarme y ser maestros, por asumir retos y compartir todo tipo de momentos. Gracias a mis amigos Psicólogos, Científicos y de otras áreas, a mi grupo de Ballet y de entrenamiento. Gracias a Intensillos por tantos años de amistad. Gracias a mis amigos de meditación y a mis amigos Salva perros, nos faltan muchos más. Gracias a todos los que se sumaron en este último año, no terminaría de escribir el nombre de cada uno y una de ustedes.

Gracias a Johns Hopkins University (JHU). Al Dr. Samer Hattar por permitirme aprender en su laboratorio, gracias por ser un gran Científico, pero también un gran ser humano, Gracias al Dr. Diego Fernández por toda su paciencia para enseñar y por todas las nuevas técnicas aprendidas, aun cuando los resultados obtenidos en JHU no aparecen en esta tesis. A las personas que apoyaron el proyecto de Donadora para poder realizar mi estancia de Investigación (JHU), especialmente a José Luis Montero, a Federico y a Carlos Islas.

A la Dra. Marisela Morales por permitirme aprender en su laboratorio y hacerme sentir como en casa. Al Dr. Jorge, a la Dra. Flavia y a cada uno de los miembros de su laboratorio por toda su paciencia.

RESUMEN

La exposición a la luz durante la noche en roedores nocturnos genera arritmicidad en el sistema circadiano. En roedores nocturnos adultos se ha demostrado que las condiciones de luz constante contribuyen al desarrollo de alteraciones fisiológicas y conductuales, incluyendo ganancia de peso y enfermedades metabólicas. Durante las etapas tempranas del desarrollo, el sistema circadiano atraviesa por un periodo crítico de ajuste y es especialmente vulnerable a las condiciones del ciclo luz-oscuridad, generando efectos a largo plazo. En esta tesis doctoral, hipotetizamos que la ausencia de un ciclo diario de luz-oscuridad durante la etapa de lactancia, afectaría el desarrollo del sistema circadiano ocasionando efectos adversos a corto y largo plazo sobre el metabolismo y el funcionamiento del sistema circadiano.

Se exploraron en crías de rata los efectos de condiciones de luz-oscuridad (LO), oscuridad constante (OO) y luz constante (LL) durante la etapa de lactancia. A corto plazo, LL causó una reducción en el grosor de la capa de fotorreceptores y en el número de células ganglionares de la retina. La inyección de trazador retrogrado (subunidad B de la toxina de cólera, CTB) nos indicó una disminución en la inervación hacia el núcleo supraquiasmático (NSQ) en los animales expuestos a LL en comparación con los animales de los grupos OO y LO y se observó una pérdida del ritmo circadiano en células inmunorreactivas a VIP, AVP y PER1 en el NSQ. A nivel metabólico se observó mayor peso corporal y pérdida de ritmicidad en variables metabólicas. Tras el periodo de lactancia los animales fueron expuestos a un ciclo normal LO hasta alcanzar la adultez. Al día P90, el NSQ de los animales criados bajo LL y OO durante la lactancia, mostraron una disminución en el número total de células inmunoreactivas a VIP, AVP y PER1, comparados con los animales bajo LO. A largo plazo la ritmicidad diaria de la actividad locomotora fue restaurada, pero no la de glucosa y los triacilglicéridos.

Después de exponer a los animales a un pulso de luz durante 1 h a la mitad de su fase de oscuridad, los animales criados bajo LL y OO mostraron un decremento en la expresión de células positivas a c-Fos y ambos grupos demostraron poca flexibilidad para adaptarse a un cambio de fase de 6 h.

Nuestros resultados demuestran que las condiciones constantes de luz durante la etapa de lactancia alteran permanentemente el desarrollo del sistema circadiano, y de la retina, lo cual repercute en la respuesta del NSQ a la luz y tiene un impacto permanente sobre la regulación metabólica.

ABSTRACT

Exposure to light at night induces arrhythmicity in the adult circadian system. This condition in adult rodents contributes to the development of physiological and behavioral alterations, including weight gain and metabolic disease. During early stages of development, the circadian system undergoes a critical period of adjustment and it is especially vulnerable to altered lighting conditions leading to long-term effects. In the present study we hypothesized that lack of the light-dark cycle during lactation would impair the development of the circadian system and result in short and long term adverse effects on metabolism and on the function of the circadian system.

Here we explored, in rat pups, effects of different lighting conditions: light dark (LD), constant darkness (DD) and constant light (LL) during lactation. In a short-term, LL caused in the retina a reduction in the thickness of the photoreceptors layer and in the number of ganglion cells. Injection of the CTB tracer indicated a decrease in the innervation to the suprachiasmatic nucleus (SCN) when compared with DD and LD groups and a reduction of the total number of cells and loss of rhythmicity of VIP, AVP, and PER1 in the SCN. When the circadian rhythmicity was disrupted, at the metabolic level, we found an increase in body weight and a loss of rhythmicity in the metabolic variables such as glucose and triacylglycerides. After lactation animals were exposed to a LD cycle until adulthood. At P90, animals under LL and DD showed a decreased number of immunoreactive cells to VIP, AVP, and PER1, as compared with the LD group. In the long-term the rhythmic behavior was restored, but the plasma glucose, and triacylglycerides (TG) did not recover rhythmicity.

After exposing rats to a 1h light pulse, animals reared under LL and DD showed a decreased number of c-Fos positive cells and both groups were slower to re-entrain to a new LD cycle after a sudden 6h phase advance.

Present results point out that constant lighting conditions during early development induce long term effects in the development of the circadian system and the retina, which impaired the SCN to respond to light and resulted in permanent impact on metabolic regulation.

1- Introducción

Los organismos realizamos diariamente una serie de funciones para sobrevivir, cada respuesta o función adaptativa requiere de la interacción de varios órganos y sistemas (Touitou y Haus, 1994). Estos sistemas además de estar constituidos por estructuras especializadas cuentan con vías para la entrada y vías para la salida de información.

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

En condiciones naturales, los ritmos biológicos se ajustan al ciclo LO. De esta manera, un sincronizador o indicador temporal usualmente llamado *zeitgeber* (del alemán *zeit*, tiempo; *geber*, indicador, dador), pone en hora a los ritmos diarios. Sin embargo, dado que en ausencia del *zeitgeber* la mayoría de estos ritmos se mantienen o persisten con un carácter circadiano, se ha postulado la presencia de un mecanismo interno de medición temporal llamado sistema circadiano. De esta manera, la manifestación de un ritmo biológico sincronizado se genera de la interacción de tres componentes: *zeitgeber* (componente exógeno), reloj biológico (componente endógeno) y los ritmos biológicos propiamente, así como las relaciones entre estos: la sincronización entre el componente exógeno, endógeno y el acoplamiento entre el reloj y los ritmos (Diez et al., 1996).

La periodicidad del ciclo luz/oscuridad (LO) generada por el movimiento de rotación de la Tierra es la principal señal temporal que guía al reloj circadiano o núcleo supraquiasmático (NSQ) del hipotálamo. La pérdida de relación entre el ciclo LO con el NSQ genera desincronización circadiana; una de las causas de esta condición se presenta cuando los individuos se exponen a luz durante la noche o a condiciones constantes de luz (LL). Evidencia de estudios experimentales y clínicos ha demostrado que la exposición a luz durante la noche afecta negativamente el sistema circadiano y genera alteraciones metabólicas y fisiológicas (Fonken & Nelson, 2014), incluyendo sobrepeso y dislipidemia (Evans & Davidson, 2013; Laermans & Depoortere, 2016).

El estilo de vida moderno favorece la exposición excesiva a la luz eléctrica, a pantallas con luz brillante a altas horas de la noche como las computadoras y la televisión. Especialmente los niños y jóvenes han adoptado el hábito de exponerse a la luz durante la noche y posponer las horas de dormir (Stevens & Zhu, 2015), lo cual promueve la desincronización circadiana. En la vida intrauterina hay evidencias del inicio del funcionamiento del marcapasos endógeno, así como de la aparición tanto del sueño tranquilo como del sueño activo, durante las últimas 10 semanas de la gestación (Mirmiran et al., 2003). Durante la gestación los ritmos circadianos de la madre predominan y transmiten las variaciones al feto, de manera que, desde el tercer trimestre del embarazo y las primeras semanas de vida extrauterina, el sistema circadiano inmaduro del feto y del lactante se sincroniza con el medio ambiente a través de las influencias maternas.

Por lo anterior, una población vulnerable a las condiciones de LL, son los recién nacidos; estudios epidemiológicos y experimentales demuestran que, a nivel mundial 14%, de los recién nacidos con bajo peso al nacer, son expuestos a un ambiente de luz constante en las unidades de cuidados intensivos neonatales (UCIN). Los recién nacidos con bajo peso al nacer, que permanecen en las UCIN, muestran una pérdida del ciclo sueño-vigilia (Mann et al., 2000) y dificultad para alcanzar un peso saludable (Brandon et al., 2002).

En mamíferos las etapas pre y postnatales del desarrollo son etapas críticas que determinan la formación de órganos y estrategias de regulación a nivel del

sistema nervioso central y periférico y puede tener un fuerte impacto en sus ritmos circadianos durante su vida posterior, influyendo y modulando la manera en que se regularán sus respuestas endocrinas, fisiológicas, metabólicas y la organización funcional del sistema circadiano a largo plazo.

Los mecanismos que asocian el sobrepeso con la desincronización circadiana desencadenada por LL no han sido del todo explorados. Se ha propuesto que a nivel de órganos periféricos las señales temporales desacopladas o fuera de fase generan la pérdida de sincronía entre la ingestión de alimento, los procesos digestivos, la liberación de hormonas y los ritmos de órganos involucrados en el metabolismo, esta desregulación favorece un almacenamiento y acumulación de tejido graso. Turek et al., (Turek, et al., 2005), reportaron que la mutación del gen CLOCK en ratones, generaba modificaciones en su patrón diario de actividad, induciendo un cambio en su patrón de alimentación. Los ratones mutantes de CLOCK desarrollaron hiperfagia, obesidad, hiperlipidemia, hiperglucemia, hipercolesterolemia e hipoinsulinemia además de esteatosis hepática. El presente proyecto exploró los efectos de la exposición a condiciones constantes de luz al final de la etapa de lactancia (P23) y al final de la etapa adulta (P90) sobre el sistema circadiano y sobre variables metabólicas.

1.1 Antecedentes

La rotación y traslación de la tierra dotan al medio que nos rodea de una ritmicidad diaria generada por las condiciones de luz y temperatura. Estos cambios conllevan una serie de comportamientos como las migraciones, la reproducción estacional o el ajuste del periodo de actividad al periodo óptimo del día.

Se conoce como "ritmos biológicos" a la recurrencia de fenómenos dentro de un sistema biológico con intervalos regulares de tiempo siendo por tanto previsibles (Mora & Sanguinetti, 2004). Las características de los ritmos biológicos están determinadas genéticamente, y una vez establecidos, son generados por el propio organismo independientemente de las variables externas, es decir, son endógenos (Gruart et al., 2002). De hecho, en condiciones constantes de luz y temperatura los ritmos manifiestan su frecuencia intrínseca (tienen un curso libre). Por otro lado, Jürgen Aschoff extendió el concepto, hallando periodicidades "circamareales", "circalunares" y "circanuales", dependiendo del ciclo ambiental al que se ajuste, así los ritmos con un periodo menor a 24 h. se les designa *ultradianos*, como el ritmo cardiaco o la actividad eléctrica cerebral e *infradianos* con un periodo mayor a 24 h., como el ciclo menstrual o la hibernación.

La rotación de la Tierra impone a los seres vivos cambios asociados al ciclo del día y la noche, a oscilaciones en la temperatura ambiental, en la humedad, etc. Estos ciclos diarios le imponen a todo individuo un reto a nivel adaptativo que requiere de ajustes en su fisiología y su conducta para anticiparse y emitir respuestas óptimas sincronizadas a lo largo del día (Golombek & Rosenstein, 2010). Para lograr la adaptación los seres vivos cuentan con un reloj circadiano que dirige respuestas cíclicas en la fisiología y la conducta asociadas a los ciclos diarios ambientales.

1.2 El núcleo supraquiasmático y la sincronización a la luz

El Núcleo Supraquiasmático del hipotálamo (NSQ) es el reloj biológico que genera y transmite la ritmicidad al resto del organismo y funciona como marcapasos del sistema circadiano. Su lesión provoca que la rata se vuelva

arrítmica a nivel conductual y fisiológico (Moore & Eichler 1972; Stephan & Zucker 1972).

El NSQ es una estructura bilateral ubicada en el hipotálamo anterior, dividido en 2 regiones: ventrolateral (VL) y dorsomedial (DM) (Moore et al., 2002). La región VL contiene células que expresan principalmente el péptido vasoactivo intestinal (por sus siglas en inglés, VIP); las neuronas de esta región reciben información fótica a través del tracto retinohipotalámico (TRH) (Hattar et al., 2002; Panda et al., 2005) permitiendo la sincronización fótica (Duffy & Wright, 2005).

En mamíferos, más allá de las aferencias de diversas zonas cerebrales (como el tálamo o los núcleos del rafe), la principal vía de entrada a los NSQ es a partir del TRH por la detección de la luz desde la retina (Hattar et al., 2003; Wassle & Haverkamp 2006) que se da a través de los conos, bastones y un tercer tipo de células llamadas células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (CGif) a la luz y que expresan melanopsina (Hattar et al., 2003; Wassle & Haverkamp 2006); de esta forma, la retina envía información acerca de los estímulos lumínicos a través del TRH al NSQ. La vía que se origina en las CGif y proyecta hacia el NSQ provee de información acerca del ciclo LO para orquestar las funciones circadianas (Chen et al., 2011, Gooley et al., 2001). Se ha descrito que las CGif M1 Brnb-negativo son las encargadas de enviar la información lumínica que después será coordinada por el NSQ para coordinar los ritmos circadianos fisiológicos y conductuales (Chen et al., 2011, LeGates et al 2012).

En cuanto a los fotorreceptores y la melanopsina asociada a la sincronización fótica circadiana, se ha demostrado que ratones ciegos (de la cepa rd/rd, que carecen de bastones) mantienen la sincronización fótica de sus ritmos circadianos (Foster et al., 1991; Lucas, 1999), además, animales con ablaciones genéticas del NSQ son capaces de mostrar ritmicidad en órganos periféricos y esta ritmicidad está asociada al ciclo LO (Husse et al., 2014), lo cual nos habla de otro tipo de sincronización, la no fótica e independiente al NSQ.

La relevancia de la luz como principal sincronizador fótico en mamíferos se ha puesto en evidencia con diversos modelos genéticos que han demostrado que

animales que carecen de las CGif y la innervación correspondiente hacia el NSQ carecen de la capacidad de establecer un reloj biológico funcional (Gooley et al., 2001; Morin et al., 2003; Sollars et al., 2003; Hannibal & Fahrenkrug, 2004). Por otro lado, en modelos con animales mutantes se ha demostrado que la carencia de células VIP en el NSQ afecta el ritmo de la actividad locomotora y la actividad eléctrica en el NSQ (Brown et al., 2007). La región DM contiene principalmente neuronas que expresan el péptido arginina vasopresina (por sus siglas en inglés, AVP) (Mieda et al., 2015a), esta región se caracteriza por ser un relevo de información entre el NSQ y diferentes núcleos cerebrales y órganos periféricos. Las neuronas de AVP se han relacionado también con la longitud del periodo a lo largo de un ciclo de 24 h (Li et al., 2009; Mieda et al., 2015a).

Es importante mencionar que ante cambios abruptos en el ciclo LO los principales genes reloj son capaces de adaptarse al cambio en el nuevo ciclo, principalmente en la región ventrolateral del NSQ y después en la región dorsomedial (Fernandez et al., 2016), dicho proceso de resincronización puede tomar de 6 a 13 días (Yamazaki, et al., 2000, Nakamura, 2005).

1.3. Genes reloj

El mecanismo molecular del reloj circadiano central y los osciladores circadianos periféricos involucra la interacción de señales positivas y negativas que regulan la transcripción rítmica de los genes reloj. Cada célula posee un reloj molecular interno que, gracias a la acumulación y degradación de ciertas proteínas asegura la periodicidad circadiana. Los principales componentes que en el reloj de los mamíferos son: el gen Circadian Locomotor Output Cycles Kaput, (CLOCK), y el gen receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos en cerebro y músculo (Bmal1), como elementos positivos. Los genes periodo (Per) Per1, Per2 y Per3 y los criptocromos (Cry) Cry1 y Cry2, como elementos negativos (Reppert & Weaver, 2002; Ko& Takahashi, 2006). El gen per1 es un participante clave en el ciclo de retroalimentación molecular y está involucrado en restablecer el reloj neural endógeno a las señales de luz (Albrecht, et al., 2001; Nagano, et al., 2009). El componente positivo del circuito de retroalimentación está integrado por las proteínas CLOCK y BMAL1, que

forman heterodímeros en el citoplasma y se trasladan al núcleo, donde activan la transcripción de los genes reloj Per y Cry y genes controlados por reloj (CCG), entre los que se incluyen el gen de vasopresina (AVP), (Jin et al., 1999; López-Molina et. al, 1997) y también genes reguladores que son claves del ciclo celular y del metabolismo (Ko & Takahashi, 2006). El circuito de retroalimentación negativa comprende los heterodímeros PER: CRY, que se translocan al núcleo donde suprimen su propia transcripción al inhibir la actividad de CLOCK y BMAL1. Mientras tanto, la proteína del receptor nuclear de la subfamilia 1, grupo B, miembro1 (REV-ERBa) suprime la transcripción de Bmal1 al unirse a los elementos que conforman la respuesta a Rev-erba y del receptor huérfano relacionado a RAR (RORA) presente en su promotor. Cuando los niveles de ARN de Bmal1 disminuyen, mientras que los de Per y Cry aumentan. Cuando los heterodímeros PER: CRY suprimen su propia transcripción a nivel nuclear (actuando sobre CLOCK-BMAL1), también inhiben la transcripción de Rev-erba, permitiendo que se active la transcripción de Bmal1. La frecuencia aproximada de 24 horas del reloj molecular, van a generar modificaciones postraduccionales, como la fosforilación y la ubiquitinación, y afectarán la estabilidad y la translocación de los genes del reloj al núcleo. De esta manera, la caseína quinasa 1 epsilon (CK1 ϵ) y la caseína quinasa 1 delta (CK1 δ) son los factores críticos que modulan el funcionamiento del reloj. La importancia de estas modificaciones postraduccionales de los componentes del reloj queda demostrada por estudios que muestran que las mutaciones en CK1 ϵ tienen un efecto sobre la periodicidad circadiana. (Reppert & Weaver, 2002, Preitner et al., 2002).

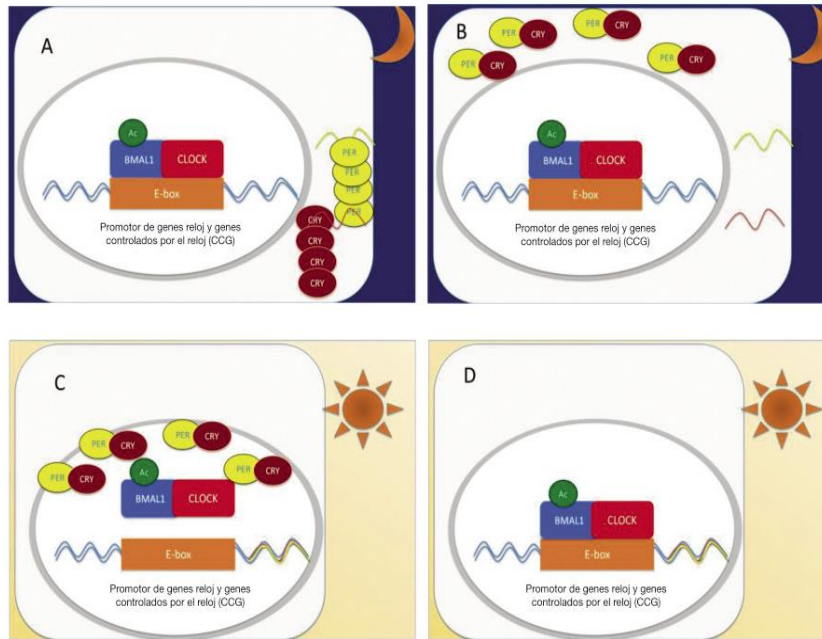


Figura 1. Esquema del reloj molecular. A). Durante la noche, los factores de transcripción BMAL1 y CLOCK se unen a una secuencia de ADN sobre las cajas E-BOX favoreciendo la expresión de los genes reloj Per y Cry. B). Estos genes dan lugar a la síntesis de las proteínas PER y CRY, que se dimerizan y se acumulan en el citoplasma de la célula. C). Al comenzar el día, los dímeros PER-CRY translocan al interior del núcleo donde producen el desacoplamiento de BMAL1 y de CLOCK, por lo tanto, se suprime la expresión de los genes Per y Cry. D) Al final del día, los dímeros PER-CRY son degradados y comienza un nuevo ciclo mediante el acoplamiento de BMAL1 y de CLOCK. Tomado y modificado de Madrid, J.A. Laboratorio de Cronobiología, 2018, Universidad de Murcia.

De suma relevancia es que la CK1 ϵ fosforila las proteínas PER, por lo que no están disponibles inmediatamente para formar dímeros, lo que lleva a un ciclo circadiano con un período más largo. Cuando este gen muta y la proteína muestra una actividad de fosforilación reducida, las proteínas PER se internalizan en el núcleo más rápidamente, acortando el ciclo (Preitner et al., 2002, Albrecht & Ripperger, 2009; Ko & Takahashi, 2006).

1.4. Pérdida de ritmicidad circadiana por exposición a la luz constante

Los ritmos biológicos tendrán relevancia adaptativa siempre y cuando se presenten en concordancia con los ciclos ambientales. Para ello se requiere la sincronización del reloj circadiano con las señales externas. La sincronización se define como el proceso biológico en el cual el tiempo endógeno del reloj circadiano se ajusta al de una señal periódica externa (Roenneberg et al., 2003).

El fenómeno de sincronización requiere que el sistema circadiano (el reloj y sus osciladores) establezca una relación de fase específica con el sincronizador, para lo que es necesaria la sensibilización de los osciladores endógenos a señales ambientales específicas y la habituación a otras. Para que el oscilador sea funcional, estas señales de tiempo deben de ser periódicas y predecibles para el organismo, lo que provoca un ajuste o sincronización del periodo del sistema circadiano al de la señal externa, llamada zeitgeber o sincronizador (Reppert & Weaver, 2002). Previamente se ha demostrado que la LL o la luz aplicada durante la noche en roedores adultos induce una pérdida de la ritmicidad en la actividad eléctrica del NSQ y en la expresión de AVP, VIP y PER1 en el NSQ (Isobe & Nishino, 1998; Ohta, et al, 2005).

Cuando se pierde la periodicidad de la luz y esta se presenta en forma continua y constante, se ha señalado la desincronización por un ciclo de LL o por ausencia total de luz u OO (Gruart y Cols., 2002). La condición de LL en roedores nocturnos adultos también induce la pérdida de los patrones conductuales circadianos y el equilibrio metabólico, lo que puede producir dislipidemia y sobrepeso (Fonken et al., 2010; Kooijman et al., 2015). Es importante resaltar que tanto los roedores nocturnos como los diurnos se ven afectados por la exposición a LL. Un estudio realizado en un roedor diurno (*Arvicanthis ansorgei*) demostró que la LL altera la expresión de los genes reloj en la retina (Bobu et al., 2013). En ratas se demostró que la luz tenue durante la fase de oscuridad es capaz de inducir un fenotipo depresivo (Tapia et al., 2013) y reducción de la longitud dendrítica en el hipocampo (Fonken et al., 2012).

1.5. Desarrollo del sistema circadiano.

Durante la gestación y la lactancia, el sistema circadiano no está completamente maduro, y se somete a importantes ajustes de desarrollo hasta las primeras 3 semanas postnatales (Shibata & Moore, 1988). Se ha demostrado que la exposición gestacional a LL generó la desincronización de los ritmos de AVP y c-Fos en el NSQ de ratones recién nacidos, dichos déficits fueron restaurados a través de la aplicación de un protocolo de alimentación restringida (Nováková, et al., 2015). El NSQ neonatal en roedores puede percibir cambios en la luz ambiental incluso días antes de que el animal abra los ojos (Sumova et al., 2012). El ajuste de su funcionalidad y conexiones ocurre durante las dos primeras semanas posnatales (Bendová et al., 2004, Shibata & Moore, 1987), y durante este período de desarrollo, el NSQ es vulnerable a la experiencia ambiental de iluminación posnatal (Canal-Corretger et al., 2001; Sumova et al., 2012). Poco se sabe acerca de cómo la ausencia del ciclo LO en las primeras etapas de desarrollo puede afectar los sistemas circadiano y metabólico.

El sistema circadiano tiene una gran influencia sobre sistemas cerebrales para la regulación de las funciones metabólicas, ya que las necesidades energéticas cambian alrededor de las 24 h (Buijs et al, 2003). El sistema circadiano influye sobre el ciclo vigilia/sueño. La vigilia se caracteriza porque predomina la actividad física, el desgaste energético y también el consumo de alimento y agua, en este caso los órganos deben prepararse para el consumo energético, la digestión y utilización de nutrientes. Por el contrario, durante el sueño se ahorra y se almacena energía, se reducen los procesos digestivos y se llevan a cabo procesos de reparación celular, de descanso, etc. (Siegel, 2005). El sistema circadiano influye sobre el sistema nervioso autónomo y el sistema endocrino (Buijs, et al. 2003) sobre los requerimientos energéticos que afectan a todos los tejidos y órganos del cuerpo (Buijs, et al. 2003). Durante el día, las señales de ambos sistemas activan tejidos y órganos para la producción de glucosa y de enzimas gástricas, para aumentar la secreción de insulina, favoreciendo la utilización de energía a lo largo del día y para generar todos los cambios necesarios en la respiración y flujo sanguíneo que permitan el buen

desempeño de estas actividades. Durante la noche se secreta la melatonina, hormona conocida por sus efectos inductores del sueño y por su actividad de reparación celular, particularmente por sus efectos antioxidantes (Krueger, et al., 2008; Siegel, 2005). También aumenta la producción de hormona de crecimiento que contribuye a la síntesis de proteínas para reparación celular (Qidwai, et al., 2010). Se ha sugerido que el sueño también es necesario para que se lleven a cabo funciones de formación de memorias y de organización mental, de descanso muscular y de ahorro energético.

A nivel cerebral, los principales efectos de las condiciones constantes de iluminación durante la lactancia incluyen una disminución en el número de neuronas y células gliales en el NSQ (Cambras et al., 2005; Canal et al., 2009) y una disminución en la expresión de Per1-GFP (Ciarleglio et al., 2009). A corto plazo se ha demostrado una disminución en el número de células positivas a c-Fos y tirosina hidroxilasa (TH) en el NSQ después de un pulso de luz (Brooks et al., 2011; Smith & Canal, 2009).

Estos hallazgos han llevado a sugerir que para el sistema circadiano la gestación y la lactancia son etapas críticas en las que diversos factores pueden modificar su estructura y funcionamiento, generando efectos a largo plazo. Esta condición favorece a largo plazo el sobrepeso y desregulación en variables metabólicas.

2. Planteamiento del problema

Durante el periodo de desarrollo, tanto procesos metabólicos como la organización circadiana transcurren por periodos críticos en los que las condiciones del ambiente temprano pueden determinar estrategias de regulación a largo plazo. En ratas adultas la desincronización circadiana se ha asociado con mayor propensión a desarrollar sobrepeso y enfermedades metabólicas, razón por la que hipotetizamos que la exposición temprana a condiciones constantes de luz alteran el desarrollo del sistema circadiano y repercutir sobre variables metabólicas. Ratas adultas mantenidas en un ambiente arrítmico por condiciones de LL, incrementan su peso significativamente comparadas con aquellas mantenidas en un ambiente de alternancia LO. Este proyecto tuvo como principal objetivo determinar las consecuencias que tiene un ambiente arrítmico postnatal sobre la función del sistema circadiano y sobre variables metabólicas tales como, la glucosa y los triacilglicéridos. Específicamente se exploró la vía de sincronización fótica al NSQ, la morfología del NSQ y la regulación temporal de procesos metabólicos, el peso corporal y el balance energético, para determinar los efectos a largo plazo.

3. Objetivo general.

Determinar en crías de rata *Wistar*, expuestas a la falta de un ambiente cíclico (LO) inducido por condiciones constantes de luz durante la etapa de lactancia, los efectos a corto y largo plazo sobre el sistema circadiano y sobre variables metabólicas tales como los triacilglicéridos y la glucosa.

4. Hipótesis general

La falta de un ambiente cíclico inducido por condiciones constantes de luz (LL/OO) durante la etapa lactancia provocará en crías de rata *Wistar* cambios a corto (P23) y a largo plazo (P90) en la vía de sincronización y en el funcionamiento del NSQ. Lo anterior repercutirá en la expresión de ritmos circadianos, en la sincronización a la luz, en la regulación metabólica y generará fototoxicidad en las retinas.

PUBLICACIÓN #1

4.1. Objetivos específicos.

- 1.- Describir los ritmos diarios de actividad locomotora general en ratas sometidas a condiciones constantes de luz durante la lactancia.
- 2.-Cuantificar la ganancia de peso corporal al destete (P23) y durante la etapa adulta (P90) en ratas expuestas a condiciones constantes de luz durante la lactancia.
- 3.-Cuantificar al final de la etapa de lactancia (P23) y al final de la etapa adulta (P90) los niveles de glucosa y triacilglicéridos, en ratas sometidas a condiciones constantes de luz durante la lactancia.
- 4.-Describir al final de la etapa de lactancia (P23) y al final de la etapa adulta (P90) los ritmos de expresión de AVP, VIP y PER 1 en el NSQ en ratas sometidas a condiciones constantes de luz durante la lactancia.

4.2 Hipótesis específicas

- H1. Las ratas sometidas a LL durante la lactancia (P0-P23) mostrarán déficits en sus patrones diarios de actividad locomotora general al destete y en la adultez (P90) en comparación con las ratas mantenidas bajo LO y OO.
- H2. Las ratas expuestas a LL durante la lactancia tendrán una mayor ganancia de peso corporal comparada con las ratas mantenidas bajo LO y OO. La ganancia de peso se mantendrá hasta la etapa adulta.
- H3. Las ratas expuestas a LL durante la lactancia mostrarán arritmicidad en las variables metabólicas (glucosa y triacilglicéridos) al destete (P23) y en la etapa adulta (P90).
- H4. Las ratas expuestas a LL durante la lactancia mostrarán alteración en los ritmos de expresión de AVP, VIP y PER1 en el NSQ al destete (P23) y en la etapa adulta (P90).



Constant light during lactation programs circadian and metabolic systems

Palma-Gómez Madahi, Osnaya Ivan, Balderas Adriana, Ortega Diana, and Escobar Carolina

Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, Mexico City, México

ABSTRACT

Exposure to light at night is a disruptive condition for the adult circadian system, leading to arrhythmicity in nocturnal rodents. Circadian disruption is a risk factor for developing physiological and behavioral alterations, including weight gain and metabolic disease. During early stages of development, the circadian system undergoes a critical period of adjustment, and it is especially vulnerable to altered lighting conditions that may program its function, leading to long-term effects. We hypothesized that during lactation a disrupted light-dark cycle due to light at night may disrupt the circadian system and in the long term induce metabolic disorders. Here we explored in pups, short- and long-term effects of constant light (LL) during lactation. In the short term, LL caused a loss of rhythmicity and a reduction in the immunopositive cells of VIP, AVP, and PER1 in the suprachiasmatic nucleus (SCN). In the short term, the affection on the circadian clock in the pups resulted in body weight gain, loss of daily rhythms in general activity, plasma glucose and triglycerides (TG). Importantly, the DD conditions during development also induced altered daily rhythms in general activity and in the SCN. Exposure to LD conditions after lactation did not restore rhythmicity in the SCN, and the number of immunopositive cells to VIP, AVP, and PER1 remained reduced. In the long term, daily rhythmicity in general activity was restored; however, daily rhythms in glucose and TG remained disrupted, and daily mean levels of TG were significantly increased. Present results point out the programming role played by the LD cycle during early development in the function of the circadian system and on metabolism. This study points out the risk represented by exposure to an altered light-dark cycle during early stages of development.

Abbreviations:

AVP: arginine vasopressin peptide; CRY: cryptochrome; DD: constant darkness; DM: dorsomedial; LD: light-dark cycle; LL: constant light; NICUs: neonatal intensive care units; P: postnatal days; PER: period; S.E.M.: standard error of the mean; SCN: suprachiasmatic nucleus; TG: triglycerides; VIP: vasointestinal peptide; VL: ventrolateral; ZT: zeitgeber time.

ARTICLE HISTORY

Received 16 February 2018
Revised 10 April 2018
Accepted 11 April 2018

KEYWORDS

Constant light;
development; circadian
rhythms; metabolism;
lactation; suprachiasmatic
nucleus

Introduction

The shift of daily activities toward the night is increasing the number of hours that individuals are exposed to light at night. It is known from experimental and clinical studies that light at night affects the circadian system inducing circadian disruption, which is a risk factor for developing metabolic and physiological disturbances (Fonken and Nelson 2014), including overweight and dyslipidemia (Evans and Davidson 2013; Laermans and Depoortere 2016).

Light at night is becoming a threat not only for the adult population but for younger individuals: babies and young children in the daily family

environment are exposed to light for long hours in the night (Cho et al. 2015). Moreover, reports from low-weight newborn infants staying in Neonatal Intensive Care Units (NICUs), where light is usually kept on during the complete 24 h cycle, indicate a loss of the sleep-wake cycle (Mann et al. 1986; Mirmiran and Ariagno 2000) and failure to gain weight (Brandon 2002; Vásquez-Ruiz et al. 2014).

The light-dark (LD) cycle entrains directly the suprachiasmatic nucleus (SCN), the biological clock, that drives circadian rhythms in different organs and systems in mammals (Mohawk et al. 2012). The SCN is a bilateral structure located in the anterior hypothalamus, divided in a

CONTACT Escobar Carolina  escocarolina@gmail.com; cescobar@comunidad.unam.mx  Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad Universitaria, Av. Universidad 3000, México DF CP: 04510

Color versions of one or more of the figures in the article can be found online at www.tandfonline.com/ICBI.

© 2018 Taylor & Francis Group, LLC

ventrolateral (VL) and a dorsomedial (DM) region (Moore et al. 2002). The VL region contains cells that mainly express the vasoactive intestinal peptide (VIP), and these neurons mainly receive photic input via the retinohypothalamic tract (Hattar et al. 2002; Panda et al. 2005), allowing the photic entrainment with the LD cycle (Duffy and Wright 2005). The lack of VIP cells impairs the rhythmicity of locomotor activity (Aton et al. 2005) and of electrical activity in the SCN (Brown et al. 2007). The DM region mainly contains neurons that express the arginine vasopressin peptide (AVP) (Mieda et al. 2015). This region is related to the clock mechanisms transmitting the circadian message to other brain areas and to the periphery (Li et al. 2009; Mieda et al. 2015).

At the cellular level, circadian rhythms are driven by two interactive positive and negative transcriptional feedback loops that drive recurrent rhythms of RNA and protein levels of clock genes (Ko and Takahashi 2006). The transcription-translation feedback loop is composed of clock genes such as *Period* (*Per1-3*), *Clock*, *Bmal1*, *Cryptochrome* (*Cry1, 2*), *Rev-erb alpha* and *Rora*. The first loop is composed of the CLOCK-BMAL1 heterodimers that activate the rhythmic transcription of the three *per* genes (*per1*, *per2*, and *per3*) and two cryptochromes (*cry1* and *cry2*) genes. The gene *per1* is a key participant in the molecular feedback loop and is critically involved in resetting the endogenous neural clock to light signals (Albrecht et al. 2001; Nagano et al. 2009). The second loop is induced by CLOCK: BMAL1 heterodimers activating transcription of retinoic acid-related orphan nuclear receptors, *Rev-erba* and *Rora*. REV-ERBa and RORa subsequently compete to bind retinoic acid-related orphan receptor response elements (ROREs) present in the *Bmal1* promoter. The circadian oscillation of *Bmal1* is both positively and negatively regulated by RORs and REV-ERBs (Albrecht and Ripperger 2009; Ko and Takahashi 2006).

Entrainment to the day-night cycle is a crucial strategy to ensure full adaptation of an individual to the cycling environment and to permit efficient responses along the daily temporal cycle (Reppert and Weaver 2002). Constant light (LL) or light at night in adult rodents induces a loss of rhythmicity in the electrical activity and in the expression of AVP, VIP, and PER1 in the SCN (Isobe and Nishino 1998;

Ohta et al. 2005). It also induces the loss of circadian behavioral patterns and a loss of metabolic balance, leading to dyslipidemia and overweight (Baez-Ruiz et al. 2017; Fonken et al. 2010; Kooijman et al. 2015). It is important to highlight that both nocturnal and diurnal rodents are affected by LL exposure. A study performed in a diurnal rodent (*Arvicantis ansorgei*) demonstrated that LL impairs clock gene expression in the retina (Bobu et al. 2013). In grass rats, dim light at night induced depress behavior and reduced dendritic length in the hippocampus (Fonken et al. 2012).

During gestation and lactation, the circadian system is not fully mature, and it undergoes important developmental adjustments until the first three postnatal weeks (Shibata and Moore 1988). Gestational exposure to constant light disrupted rhythms in AVP and c-Fos in the SCN of newborn mice, and this effect was restored by a restricted feeding protocol (Nováková et al. 2015). The neonatal SCN in rodents can perceive changes in environmental light even days before the animal opens the eyes (Sumova et al. 2012). The adjustment of its functionality and connections occur during the first two postnatal weeks (Bendová et al. 2004; Shibata and Moore 1987), and during this developmental period, the SCN is vulnerable to postnatal lighting experience (Canal-Corretger et al. 2001; Sumova et al. 2012). Little is known about how LL in early stages of development may affect the circadian and metabolic systems. Main effects of constant conditions during lactation include a decreased number of neurons and glial cells in the SCN (Cambras et al. 2005; Canal et al. 2009) and a decrease in *Per1*-GFP expression (Ciarleglio et al. 2010) also, a decrease in the number of positive c-Fos and tyrosine hydroxylase cells in the SCN after a light pulse (Brooks et al. 2011; Smith and Canal 2009).

Knowing that a disrupted circadian system leads to a loss of metabolic balance, in this study, we aimed to explore the short- and long-term effects of LL during lactation on the developing biological clock and on metabolic variables.

Material and methods

Animals and general conditions

Newborn Wistar rats were kept in acrylic cages (45x30x35cm) and housed in soundproof lockers

designed for an automatic monitoring system with controlled lighting conditions, temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), and humidity. Lactating females were exposed to a 12:12h LD cycle; lights-on at 07:00h (Zeitgeber time, ZT0) lights-off at 19:00h (ZT12).

Experimental design

For this study, 4 series of 6–8 primiparous pregnant rats (200–250 grams) were used. The resulting pups were exposed to different lighting conditions, and the effects were evaluated in a short (P23) and a long term (P90). The day of birth (considered postnatal day 0 = P0) litters were adjusted to 10 pups with an equal number of males and females and were randomly assigned to one of the following lighting conditions from P0 to P23:

- LD; pups exposed to a 12:12 light-dark cycle.
- DD; pups in constant darkness.
- LL; pups in constant light (250–350 lux).

To provide an LD cycle to nursing female mothers, pairs of nursing females were organized to be switched every 12 h from the LL litter to the DD litter and back. As a control of the daily switching, the nursing females of the LD groups were also organized in pairs and were exchanged every 12 h. Litters that lost pups during the first postnatal days could continue when $n = 8$; however, they were discarded when the number of pups was below 8.

For the short-term analysis, half of the male rats in each litter were euthanized and perfused at P23 (weaning). For the long-term determinations, the other half was left to grow to P90 in a 12:12 LD cycle. From P23 to P40 pups were maintained in collective cages in groups of 5 animals of the same condition and sex. From P40 to P90 male rats were housed in individual cages and placed in the monitoring system for assessment of general activity. These same conditions were maintained after P90.

This project was reviewed and approved by the commission for ethics investigation 142/2014, following recommendations of the Official Mexican standard on technical specifications for the production, care and use of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999).

General activity monitoring and analysis

General activity was continuously monitored with tilt sensors placed under the home cages as previously reported (Escobar et al. 2007). Behavioral events were collected with a digitized system and stored automatically every minute in a PC for further analysis. The analysis was performed with the program for PC SPAD9 version 1.1.1 designed for this system and based on Matlab (Omniaalva SA de CV).

During lactation general activity of the complete litter was evaluated from P15 to P23 to build temporal profiles of daily activity ($n = 6$ litters/condition). For the long-term effects, rats were individually monitored from postnatal day 70 to 90 ($n = 10$ /group). After P90, some rats ($n = 3$ /group) were maintained under DD conditions during 10 days in order to observe their free-running pattern.

With data accumulated in 15-min intervals, double-plotted actograms were constructed. Movement counts were normalized to the proportional percentage of the daily activity and were represented as mean activity waveforms. The period for each experimental phase was estimated with a X^2 periodogram.

Brain and blood sample extraction

At P23 and P90, animals were euthanized at ZT0, ZT6, ZT12, and ZT18 according to the LD group. An overdose of sodium pentobarbital (0.63 grams/kg; Pisabental, Pisa agropecuaria S.A. de CV., Mexico), was injected i.p. and rats were perfused through the left ventricle into the aorta. P23 pups were perfused with 150 ml of saline solution 0.9% followed by 150 ml of 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (PB, 0.1 Mm, pH 7.2) and picric acid (0.2%); rats at P90 with 250 ml of saline followed by 250 ml of paraformaldehyde. In the dark phase, rats were anesthetized in darkness, once unconscious; their eyes were covered to prevent the exposure to light and were immediately perfused. After perfusion, fat tissue was dissected from the omentum, mesentery, and epididymis and was weighted.

Brains were removed and post-fixed for 72 h and were cryoprotected in 30% sucrose. For P23,

we collected $n = 5$ samples/group/time point; for P90, we collected $n = 4$ samples/group/ time point.

Blood samples (240 μ l) were collected before starting the perfusion and placed in Eppendorf tubes (1.8ml) containing a clot-activator gel. The samples were centrifuged at 2500 rpm for 10 min. Plasma was stored in 80 μ l aliquots at -45°C until further analysis. Aliquots were processed with commercial colorimetric kits for Triglycerides (TG) (TGML-0250ELItech, France) and Glucose (GPSL-0250ELItech, France).

Immunohistochemistry

Brains were cut at -20°C in 40- μ m coronal sections containing the SCN and collected in 4 series. One series was incubated for 72 h at 4°C in PER1 antibody made in goat (Santa Cruz Biotechnology, USA); a second series was incubated with an antibody made in rabbit for the protein VIP (Alpha Diagnostic International, San Antonio TX); a third series was incubated with an antibody made in rabbit for the protein AVP (kindly given by Dr. RM Buijs). Series of 12 brains (4/group) were incubated with the same antibodies for the 4 temporal points. All antibodies were diluted 1:1000 in incubation medium (0.25% gelatin MERCK, 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) and PBS 0.1 Mm, pH 7.2).

After incubation in the primary antibody, sections were incubated for 2 h in biotinylated secondary antibody (goat anti-rabbit for VIP and AVP and anti-goat for PER1; Vector Laboratories) 5:1000 in incubation medium followed by incubation in 1.4% avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain Elite ABCkit; Vector Labs, USA) for 2 h at room temperature. Tissue was rinsed three times for 10 min between incubations. The reaction was visualized with diaminobenzidine (0.05 mg/10ml, in Trizma buffer preset pH7.2) reacted with 30% hydrogen peroxide (35 μ l/100ml). Sections were mounted on gelatin-coated slides and dehydrated in a series of alcohols, cleared in xylene, and coverslipped with Entellan (Merck).

Cell count

To quantify the number of positive cells for AVP, VIP, or PER1 in the SCN, representative slices of

the medial SCN (bregma -1.30) were chosen according to the atlas from Paxinos and Watson (1998). Images were examined under a light microscope (Olympus BX41; Olympus, Japan) and captured at a 20 \times magnification using a computerized image analysis system (MetaVue 4.5, Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA, USA). The number of positive cells of AVP and VIP was counted bilaterally in a double-blind fashion. PER1 positive cells were counted using the “analyze particles” tool in ImageJ software.

Statistical analysis

Data were classified by groups and are represented as the mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). For general activity, day versus night activity was compared with a Students t-test. The χ -square periodogram was used to determine circadian rhythmicity for daily general activity. Body weight gain was analyzed with a two-way ANOVA for the factors: group and time as a factor of repeated measures. For each group, the daily temporal changes of the cell count of AVP, VIP, and PER1 in the SCN, as well as for glucose and TG, were compared with a one-way ANOVA. Total levels of glucose, TG, and fat mass were compared among groups with a one-way ANOVA. All ANOVAs were followed by a Tukey multiple-comparisons *post hoc* test. Statistical analysis and construction of graphs were performed with the software Graph Prism 6.0.

Results

Constant conditions during lactation impaired general activity patterns

Control litters exhibited robust daily rhythms synchronized to the LD condition (Figure 1(a,b) upper graphs) and displayed most of general activity during the night ($T = 9.1$, $df = 10$, $P = .001$; Figure 1(c)), while litters in constant conditions (DD and LL) did not exhibit a rhythm in general activity with a similar proportion between subjective day and subjective night (DD, $T = 0.8$, $df = 10$, $P = 0.43$; LL; $T = 1.1$, $df = 10$, $P = 0.25$; Figure 1(c)). The χ^2 periodogram test (Figure 1(d)) revealed that 100% of the LD litters were rhythmic, under

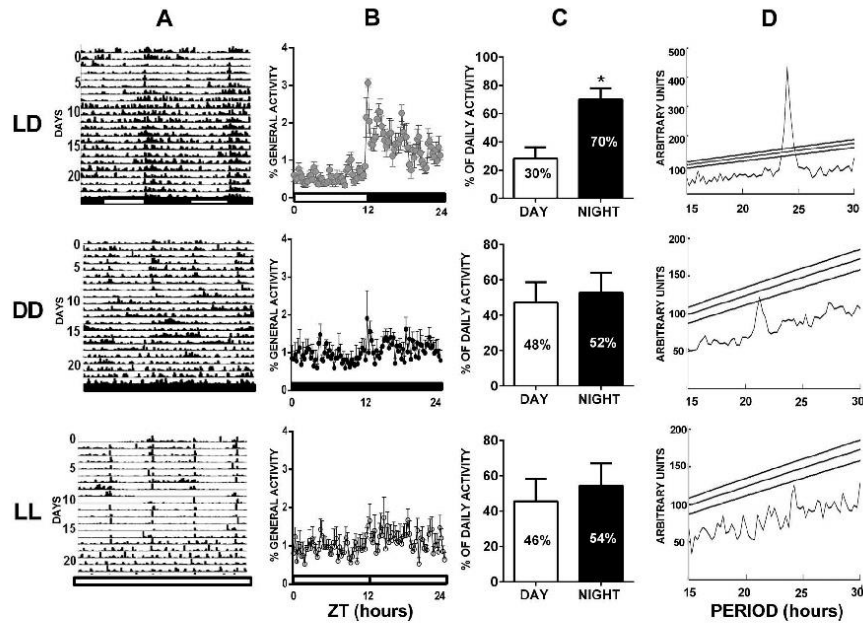


Figure 1. General activity of groups maintained in a light-dark cycle (LD) in constant darkness (DD) or in constant light (LL) during lactation. a) Representative double-plotted actograms of general activity depicting the 23 days of lactation (represented on the ordinate axis). White and black horizontal bars (bottom of actograms) represent light and dark, respectively. b) The daily mean proportion of general activity counts for each group (N = 6 litters/group). c) The total proportion of day-night activity, the asterisk indicates a significant difference between day and night ($p < 0.05$). d) Examples of periodograms obtained for days P15–P23. Parallel lines represent statistical significance at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$. It can be observed that in constant light conditions the 24 h peak does not reach statistical significance.

DD conditions 33% of litters were rhythmic, while under LL conditions only one litter out of 6 (16%) was rhythmic.

Constant conditions during lactation disrupted daily rhythms of VIP, AVP, and PER1 in the SCN

In the LD pups, VIP-immunopositive cells were densely distributed in the ventral part of the SCN and exhibited a clear daily rhythm with peak values at ZT0 and low values at ZT12 and ZT18, the cosinor analysis confirmed a significant 24 h cycle ($P = 0.01$) with peak values at $ZT = 1.37$. The one-way ANOVA indicated a significant effect of time ($F_{(3,16)} = 6.72$, $P = 0.003$). Pups kept under DD and LL did not show changes in time of VIP in the SCN (for DD, $F_{(3,16)} = 0.60$, $P = 0.61$ and for LL, $F_{(3,16)} = 0.61$, $P = 0.61$; Figure 2 top row), the cosinor analysis confirmed a no significant 24h cycle ($P = 0.21$ for DD and $P = 0.2$

for LL). The mean number of immunopositive VIP cells found *per* section was decreased in DD (11 ± 1) and LL conditions (11 ± 1) when compared with the LD group (16 ± 1). The one-way ANOVA indicated ($F_{(2,57)} = 5.311$, $P = 0.0077$; see representative images in Figure 3).

For the LD pups, a clear rhythm of AVP was observed with the highest value at ZT6 and the lowest number at ZT18. The one-way ANOVA indicated a significant effect of time ($F_{(3,16)} = 5.071$, $P = 0.01$), and the cosinor analysis confirmed a significant 24 h cycle ($P = 0.001$). The DD group also showed a significant change in time with a peak at ZT18 and low values at ZT6 and ZT12 ($F_{(3,16)} = 5.27$, $P = 0.01$), and the cosinor analysis confirmed a significant 24 h cycle ($P = 0.001$), while pups in the LL group did not show changes in time ($F_{(3,16)} = 0.24$, $P = 0.86$; Figure 2 middle row) the cosinor analysis

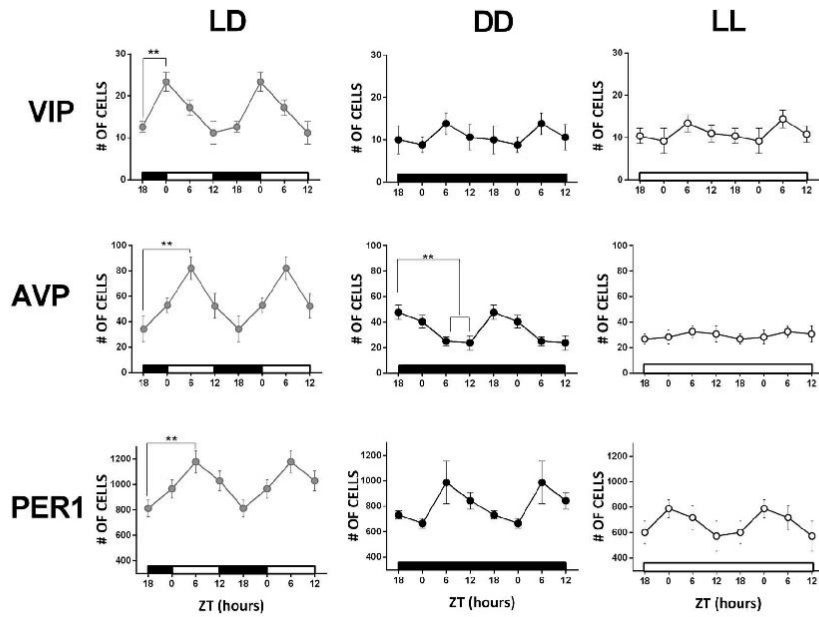


Figure 2. Daily rhythms of VIP, AVP, and PER1 immunopositive cells in the suprachiasmatic nucleus. Daily protein expression profile of VIP (top row) AVP (middle row) and PER1 (bottom row) showing 4 temporal points along 24 h (ZT0, ZT6, ZT12, and ZT18) for pups maintained during lactation in LD, DD and LL (N = 5/ temporal point) at P23; asterisks indicate ** = P < 0.01. White and black horizontal bars indicate light and dark conditions or subjective day and night according to the LD group. Temporal waveforms are double-plotted to visually improve the observation of daily rhythms.

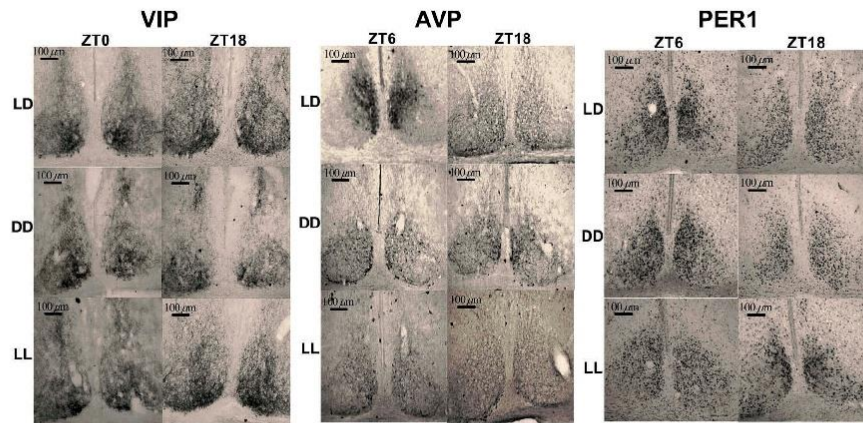


Figure 3. Representative coronal images (20x) showing the location of VIP (left column), AVP (middle) and PER1 (right) in the SCN. Images represent time points for the highest and the lowest levels according to the LD group. Scale bar 100 μ m.

confirmed a no significant 24 h cycle ($P = 1.1$). The mean number of immunopositive AVP cells per section under DD (34 ± 3) and LL (11 ± 1) was

significantly decreased as compared with the LD group (55 ± 5) ($F_{(2,57)} = 33.96, p < 0.0001$; see representative images in Figure 3).

In brains obtained from pups reared under an LD cycle, a clear rhythm of PER1 was observed ($F_{(3,16)} = 3.924$, $p = 0.02$) with high values at ZT6 and low values at ZT18, and the cosinor analysis confirmed a significant 24 h cycle ($P = 0.004$). In the DD and LL groups, a low amplitude oscillation was observed, and the ANOVA did not indicate statistical differences due to time ($F = (3,16) 2.30$, $p = 0.11$; and $F = (3,16) 1.15$, $p = 0.35$; respectively; Figure 2, bottom row). The mean number of immunopositive PER1 cells per section was decreased in DD (807 ± 50) and LL (670 ± 47) conditions when compared with the LD group (996 ± 46) ($F_{(2,57)} = 11.52$, $p < 0.0001$; the cosinor analysis confirmed a significant 24 h cycle for DD group and a no significant 24 h cycle for LL group $P = 1.14$); see representative images in Figure 3).

Constant light during lactation induced increased weight gain and disrupted daily levels of glucose and triglycerides

Rats exposed during lactation to LL showed a significant increase in body weight gain as compared with the LD and DD groups. Differences were observed since P7 and were maintained until the end of lactation (interaction time X groups $F_{(6,171)} = 23.06$, $P < 0.0001$; Figure 4(a)). The total fat mass was significantly lower for the DD group, while LD and LL pups showed similar values ($F_{(2,24)} = 6.52$, $P = 0.005$; Figure 4(b)).

In the LD pups, plasma glucose and TG levels showed a daily rhythm with high values during the night and low levels during the day ($F_{(3,28)} = 17.69$, $P < 0.0001$ for glucose and $F_{(3,28)} = 7.70$, $P = 0.0007$ for TG). Pups in DD also exhibited a daily rhythm of glucose and TG ($F_{(3,$

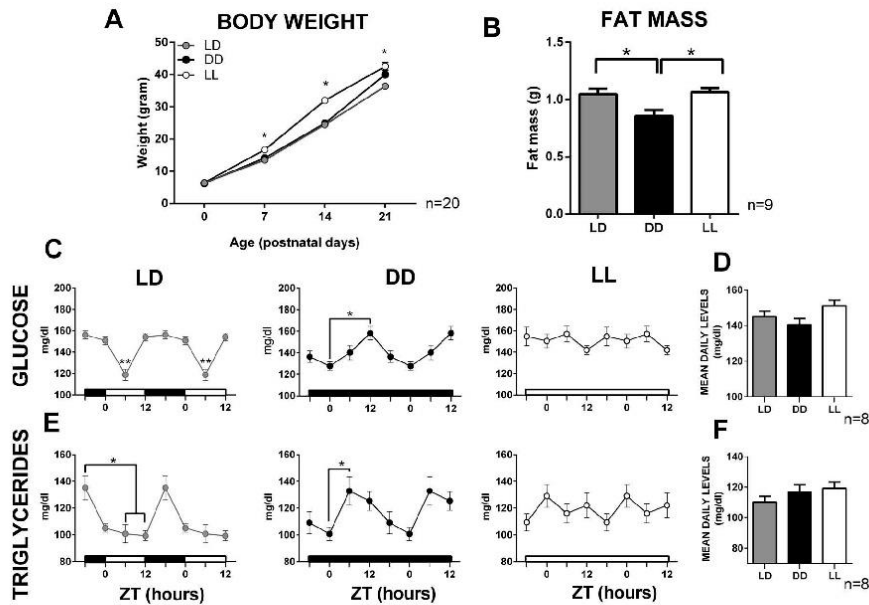


Figure 4. Metabolic variables at P23. a) Body weight gain from P0 to P23 ($n = 20$ animals/group). Animals reared under LL conditions showed increased body weight as compared to the LD and DD groups ($* = p < 0.05$). b) Total fat mass was taken from the omentum, mesentery and epididymus ($n = 9$) ($** = p < 0.05$). c) Daily rhythms of serum glucose (e) and triglycerides ($n = 8$ /group/temporal point) were absent in animals that were reared under an LL cycle during lactation. Mean daily levels of glucose and triglycerides were not significantly increased due to constant conditions (d and f). In C and D temporal waveforms are double-plotted to visually improve the observation of daily rhythms.

$_{28}) = 5.21$, $P = 0.005$ for glucose, ($F_{(3, 28)} = 5.217$, $P = 0.03$ for TG), contrasting, pups exposed to LL did not show a daily fluctuation in glucose ($F_{(3,28)} = 0.94$, $P = 0.430$) and TG ($F_{(3,28)} = 1.10$, $P = 0.3625$; Figure 4(c,d)). The daily mean glucose ($F_{(2,93)} = 2.43$, $P = .09$) and TG ($F_{(2, 93)} = 1.32$, $P = 0.26$) values were not different among groups (Figure 4(e,f)).

Exposure to an LD cycle until P90 reversed the effects of constant conditions during lactation in locomotor activity

To evaluate the long-term effects of constant conditions during lactation on general activity, we exposed all animals to an LD cycle from weaning to adulthood (P90). We found that all animals (LD, DD-LD, and LL-LD) exhibited robust daily rhythms entrained to the LD cycle (Figure 5(a,b)). All animals from the LD ($t = 35.1$, $df = 26$, $P < 0.0001$), DD ($t = 20.73$, $df = 24$, $P < 0.0001$)

and LL ($t = 20.70$, $df = 26$, $P < 0.0001$) groups showed a significant difference between day and night activity (Figure 5(c)). The χ^2 periodogram confirmed that 100% of the rats displayed 24 h rhythms (Figure 5(d)), indicating that exposure to an LD cycle after weaning is sufficient to restore daily rhythms in general activity. After P90 three rats of each condition (LD, DD, and LL) were left in DD during 10 days. The χ^2 periodogram confirmed that all rats maintained a circadian pattern under DD conditions (LD = 25 h DD = 24.3 h and LL 24.2 h; Figure 5(e)).

Exposure to an LD cycle until P90 did not restore the daily rhythm of AVP, VIP, and PER1 in the SCN of LL-LD rats

To determine the long-term effects of constant conditions during lactation on the SCN, we evaluated the number of positive cells for VIP, AVP, and PER1 cells along a 24 h LD cycle. The LD-LD

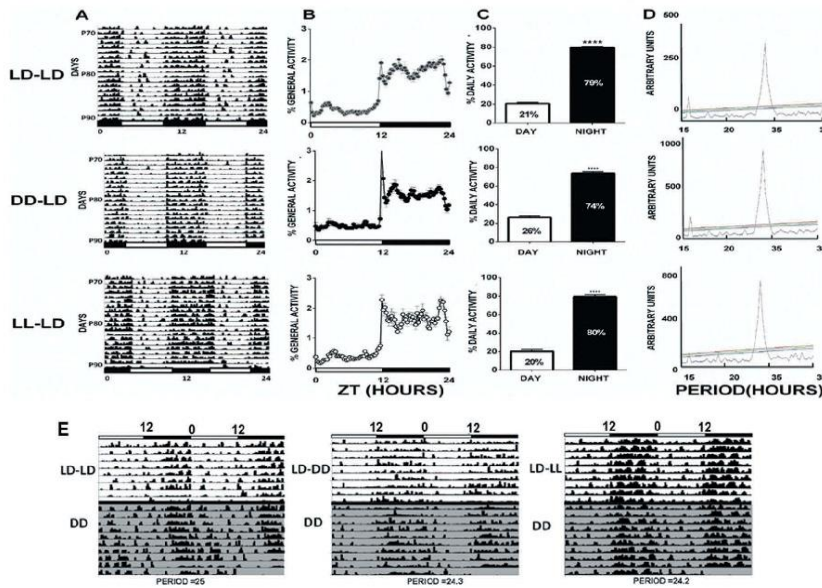


Figure 5. General activity of LD, DD, and LL. a) Representative double-plotted actograms, depicting 20 days of recording represented on the ordinate axis, white and black horizontal bars (bottom of actograms) represent day and night, respectively. b) The daily mean proportion of general activity for each group. c) The proportion of general activity for day and night, asterisks show a significant difference between day and night ($**** = p < 0.0001$). d) Examples of periodograms obtained from P70 to P90, indicating significant 24 h cycles, the parallel lines represent statistical significance at $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$ ($N = 6$ /group) e) Representative double-plotted actograms represent general activity during an LD cycle and 10 days in DD (dark screen; $n = 3$).

group exhibited daily changes in VIP with high levels at ZT0 and ZT6 and lowest values at ZT18 ($F_{(3,12)} = 4.9, P = 0.01$), and the cosinor analysis confirmed a significant 24 h cycle $P = (0.01)$. The DD-LD group showed a daily changes of VIP that did not reach statistical significance along time ($F_{(3,12)} = 2.4, P = 0.11$), and the LL-LD group exhibited constant values along the 24 h ($F_{(3,12)} = 0.7, P = 0.56$; Figure 6 top), while the cosinor analysis confirmed a significant 24 h cycle for DD group $P = 0.03$ and a no significant 24 h cycle for LL group $P = 0.26$. The mean number of immunopositive VIP cells in a section in the DD group (14 ± 1) and LL (12 ± 0.5) was reduced as compared with the LD group (17 ± 1) ($F_{(2,45)} = 6.8, P < 0.05$; see representative images in Figure 7).

In LD animals, AVP showed a daily rhythm with a peak at ZT6 and the lowest number at ZT18 ($F_{(3,12)} = 4.86, P = .019$), animals under DD-LD also exhibited a rhythmic pattern for this protein ($F_{(3,12)} = 8.02, P = 0.003$), and the cosinor analysis confirmed a significant 24h cycle ($P = 0.008$), however with an inverted peak at

ZT18 and a reduced number at ZT6. Contrasting LL-LD animals did not show a 24 h fluctuation ($F_{(3,12)} = 0.70, P = 0.56$, Figure 6 middle), and the cosinor analysis confirmed a significant 24h cycle for DD group (0.0005) and a no significant 24 h cycle for LL group ($P = 0.51$).

The mean number of immunopositive AVP cells in a section was not different between groups (LD: $28 \pm 1, DD: 27 \pm 2, LL: 22 \pm 1$) ($F_{(2,45)} = 21.3, P = 0.26$; see representative images in Figure 7).

The LD group showed a daily rhythm of PER1 immunoreactivity with the highest number of cells at ZT12 and a reduced number at ZT0 ($F_{(3,12)} = 4.74, P = 0.02$). A similar daily pattern was observed in the DD-LD group ($F_{(3,12)} = 3.99, P = 0.03$), the cosinor analysis confirmed a significant 24h cycle $P = (0.001)$ while in the LL-LD group showed a low amplitude rhythm, however with a changed temporal pattern, and that reached statistical significance, reaching peak values at ZT0 ($F_{(3,12)} = 4.64, P = 0.02$; Figure 6 bottom), the cosinor analysis confirmed a significant 24 h cycle for DD group ($P = 0.035$) and a no

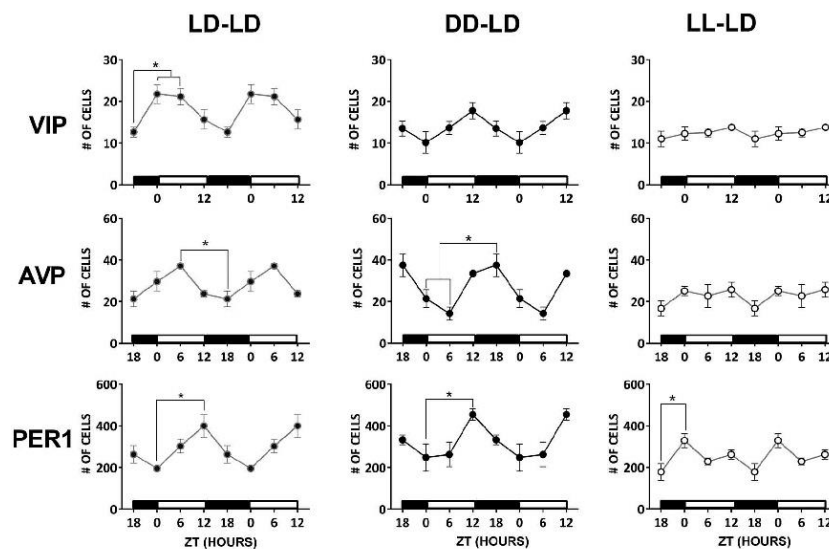


Figure 6. Daily rhythms of VIP, AVP, and PER1 immunopositive cells. Daily fluctuations of VIP (top) AVP (middle) and PER1 (bottom) for LD, DD-LD, and LL-LD groups in 4 temporal points at P90. N = 5/ group and temporal point. * = $p < .05$. White and black horizontal bars indicate light and dark conditions. Temporal waveforms are double-plotted to visually improve the observation of daily rhythms.

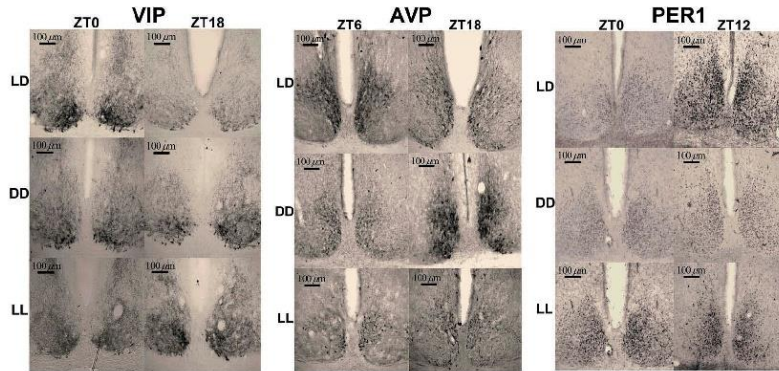


Figure 7. Representative coronal images (20x) showing the location of VIP (left column), AVP (middle) and PER1 (right) in the SCN. Images represent time points for the highest and the lowest levels according to the LD group. Scale bar 100 μm .

significant 24 h cycle for LL group ($P = 0.59$). No significant differences were found in the mean number of immunopositive PER1 cells/section among the groups (LD:290 \pm 23, DD:324 \pm 26, LL:249 \pm 17 ($F_{(2, 45)} = 2.1$, $P = 0.12$; see representative images in Figure 7).

Exposure to an LD cycle until P90 did not restore the metabolic state

Exposure to an LD cycle after weaning reversed the effects of constant light on body weight gain. No significant difference was observed among groups (for the interaction groups X time ($F_{(18,269)} = 0.49$, $P = 0.95$; Figure 8(a)). However, the total fat mass was significantly higher in the LL-LD group as compared with the LD and DD-LD groups ($F_{(2, 24)} = 8.07$, $P = 0.02$; Figure 8(b)).

The LD group showed a 24 h rhythm in serum glucose and TG with higher levels of both variables during the night-time, glucose showed a peak at ZT18 ($F_{(3,28)} = 5.75$, $P = 0.003$) and TG showed the highest levels at ZT12 ($F_{(3,20)} = 3.06$, $P = 0.05$). Both DD-LD and LL-LD groups showed no significant rhythms for both variables (the DD group $F_{(3,28)} = 1.07$, $P = 0.37$ for glucose and ($F_{(3, 20)} = 0.33$, $P = 0.79$ for TG; the LL group ($F_{(3,28)} = 0.84$, $P = 0.47$ for glucose and ($F_{(3,20)} = 0.15$, $P = 0.92$ for TG; Figure 8(c,d)). The mean daily levels of TG along 24 h were significantly higher in DD-LD and LL-LD rats as

compared with the control group ($F_{(2,69)} = 4.3$, $P = 0.01$), while no differences were found for the 24 h mean glucose levels ($F_{(2,93)} = 2.6$, $P = 0.07$; Figure 8(e,f)), indicating long-term effects on metabolism caused by the lighting conditions during lactation.

Discussion

Artificial light at night has shown to exert adverse effects on the circadian system, metabolism, and general health in adult rodents (Fonken and Nelson 2014; Kooijman et al. 2015) as well as in humans (Chang et al. 2015; Haim and Zubidat 2015). The present study highlights the impact of light at night during lactation, which is a critical moment for the development of the circadian system and for metabolic regulation. While constant darkness decreased the amplitude of the day-night rhythm of immunopositive cells in the SCN, of activity patterns and metabolic rhythms; constant light abolished rhythmicity in all variables explored; moreover, it decreased immunopositive cells of VIP, AVP, and PER1. Exposure to an LD cycle after lactation imposed a rhythmic pattern in general activity but failed to restore circadian regulation of VIP, AVP, and PER1, indicating a permanent impairment to the SCN by LL during lactation. The metabolic state of adult rats also indicated a permanent impact on metabolic regulation.

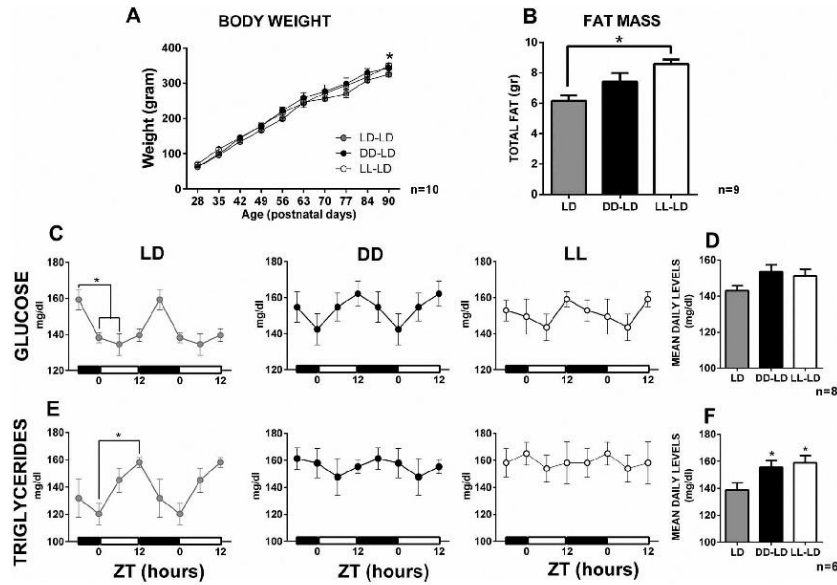


Figure 8. Metabolic variables at P90. a) Body weight gain from P28 to P90 ($n = 10$ animals/group). Animals reared under LL conditions showed increased body weight as compared to the LD and DD groups ($* = p < 0.05$). b) Total fat mass was significantly increased in the LL group ($* = p < 0.05$). c) Daily rhythms of serum glucose ($n = 8$ /temporal point) (e) and triglycerides ($n = 6$ /temporal point); were absent in animals that were reared under DD and LL cycle during lactation. d and f). Mean daily levels of glucose were not significantly increased due to early constant conditions, triglycerides mean daily levels were increased in the LL and DD groups ($* = p < 0.05$). In C and D temporal waveforms are double-plotted to visually improve the observation of daily rhythms.

Previous studies have reported that constant lighting conditions during lactation can disrupt both the development of the SCN and behavioral patterns in developing pups (Borniger et al. 2014; Brooks and Canal 2013; Canal-Corretger et al. 2001). In the present study, most of the litters exposed to DD and LL conditions were arrhythmic in their locomotor activity. It is important to highlight that activity patterns collected with our monitoring system were the result of movements related to the maternal behavior combined with the activity from the pups. However, actograms show that in the last third of lactation (P15-P23) the pup's activity contributed importantly to the daily pattern. While DD pups exhibited low amplitude rhythms, LL pups were steadily arrhythmic, which confirmed data previously reported (Canal-Corretger et al. 2000; Ohta et al. 2006).

The circadian system and physiological functions of various organs change through development and reach circadian regulation in postnatal days (Yamazaki et al. 2009). During lactation, the nursing mother entrains pups via behavioral and physiological cues (Davis and Gorski 1988). Maternal entrainment is the main temporal signal until the pup acquires the capacity to entrain to the LD cycle (Sumova et al. 2012). The feeding pattern plays a relevant role in the entrainment process, especially for peripheral oscillators. In nature, when pups are nursed in burrows, feeding schedules are imposed by the lactating mother and the transition of self-feeding and progressive exit from the nest is important for metabolic and physiologic rhythms in the pups (Caba and González-Mariscal 2009). When pups switch from nursing during the day to eating food at night, feeding periods are the entrainment signal of peripheral

oscillators (Yamazaki et al. 2009) This process was possibly disturbed in our study in DD and LL pups, since during the third week of lactation, that is where they start to eat by themselves, they were not exposed to an LD cycle. This condition may have impaired the functional interaction between the SCN and peripheral tissues that are established in the second postnatal week (Yamazaki et al. 2009).

In our results, a possible link between circadian disruption by LL and metabolic dysfunction may be the inhibition of melatonin by light (Tapia-Osorio et al. 2013). Maternal melatonin is released in the breast milk (Rowe and Kennaway 2002) and plays an important role in mediating glucose homeostasis and in the programming of metabolic strategies (Ferreira et al. 2012; Nogueira et al. 2011). Taking the above into account, we implemented an experimental manipulation that only exposed the nursing pups to constant conditions and permitted to keep the lactating females in a 12:12 LD cycle. This procedure prevented that constant conditions would modify hormonal and metabolic fluctuations in the mother that could alter the pups.

Behavioral analysis, protein evaluation in the SCN and metabolic rhythms indicate that pups were not able to develop circadian rhythms under constant conditions, especially under LL. Exposure to LD after lactation imposed a defined rhythm in general activity with predominant activity at night, suggesting that, effects observed in general activity in the DD and LL pups can be reversed by LD exposure after lactation. Similar effects were reported in rats and mice raised in LL or DD and exposed to an LD cycle after lactation (Canal-Corretger et al. 2000; Ohta et al. 2006).

The entrainment of the locomotor activity to an LD cycle after lactation might be suggesting a masking response to the alternating light-dark conditions (Mrosovsky 1999) in which other brain structures might be guiding the observed rhythm in general activity. Probably, daily rhythmicity can also be driven by photic signals reaching directly other areas of the brain (Hattar et al. 2006). In this study, we have not explored other hypothalamic regions or areas receiving retinal input, and thus it is relevant that further studies explore the effects of constant lighting conditions

on the development. In a study by Husse et al (Husse et al. 2014), mice with a genetically ablated SCN were able to maintain synchronized daily oscillations in peripheral oscillators and phase relationships were preserved, as long as they were kept in an LD cycle. However, when they were exposed to constant conditions (DD), rhythms were dampened and later were desynchronized. Such findings suggest that light input can synchronize behavior and peripheral clocks via SCN independent pathways. For that reason, exploration of the SCN- hypothalamus projections will be necessary in order to better understand the mechanisms underlying the altered metabolic daily rhythms.

We showed that in the short term, constant conditions caused a loss of rhythmicity in glucose and TG serum levels and increased body weight gain in LL pups. In the SCN, a reduced number of immunopositive cells for VIP, AVP, and PER1 cells were observed and a loss of rhythms in both DD and LL groups. This is in agreement with previous findings, indicating a reduction of neurons and glial cells in the SCN of rodents exposed to constant conditions during lactation (Cambras et al. 2005) pointing out lactation as a critical period of plasticity and the development of the SCN.

In the long term, the reduction of VIP cells combined with altered temporal patterns at P90, even after exposure to the LD cycle, indicate permanent changes of the VIP region in the SCN. Contrasting, the DD-LD group recovered rhythmicity; the high values of AVP were shifted toward at night, and the peak of PER1 was found at the same time that the LD group, at the beginning of the night, similar as described by Bae et al. (Bae et al. 2001). It is difficult to speculate what factor drove AVP and Per 1 out of phase in our DD-LD group; this indicates that long-term effects on the SCN were not sufficient to eliminate the circadian regulation. One limitation of our study is that we only sampled 4 temporal points, which does not permit an accurate estimation of acrophases. Different studies have reported that after electrolytic lesions, survival of at least 25% of any portion of the SCN is sufficient to generate rhythmic function (Davis and Gorski 1988; Van Den Pol and Powley 1979). We found at P90, more than 70% of VIP and 80% AVP cells in DD-LD and LL-LD

groups, respectively; this can be sufficient to maintain circadian locomotor activity. Thus, we can suggest that in spite of an affected SCN, long-term adaptations occurred in order to enable expression of daily behavioral rhythms.

Contrasting with the apparent recovery in daily locomotor activity rhythm in our study, rhythms in the SCN and metabolites were still disrupted, especially in the LL rats, indicating a long-term effect on the metabolic variables due to the early lighting experience. At metabolic level, exposure to LD after lactation prevented further body weight gain; however, it did not reverse adverse effects on glucose and TG rhythms, and the altered levels of TG in the DD-LD rats indicate that adverse effects on metabolism are not exclusive of LL and may be associated with the lack of an alternating day-night cycle during lactation.

Conclusions

Data presented here indicate a putative programming effect of the lighting conditions during early stages of development for the circadian system and metabolic regulation.

Present results highlight the importance of the day-night alternation in early stages of development and indicate that lactation is a critical period where constant lighting conditions can program and exert adverse long-term effects on the circadian and the metabolic system.

Our results point out the relevance of keeping a day-night alternation in environments where infants are nurtured, for example, the NICUs, or at home in the children's room, to enforce the maturation of the circadian system and to prevent circadian and metabolic disturbances in further stages of life.

Acknowledgements

We thank Dr. Buijs for the AVP antibody.

Declaration of Interest

The authors declare that they have no potential conflicts of interests with any of the authors in relation to the work described.

Funding

Madahi Palma Gomez is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB), Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 474129/276019 from CONACYT.

References

- Albrecht U, Ripperger JA. 2009. Clock genes. *Encyclopedia Neurosci.* 1:759–62. doi:10.1007/978-3-540-29678-2_1080.
- Albrecht U, Zheng B, Larkin D, Sun ZS, Lee CC. 2001. *mPer1* and *mper2* are essential for normal resetting of the circadian clock. *J Biol Rhythms.* 16(2):100–04. doi:10.1177/074873001129001791.
- Aton SJ, Colwell CS, Harmor AJ, Waschek J, Herzog ED. 2005. Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat Neurosci.* 8(4):476–83. doi:10.1038/nn1419.
- Bae K, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM, Weaver DR. 2001. Differential functions of *mPer1*, *mPer2*, and *mPer3* in the SCN circadian clock. *Neuron.* 30(2):525–36. doi:10.1016/S0896-6273(01)00302-6.
- Báez-Ruiz A, Guerrero-Vargas NN, Cázarez-Márquez F, Sabath E, Basualdo MDC, Salgado-Delgado R, ... Buijs RM. 2017. Food in synchrony with melatonin and corticosterone relieves constant light disturbed metabolism. *J Endocrinol.* 235(3):167–78. doi:10.1530/JOE-17-0370.
- Bendová Z, Sumová A, Illnerová H. 2004. Development of circadian rhythmicity and photoperiodic response in subdivisions of the rat suprachiasmatic nucleus. *Dev Brain Res.* 148(1):105–12. doi:10.1016/j.devbrainres.2003.10.007.
- Bobu C, Sandu C, Laurent V, Felder-Schmittbuhl M-P, Hicks D. 2013. Prolonged light exposure induces widespread phase shifting in the circadian clock and visual pigment gene expression of the *Arvicantis ansorgei* retina. *Mol Vis.* 19(November2012):1060–73. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3668684&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>.
- Borniger JC, McHenry ZD, Abi Salloum BA, Nelson RJ. 2014. Exposure to dim light at night during early development increases adult anxiety-like responses. *Physiol Behav.* 133:99–106. doi:10.1016/j.physbeh.2014.05.012.
- Brandon DH, Holditch-Davis D, Belyea M. 2002. Preterm infants born at less than 31 weeks' gestation have improved growth in cycled light compared with continuous near darkness. *J Pediatr.* 140(2):192–99. doi:10.1067/mpd.2002.121932.
- Brooks E, Canal MM. 2013. Development of circadian rhythms: Role of postnatal light environment. *Neurosci Biobehav Rev.* 37:551–60. doi:10.1016/j.neubiorev.2013.02.012.
- Brooks E, Waters E, Farrington L, Canal MM. 2011. Differential hypothalamic tyrosine hydroxylase distribution and activation by light in adult mice reared under different light conditions during the suckling period. *Brain Struct Funct.* 216(4):357–70. doi:10.1007/s00429-011-0318-9.

- Brown TM, Colwell CS, Waschek JA, Piggins HD. 2007. Disrupted neuronal activity rhythms in the suprachiasmatic nuclei of vasoactive intestinal polypeptide-deficient mice. *J Neurophysiol.* 97(3):2553–58. doi:10.1152/jn.01206.2006.
- Caba M, González-Mariscal G. 2009. The rabbit pup, a natural model of nursing-anticipatory activity. *Eur J Neurosci.* 30(9):1697–706. doi:10.1111/j.1460-9568.2009.06964.x.
- Cambras T, López L, Arias JL, Díez-Noguera A. 2005. Quantitative changes in neuronal and glial cells in the suprachiasmatic nucleus as a function of the lighting conditions during weaning. *Dev Brain Res.* 157(1):27–33. doi:10.1016/j.devbrainres.2005.02.014.
- Canal MM, Mohammed NM, Rodríguez JJ. 2009. Early programming of astrocyte organization in the mouse suprachiasmatic nuclei by light. *Chronobiol Int.* 26(8):1545–58. doi:10.3109/07420520903398542.
- Canal-Corretger MM, Cambras T, Vilaplana J, Díez-Noguera A. 2000. Bright light during lactation alters the functioning of the circadian system of adult rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 278(1):R201–R208. doi:10.1152/ajpregu.2000.278.1.R201.
- Canal-Corretger MM, Vilaplana J, Cambras T, Díez-Noguera A. 2001. Functioning of the rat circadian system is modified by light applied in critical postnatal days. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 280(4):R1023–R1030. doi:10.1152/ajpregu.2001.280.4.R1023.
- Chang A-M, Aeschbach D, Duffy JF, Czeisler CA. 2015. Evening use of light-emitting eReaders negatively affects sleep, circadian timing, and next-morning alertness. *Proc Natl Acad Sci.* 112(4):1232–37. doi:10.1073/pnas.1418490112.
- Cho Y, Ryu S-H, Lee BR, Kim KH, Lee E, Choi J. 2015. Effects of artificial light at night on human health: A literature review of observational and experimental studies applied to exposure assessment. *Chronobiol Int.* 32(9):1294–310. doi:10.3109/07420528.2015.1073158.
- Ciarleglio CM, Axley JC, Strauss BR, Gamble KL, McMahon DG. 2010. Perinatal photoperiod imprints the circadian clock. *Nature Publishing Group.* 14(1):25–27. doi:10.1038/nn.2699.
- Davis FC, Gorski RA. 1988. Development of hamster circadian rhythms: Role of the maternal suprachiasmatic nucleus. *J Comp Physiol A.* 162(5): 601–10.
- Duffy JF, Wright KP. 2005. Entrainment of the human circadian system by light. *J Biol Rhythms.* 20(4):326–38. doi:10.1177/0748730405277983.
- Escobar C, Martínez-Merlos MT, Angeles-Castellanos M, Del Carmen Miñana M, Buijs RM. 2007. Unpredictable feeding schedules unmask a system for daily resetting of behavioural and metabolic food entrainment. *Eur J Neurosci.* 26(10):2804–14. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05893.x.
- Evans JA, Davidson AJ. 2013. Health consequences of circadian disruption in humans and animal models. *Prog Mol Biol Transl Sci.* doi:10.1016/B978-0-12-396971-2.00010-5.
- Ferreira DS, Amaral FG, Mesquita CC, Barbosa APL, Lellis-Santos C, Turati AO, Anhe GF, Yamazaki S. 2012. Maternal melatonin programs the daily pattern of energy metabolism in adult offspring. *PLoS ONE.* 7(6):e38795. doi:10.1371/journal.pone.0038795.
- Fonken LK, Kitsmiller E, Smale L, Nelson RJ. 2012. Dim nighttime light impairs cognition and provokes depressive-like responses in a diurnal rodent. *J Biol Rhythms.* 27:319–27. doi:10.1177/0748730412448324.
- Fonken LK, Nelson RJ. 2014. The effects of light at night on circadian clocks and metabolism. *Endocr Rev.* 35(4):648–70. doi:10.1210/er.2013-1051.
- Fonken LK, Workman JL, Walton JC, Weil ZM, Morris JS, Haim A, Nelson RJ. 2010. Light at night increases body mass by shifting the time of food intake. *Proc Natl Acad Sci.* 107:18664–69. doi:10.1073/pnas.1008734107.
- Haim A, Zubidat AE. 2015. Artificial light at night: melatonin as a mediator between the environment and epigenome. *Philosophical Trans Royal Soc B.* 370(1667):20140121–20140121. doi:10.1098/rstb.2014.0121.
- Hattar S, Kumar M, Park A, Tong P, Tung J, Yau K-W, Berson DM. 2006. Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *J Comp Neurol.* 497(3):326–49. doi:10.1002/cne.20970.
- Hattar S, Liao HW, Takao M, Berson DM, Yau KW. 2002. Melanopsin-containing retinal ganglion cells: Architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science.* 295(5557):1065–70. doi:10.1126/science.1069609.
- Husse J, Leliavski A, Tsang AH, Oster H, Eichele G. 2014. The light-dark cycle controls peripheral rhythmicity in mice with a genetically ablated suprachiasmatic nucleus clock. *Faseb J.* 28(11):4950–60. doi:10.1096/fj.14-256594.
- Isobe Y, Nishino H. 1998. AVP rhythm in the suprachiasmatic nucleus in relation to locomotor activity under constant light. *Peptides.* 19(5):827–32. doi:10.1016/S0196-9781(98)00021-7.
- Ko CH, Takahashi JS. 2006. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet.* 15(SUPPL. 2):271–77. doi:10.1093/hmg/ddl207.
- Kooijman S, van den Berg R, Ramkisoensing A, Boon MR, Kuipers EN, Loeff M, ... Rensen PCN. 2015. Prolonged daily light exposure increases body fat mass through attenuation of brown adipose tissue activity. *Proc Natl Acad Sci.* 112(21):6748–53. doi:10.1073/pnas.1504239112.
- Laermans J, Depoortere I. 2016. Chronobesity: role of the circadian system in the obesity epidemic. *Obes Rev.* 17(2):108–25. doi:10.1111/obr.12351.
- Li J, Burton KJ, Zhang C, Hu S, Zhou Q. 2009. Vasopressin receptor V1a regulates circadian rhythms of locomotor activity and expression of clock-controlled genes in the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms.* 24(4):273–83. doi:10.1177/0748730409349833.
- Li J, Jia-da, Katherine J Burton, Chengkang Zhang, Shuang-bao Hu, and Qun-yong Zhou. "Vasopressin Receptor V1a Regulates Ci. *Am J Physiol*

- Regul Integr Comp Physiol. 92697:824–30. doi:10.1152/ajpregu.90463.2008.
- Mann NP, Haddow R, Stokes L, Goodley S, Rutter N. 1986. Effect of night and day on preterm infants in a newborn nursery: Randomised trial. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 293 (6557):1265–67. doi:10.1136/bmj.293.6557.1265.
- Mieda M, Ono D, Hasegawa E, Okamoto H, Honma K-I, Honma S, Sakurai T. 2015. Cellular clocks in AVP neurons of the scn are critical for interneuronal coupling regulating circadian behavior rhythm. *Neuron*. 85(5):1103–16. doi:10.1016/j.neuron.2015.02.005.
- Mirmiran M, Ariagno RL. 2000. Influence of light in the NICU on the development of circadian rhythms in preterm infants. *Semin Perinatol*. 24(4):247–57. doi:10.1053/sper.2000.8593.
- Mohawk JA, Green CB, Takahashi JS. 2012. Central and peripheral circadian clocks in mammals. *Annu Rev Neurosci*. 35 (1):445–62. doi:10.1146/annurev-neuro-060909-153128.
- Moore RY, Speh JC, Leak RK. 2002. Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res*. 309:89–98. doi:10.1007/s00441-002-0575-2.
- Mrosovsky N. 1999. Masking: history, definitions, and measurement. *Chronobiol Int*. 16(4):415–29. doi:10.3109/07420529908998717.
- Nagano M, Adachi A, Masumoto K-H, Meyer-Bernstein E, Shigeyoshi Y. 2009. rPer1 and rPer2 induction during phases of the circadian cycle critical for light resetting of the circadian clock. *Brain Res*. 1289:37–48. doi:10.1016/j.brainres.2009.06.051.
- Nogueira TC, Lellis-Santos C, Jesus DS, Taneda M, Rodrigues SC, Amaral FG, ... Anhe GF. 2011. Absence of melatonin induces night-time hepatic insulin resistance and increased gluconeogenesis due to stimulation of nocturnal unfolded protein response. *Endocrinology*. 152(4):1253–63. doi:10.1210/en.2010-1088.
- Nováková M, Sládek M, Sumová A. 2015. Exposure of pregnant rats to restricted feeding schedule synchronizes the SCN clocks of their fetuses under constant light but not under a light – Dark regime. 25(5):350–60. doi:10.1177/0748730410377967.
- Ohta H, Mitchell AC, McMahon DG. 2006. Constant light disrupts the developing mouse biological clock. *Pediatr Res*. 60(3):304–08. doi:10.1203/01.pdr.0000233114.18403.66.
- Ohta H, Yamazaki S, McMahon DG. 2005. Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nat Neurosci*. 8(3):267–69. doi:10.1038/nn1395.
- Panda S, Nayak SK, Campo B, Walker JR, Hogenesch JB, Jegla T. 2005. Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science*. 307(5709):600–04. doi:10.1126/science.1105121.
- Paxinos G, Watson C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. New York (NY): Academic Press.
- Reppert SM, Weaver DR. 2002. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 418(6901):935–41. doi:10.1038/nature00965.
- Rowe SA, Kennaway DJ. 2002. Melatonin in rat milk and the likelihood of its role in postnatal maternal entrainment of rhythms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 282(3):R797–R804. doi:10.1152/ajpregu.00228.2001.
- Shibata S, Moore RY. 1987. Development of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res*. 431(2):311–15. doi:10.1016/0165-3806(87)90220-3.
- Shibata S, Moore RY. 1988. Development of a fetal circadian rhythm after disruption of the maternal circadian system lesion SCN. 41:313–17.
- Smith L, Canal MM. 2009. Expression of circadian neuropeptides in the hypothalamus of adult mice is affected by postnatal light experience. *J Neuroendocrinol*. 21 (11):946–53. doi:10.1111/j.1365-2826.2009.01914.x.
- Sumova A, Sladek M, Polidarova L, Novakova M, Houdek P. 2012. Circadian system from conception till adulthood. *Progress in Brain Research*. Vol. 199. 1st ed. The Netherlands: Elsevier B.V. doi:10.1016/B978-0-444-59427-3.00005-8.
- Tapia-Osorio A, Salgado-Delgado R, Angeles-Castellanos M, Escobar C. 2013. Disruption of circadian rhythms due to chronic constant light leads to depressive and anxiety-like behaviors in the rat. *Behav Brain Res*. 252:1–9. doi:10.1016/j.bbr.2013.05.028.
- Van den Pol AN, Powley T. 1979. A fine-grained anatomical analysis of the role of the rat suprachiasmatic nucleus in circadian rhythms of feeding and drinking. *Brain Res*. 160:307–26. doi:10.1016/0006-8993(79)90427-X.
- Vásquez-Ruiz S, Maya-Barrios JA, Torres-Narváez P, Vega-Martínez BR, Rojas-Granados A, Escobar C, Angeles-Castellanos M. 2014. A light/dark cycle in the NICU accelerates body weight gain and shortens time to discharge in preterm infants. *Early Hum Dev*. 90(9):535–40. doi:10.1016/j.earlhumdev.2014.04.015.
- Yamazaki S, Yoshikawa T, Biscoe EW, Numano R, Gallsapy LM, Soulsby S, ... Menaker M. 2009. Ontogeny of circadian organization in the rat. *J Biol Rhythms*. 24(1):55–63. doi:10.1177/0748730408328438.

PUBLICACIÓN #2

Dado que las condiciones constantes de luz son capaces de generar alteraciones a largo plazo en los ritmos circadianos decidimos evaluar el papel que ejercen estas condiciones durante la etapa de lactancia sobre la retina, que es la principal vía de entrada de luz hacia el NSQ. Decidimos evaluar la morfología de la retina, la densidad de sus proyecciones al NSQ, así como su funcionalidad al transmitir la señal fótica al NSQ por medio de un modelo de jet-lag.

5. Objetivos

5.1. *Objetivos específicos*

5.- Describir al final de la etapa de lactancia (P23) y al final de la etapa adulta (P90) el efecto de condiciones constantes de luz durante la lactancia sobre la morfología de las capas que conforman a la retina.

6.- Determinar al final de la etapa de lactancia (P23) y al final de la etapa adulta (P90) a corto y largo plazo la inervación desde la retina al NSQ por medio de la inyección de un trazador anterógrado (CTB).

7.- Determinar y al final de la etapa adulta (P90) a largo plazo el efecto de un pulso de luz sobre la expresión de c-Fos en el NSQ en animales criados bajo condiciones constantes de luz durante la lactancia.

8.- Determinar en ratas adultas criadas bajo condiciones constantes de luz durante la lactancia, el número de ciclos que les toma resincronizarse a un avance de fase de 6 horas durante su etapa adulta.

5.2 Hipótesis específicas

- H5.- Las ratas expuestas a LL durante la lactancia mostrarán una reducción en el número de células ganglionares de la retina al final del destete (P23) y al final de la etapa adulta (P90).
- H6.- Las ratas expuestas a LL durante la lactancia mostrarán al final de la etapa de lactancia (P23) y al final de la etapa adulta (P90) una reducción en la inervación desde la retina hacia el NSQ.
- H7.- Las ratas expuestas a LL durante la lactancia mostrarán al final de la etapa adulta (P90) una reducción de células positivas a c-Fos en el NSQ posterior a un pulso de luz.
- H8.- Las ratas expuestas a LL durante la lactancia mostrarán al final de la etapa de lactancia (P90) un mayor número de ciclos para sincronizarse a un avance de fase de 6 horas.

6. Materiales y métodos

6.1 Animales y condiciones generales

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar obtenidas el día de su nacimiento (P0) del bioterio general de la Facultad de Medicina de la UNAM y se mantuvieron en el bioterio del Departamento de Anatomía en cajas de acrílico (45x30x35). Las camadas junto con la madre lactante se mantuvieron en lockers diseñados con un sistema de monitoreo automático que controla las condiciones de luz. Las crías se mantienen juntas entre sí y junto a su madre. Las madres lactantes fueron expuestas a un ciclo de LO / 12:12, donde el encendido de luz fue a las 07:00 h (ZT0) y el apagado a las 19:00 horas (ZT12), las crías son mantenidas junto a la madre en cajas de acrílico.

La manipulación experimental se realizó del nacimiento (P0) al destete (P23). Se evaluaron los efectos a corto plazo de la condición de desincronización al destete, y en una segunda etapa (P90) con la finalidad de observar los efectos de programación a largo plazo.

Se emplearon 4 ratas Wistar primíparas preñadas (200-250g), las cuales posteriormente alimentaron a sus crías recién nacidas durante los primeros 23 días. Al nacimiento se ajustaron las camadas de 8 a 10 crías con igual número de hembras y machos, y se formaron los siguientes grupos:

- LO; crías expuestas a un ciclo LO 12/12.
- OO; crías expuestas a oscuridad constante
- LL; crías expuestas a luz constante (300 luxes).

6.2 Consideraciones Éticas.

Todos los procedimientos se realizaron siguiendo las recomendaciones de la norma Oficial Mexicana sobre “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio” (NOM-062-ZOO-1999). Este estudio fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina 142/2014.

6.3 Diseño experimental

Grupos:

- Crías Control (LO): nacidas de hembras en condiciones de libre acceso al alimento y al agua, fotoperiodo 12:12 y condiciones estándar de bioterio. Se mantuvieron en estas condiciones durante su desarrollo postnatal (de P0 a P23).
- Crías en luz constante (LL): Del nacimiento (P0) y hasta el destete (P23) se mantuvieron en condiciones de luz constante. Para evitar que las madres lactantes se expusieran a esta condición, las madres se intercambiaron entre ellas cada 12 horas. Estuvieron en una condición de LL y después de 12 horas, amamantaban una camada que estaba en condiciones de OO, esto con la finalidad de mantener a las madres en un ambiente de L/O.
- Crías en oscuridad constante: Del nacimiento (P0) hasta el destete (P23) estuvieron expuestas a oscuridad constante durante las 24 horas. Para evitar que las madres lactantes se expusieran a esta condición, las madres se intercambiaron entre ellas cada 12 horas. Estuvieron en una condición de OO y después de 12 horas, amamantaban una camada que estaba en condiciones de LL, esto con la finalidad de mantener a las madres en un ambiente de LO.

Algunas crías fueron utilizadas para los experimentos a corto plazo (P23), otras crías se utilizaron para las evaluaciones a largo plazo (P90). Para ello, se colocaron 4-5 crías del mismo sexo y misma condición de lactancia en condiciones de LO desde el día P23 a P70. A partir del día P70 al P90 se colocaron en cajas individuales para monitorear su actividad general como se indica más adelante.

5.3 Intercambio de madres lactantes.

Durante los primeros 23 días las crías fueron alimentadas por ratas lactantes mantenidas en un ciclo de LO/12:12. Para lograr el ciclo LO en las madres de las crías OO y LL, estas, pasaban 12 horas con una camada bajo LL y 12 horas con una camada bajo OO. Las madres de los grupos LO se intercambiaron también como una estrategia de control para la manipulación

diaria. Estas madres LO se intercambiaron entre sí. El prendido de la luz fue a las 07:00 h. y el apagado a las 19:00 h.

El día 23 las ratas fueron destetadas y separadas de la rata madre y divididas en hembras y machos se alojaron en jaulas de la misma condición, todas se mantuvieron bajo el mismo ciclo ambiental LO (12h: 12h) y tuvieron libre acceso al agua y al alimento hasta el último día del registro experimental (día 90).

5.4 Registro automatizado de actividad general

El registro conductual se realizó por medio de un sistema automatizado de actividad que utiliza sensores de presión colocados debajo de cada hábitat de las ratas. Estos sensores están conectados a una PC que recolecta las veces que son activados por el movimiento de las ratas y acumula las cuentas cada minuto, lo que nos proporciona información sobre la cantidad de veces que la rata se mueve en un determinado tiempo y a lo largo de 24 h.

La PC convierte el registro de los sensores en actogramas, los cuales son representaciones gráficas en donde la acumulación de cuentas del registro se grafica en forma de barras. Estas gráficas se ordenan horizontalmente cada 24 horas, lo que permite visualizar día por día la actividad de los animales. Además, la computadora muestra el registro en doble gráfica, para que se pueda apreciar mejor la actividad de cada día. Los datos de conducta se analizaron con el programa SPAD 9 diseñado para nuestro laboratorio (SPAD9 versión 1.1.1 basado en Matlab, Omnia SA de CV).

Estas pruebas permiten determinar la organización temporal bajo los distintos tratamientos. Para determinar el pico de actividad (acrofase) se utilizó un análisis de cosinor que se basa en el ajuste de una curva sinusoidal y por estimación algebraica se determina el momento de máxima expresión, $Y(t) = M + A \cos(2\pi t/T + \phi) + e(t)$ M =mesor, A =amplitud, ϕ =acrofase, t =periodo, $e(t)$ error). Para los efectos a largo plazo, las ratas fueron monitoreadas individualmente desde el P70 al P90 ($n=10$ / grupo).

5.5 Obtención de tejido

El día P23 y P90 las ratas se anestesiaron con una sobredosis de pentobarbital (0.63 g/ kg; Pisabental, Pisa agropecuaria S.A. de CV., México) y fueron perfundidas a través del ventrículo izquierdo del corazón hacia la arteria aorta. Al P23 se utilizó aproximadamente 150 ml de solución salina isotónica al 0.9% seguido de 150 ml de paraformaldehído al 4.0% en buffer fosfato (PBS, 0.1 M, con un Ph de 7.2) y ácido pícrico (0.2%); las ratas al P90 fueron perfundidas con 250 ml de salina y 250 ml de paraformaldehído. Cuando los sujetos estuvieron expuestos a su fase de oscuridad, fueron anestesiados y una vez inconscientes, se les cubrieron los ojos para prevenir la exposición a la luz y fueron inmediatamente perfundidos. Se extrajeron los cerebros con ayuda de instrumental quirúrgico y se post fijaron en paraformaldehído al 4.0% durante una hora. Posteriormente los tejidos fueron almacenados en sacarosa al menos 24 horas para su crioprotección.

5.6 Histología de la retina

Al día P23 (n=4/grupo) y al P90 (n=4/grupo), se anestesió y perfundió a las ratas con 250 ml de salina seguido de 250 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% en 0.1Mm de buffer de fosfato (PB) con un pH de 7.2. Los ojos fueron removidos y post fijados en PFA 4% por 2 horas, pasadas las 2 horas se realizaron 3 lavados en PB, 0.1Mm, pH 7.2 para posteriormente ser deshidratados y sumergidos en parafina. Secciones transversales de la retina (6 μ m) fueron teñidas por el método de hematoxilina-eosina (HE, Sigma #H9627). Posteriormente las secciones fueron montadas y visualizadas bajo un microscopio de luz (Olympus BX41; Olympus, Japan). La captura de las microfotografías se realizó con un objetivo de 20x con el sistema de análisis de imágenes (MetaVue 4.5, Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA, USA). Las imágenes tomadas de la retina fueron posteriormente analizadas usando el software ImageJ. El grosor de cada capa de la retina fue obtenido usando la herramienta "straight". Se realizó la medición del grosor en cada una de las capas de la retina tal como lo realizo Mengual, 2014 (Mengual et al. 2014) de cada capa de la retina para cada una de las condiciones (LO, LL, OO).

Las capas de la retina a evaluar se clasificaron de la siguiente forma: capa de fotorreceptores, membrana limitante externa, capa nuclear externa, capa plexiforme externa, capa nuclear interna, capa plexiforme interna y capa de células ganglionares. El número de células ganglionares se contó usando la herramienta “multi-point” en un segmento de 325 μm de la retina, y utilizando una estrategia de doble ciego.

5.7 Proyecciones de la retina hacia el NSQ

El día P23 y P90 (n=3/grupo) los animales se anestesiaron con la combinación de ketamina/xilazina (0.18 ml y 0.1ml; 36 mg/kg, 6,2 mg/kg respectivamente), bajo anestesia los animales recibieron una inyección unilateral e intravitreal de la subunidad B de la toxina de cólera (CTB) como trazador, (5 μL , CTB- Sigma-Aldrich). Concretamente, se ha demostrado que el empleo de CTB es adecuado para el trazado de las conexiones retinofugales (Prichard et al., 2007).

La metodología seguida fue la siguiente: una vez inmovilizados los animales, se accedió al globo ocular y se utilizó una jeringa Hamilton de 10 μL (Hamilton, Reno, NV). Se inoculó un volumen total de (5 μL de CTB al 0.1% en agua destilada en el humor vítreo, la aguja se dejó en el espacio vítreo durante 1 minuto para minimizar el reflujo de la cánula. Cinco días después de la inyección (P28 y P95) los animales fueron sacrificados con una sobredosis de pentobarbital y perfundidos con 250ml de salina y en seguida una administración de 250ml de PFA al 4%. Los cerebros fueron removidos y post fijados por 24 horas, crioprotectados en una solución de sacarosa al 30% por un periodo de 48-72 horas, posteriormente fueron congelados y cortados a -20°C en secciones coronales de 35 μm . Las secciones obtenidas fueron procesadas con el anticuerpo anti tóxina de cólera (anti-CTB made in rabbit, 1:2000; Sigma-Aldrich), con este anticuerpo se reconocieron las células infectadas desde la retina hacia el NSQ y después fueron procesados mediante el procedimiento de avidina biotina seguido de la tinción mediante 3,3'-diamino benzidina.

Las secciones fueron montadas y visualizadas bajo un microscopio de luz (Olympus BX41; Olympus, Japan), la captura de las imágenes se realizó con

un objetivo de 10x y se evaluaron con el software Image J para determinar el área ocupada por las fibras marcadas en el NSQ.

5.8 Respuesta del NSQ a un pulso de luz

Con la finalidad de poner a prueba la funcionalidad de las proyecciones de la retina hacia el NSQ, un subgrupo de ratas de cada condición (LD, OO y LL) al día P70 se expusieron a condiciones constantes de oscuridad durante 3 días, al cuarto día bajo OO las ratas recibieron un pulso de luz de 250 lux por 1 hora en su respectivo CT6. Una vez concluido el pulso de luz, los animales fueron perfundidos usando la misma metodología descrita en párrafos anteriores. Los cerebros fueron removidos y post fijados por 24 horas en PFA 4%, posteriormente fueron crioprotegidos en una solución de sacarosa al 30%, congelados y cortados a -20°C en secciones coronales de 35µm. Las secciones de tejido fueron incubadas en anticuerpo para c-Fos (rabbit polyclonal, 1:2500; Millipore Corp., USA).

5.9 Re-sincronización ante un avance de fase de 6 horas

Ratas de P50 (n=6/grupo, LD-LD, DD-LD, LL-LD) se colocaron en el sistema de monitoreo de actividad locomotora, se obtuvo una línea base de registro de actividad locomotora de P63-P70. En P70 los animales fueron expuestos a un avance de fase de 6 horas, esto se realizó apagando la luz de los sistemas de registro en ZT6. A partir del cambio de fase los animales fueron monitoreados durante los 6 días siguientes. Se realizó un análisis de cosinor (descrito arriba) para determinar las nuevas acrofases de actividad locomotora. La acrofase esperada se obtuvo a partir de la resta de la acrofase durante la línea base menos las 6 horas del avance de fase. Este valor fue comparado contra la media de las acrofases de cada día transitorio. Si se encontraba diferencia estadística entre el valor esperado y la media de la acrofase de cada uno de los días transitorios esto indicaba que los animales aún no habían alcanzado una resincronización.

6. Análisis estadístico

Los datos fueron organizados por grupos y están representados como la media \pm error estándar de la media (E.E.M.). Todos los análisis de ANOVA fueron seguidos por una prueba post-hoc Tukey para comparaciones múltiples. Para el análisis del grosor de las capas de la retina, densidad óptica y la expresión de c-Fos se realizó un ANOVA de 1 vía seguido de un análisis post-hoc de Tukey. Con el fin de cuantificar el número de días que los animales de cada uno de los grupos tardaban en resincronizarse a un avance de fase de 6 horas, hicimos una prueba t de Student y un ANOVA de 1 vía. Todo el análisis estadístico y la construcción de gráficas se realizaron con el software Graph Prisma 6.0.

7. RESULTADOS

7.1 La luz constante indujo alteraciones en la morfología de la retina a corto y a largo plazo.

A corto plazo las retinas pertenecientes al grupo bajo el ciclo LO tuvieron una distribución normal en cada una de las capas. La capa de fotorreceptores (conos y bastones) mostro una morfología normal; la membrana limitante externa no mostro cambios estructurales; la capa nuclear externa mantuvo un grosor normal y con células heterogéneas; la capa plexiforme externa mostro capilares bien definidos y una correcta alineación; la capa nuclear interna mostro núcleos definidos con algunos capilares entre ellos, la capa plexiforme interna tuvo un grosor normal y finalmente las células ganglionares mostraron heterogeneidad en el tamaño de los núcleos.

Las retinas del grupo OO tuvieron una menor heterogeneidad. La capa de fotorreceptores (conos y bastones) fue más amplia que el grupo control LO; la membrana limitante externa no tuvo modificaciones estructurales; la capa nuclear externa mostro un mayor espacio intercelular a diferencia del grupo control LO pero con un grosor normal; la capa plexiforme externa muestra capilares definidos; la capa nuclear interna tuvo núcleos más grandes y menos teñidos, además de un mayor espacio intercelular a diferencia del grupo control, la capa plexiforme interna tuvo un grosor normal y finalmente las células ganglionares también mostraron heterogeneidad en el tamaño de sus núcleos.

Las retinas de las ratas del grupo LL mostraron una pérdida notable de la capa de fotorreceptores (conos y bastones) a diferencia de los grupos LO y OO; además la membrana limitante externa tuvo un menor tamaño.; La capa nuclear externa mostro un grosor anormal, vacuolización y menor cantidad celular; mientras que la capa plexiforme externa tuvo vacuolización y edema; la capa nuclear interna mostro pérdida de núcleos y kariorexis; la capa plexiforme interna demostró estar menos eosinofílica además de gliosis a expensas de

microglía, finalmente las celulares ganglionares reflejaron degeneración y pignosis.

Al realizar el análisis estadístico, las retinas de los animales criados bajo condiciones de LL mostraron en P23 cambios morfológicos caracterizados por un decremento en el grosor de las capas que la componen (Fig. 1A), especialmente en la capa de fotorreceptores ($F_{(2,9)} = 10.05$ $P < 0.005$) y la de las células ganglionares ($F_{(2,9)} = 6.128$ $P < 0.02$). El número total de células ganglionares fue menor en el grupo LL y en el grupo OO en comparación con el grupo LD ($F_{(2,9)} = 6.679$, $P < 0.01$; Figura 1B).

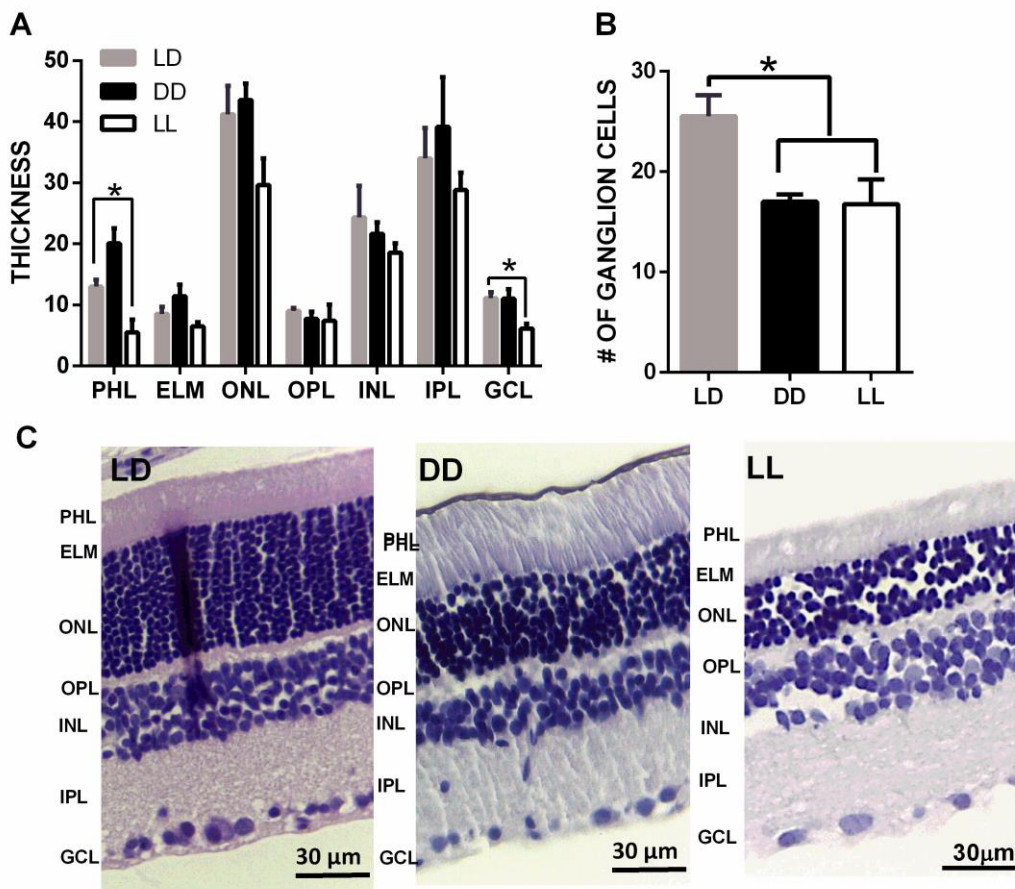


Figura 1. Efectos de las condiciones de luz sobre la morfología de las retinas de ratas al finalizar la etapa de lactancia (P23). En A) se muestra el análisis morfométrico cuantitativo de cada capa, B) Número de células ganglionares, C) microfotografías representativas de la retina de un sujeto por grupo, barra de escala=30µ, * $p < 0.05$. PHL (photoreceptor layer), ELM (external limiting membrane), ONL (outer nuclear layer), OPL (outer plexiform layer), INL (inner nuclear layer), IPL (inner plexiform layer), GC (ganglion cell layer) por sus siglas en ingles.

A largo plazo las retinas del grupo LD mostraron una disminución y cambio morfológico en la capa de fotorreceptores, sin embargo, cada una de sus capas se mantuvieron definidas. Las retinas de este grupo mantuvieron una distribución normal en la membrana limitante externa no mostró cambios estructurales; la capa nuclear externa mostro grosor normal; la capa plexiforme externa mostro una correcta alineación; la capa nuclear interna mostro núcleos definidos con algunos capilares entre ellos, la capa plexiforme interna tuvo un grosor normal y finalmente las células ganglionares mostraron heterogeneidad en el tamaño de los núcleos, sin embargo hubo una modificación morfológica con mayor espacio entre los núcleos.

Las retinas bajo condiciones de OO-LD mostraron una ligera atrofia retinal, aunque preservando cada una de sus capas, no hubo una reducción significativa en la membrana limitante externa, sin embargo, la capa nuclear externa mostro una reducción en el tamaño de la capa. La capa nuclear interna mostro un mayor espacio intercelular a diferencia del grupo control, la capa plexiforme interna tuvo un grosor normal, pero hubo una modificación a nivel morfológico, las células ganglionares mostraron diferencias en el tamaño de sus núcleos y en la morfología, la capa nuclear externa, la capa plexiforme externa, mostraron una disminución en el tamaño, además de que esta última mostro desplazamiento. La capa plexiforme mostro un grosor anormal y finalmente la capa de las celulares ganglionares reflejaron degeneración y en su organización.

Además de una reducción en el grosor, un punto importante en los resultados de las retinas de animales en la etapa adulta es que hay capas que desaparecieron por completo, el epitelio pigmentario ha desaparecido, aunque los segmentos externos e internos se degeneraron.

Las retinas de las ratas del grupo LL mostraron una amplia perdida de la capa de fotorreceptores (conos y bastones) a diferencia de los grupos LO y LO-OO, así como de la membrana limitante externa y de la capa nuclear externa y de la plexiforme externa. La capa nuclear interna permaneció relativamente intacta. Sin embargo, las capas mostraron atrofia, un cambio notable en la arquitectura y la organización de la retina. Hubo remanentes de las capas nuclear interna y

la capa plexiforme interna. Las células ganglionares también permanecieron, aunque se vieron desorganizadas.

A largo plazo (P90), en las ratas de la condición LL-LO, encontramos un decremento en la capa de fotorreceptores (PHL) en comparación con el grupo LO-LO y OO-LO ($F_{(2,9)} = 11.14$, $P < 0.05$). Otra capa afectada fue la capa nuclear externa (ONL) la cual también se encontró reducida en grosor, cuando fue comparada con los grupos LO-LO y OO-LO ($F_{(2,9)} = 5.613$, $P < 0.05$; Fig.2A).

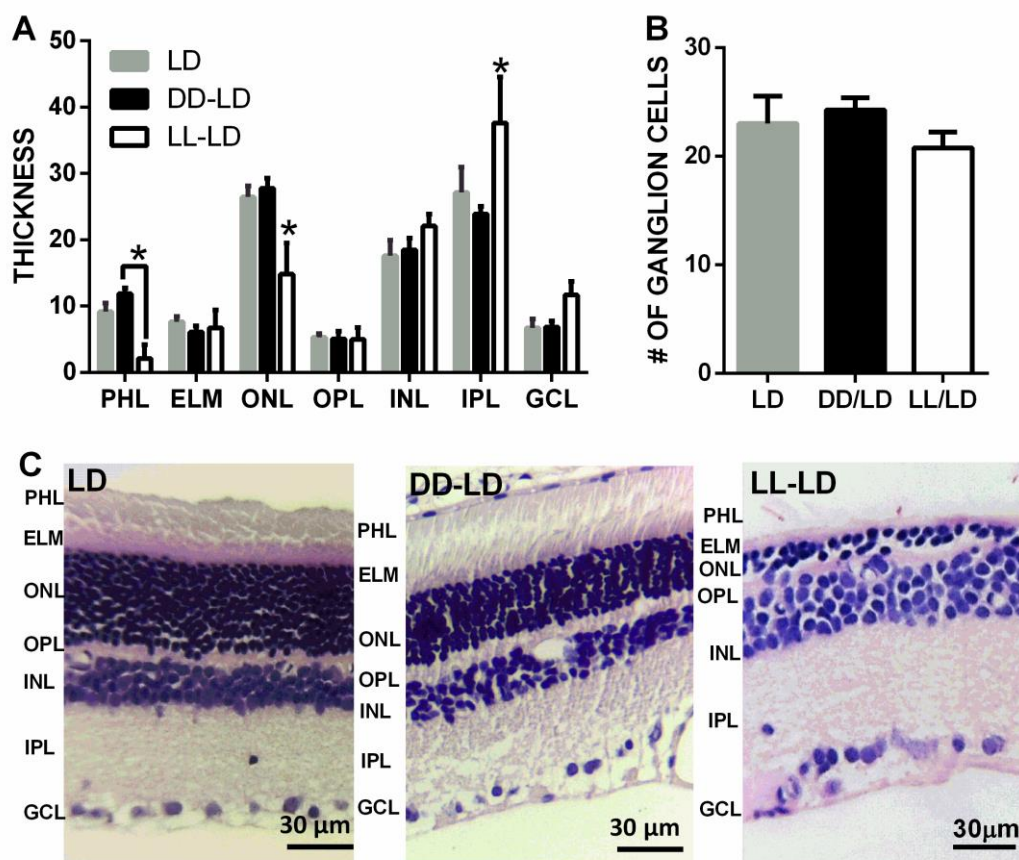


Figura 2. Efectos de las condiciones de luz sobre la morfología de las retinas de ratas al finalizar la etapa adulta (P90). En A) se muestra en análisis morfométrico cuantitativo de cada capa, B) Número de células ganglionares, C) microfotografías representativas de la retina de un sujeto por grupo, barra de escala=3030 μm, * $p < 0.05$. PHL (photoreceptor layer), ELM (external limiting membrane), ONL (outer nuclear layer), OP (outer plexiform), INL (inner nuclear layer), IPL (inner plexiform layer), GC (ganglion cell layer) por sus siglas en ingles.

6.2 Las condiciones constantes de luz indujeron un decremento en la densidad de inervación hacia el NSQ.

El experimento con el trazador CTB reveló que los axones de las células ganglionares proyectan tanto a la región ventrolateral como a la región dorsomedial del NSQ (Figura 3A). A corto plazo (P23) los animales criados bajo condiciones de LL mostraron una baja en la densidad de inervación hacia el NSQ al evaluar el área total ocupada por el CTB ($F(2,6) = 14.982, P = 0.004$). Al hacer el análisis por área, sólo el grupo bajo condiciones de LL mostró diferencias significativas en la región ventral ($F(2,6) = 12.92, P = 0.006$), sin embargo, en la región dorsal no hubo diferencias entre los grupos ($F(2,4) = 11.55, P = 0.008$), (Figura 3 A y B).

Al día P90 el grupo de animales bajo OO-LO mostró un patrón total de inervación menor comparado con el grupo LL-LO Y LO-LO ($F(2,6) = 6.935, P = 0.027$). Al hacer el análisis por región encontramos diferencias significativas entre los grupos al evaluar la región ventrolateral ($F(2,6) = 1.290, P = 0.3419$), sin embargo, sólo el grupo LL-LO mostró diferencias significativas con respecto a los grupos DD-LO y LO-LO en la región dorsal ($F(2,6) = 12.71, P = 0.007$). (Figura 3 C y D).

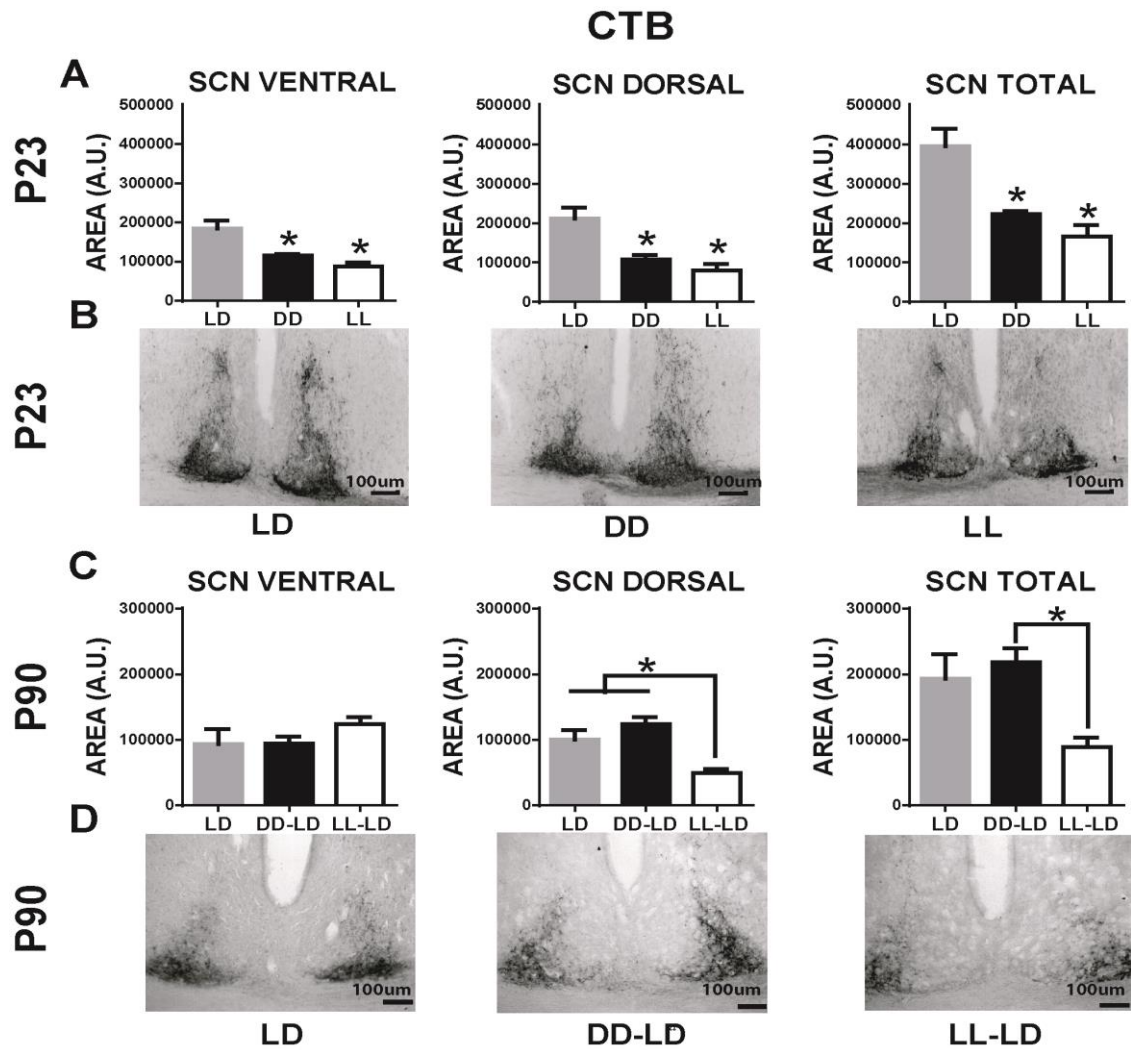


Figura 3. Proyección del tracto retinohipotalámico en el núcleo supraquiasmático de animales expuestos a diferentes condiciones de luz al finalizar la etapa de lactancia (P23) y la etapa adulta (P90). La inyección con CTB se realizó en la cámara interna de un solo ojo, es decir de manera unilateral; las fibras se detectaron invadiendo la mayor parte del volumen de los dos núcleos supraquiasmáticos. A. Área ocupada por la Inervación de fibras marcadas con CTB provenientes del TRH al final de la etapa de lactancia (P23). B) Microfotografías representativas del núcleo supraquiasmático medial que muestran inervación de CTB desde la retina al final de la etapa de lactancia. C) Área ocupada por la Inervación de fibras marcadas con CTB provenientes del TRH al final de la etapa adulta (P90). D) Microfotografías representativas del núcleo supraquiasmático medial que muestran inervación de CTB desde la retina al final de la etapa adulta (P90). No se observa alteración en el transporte del CTB de la retina hacia el Núcleo Supraquiasmático.

6.3 La respuesta de c-Fos en el NSQ después de un pulso de luz se redujo en animales expuestos a LL.

Después de un pulso de luz durante una hora (ZT6-ZT7), el grupo LD mostró un incremento en la inmunoreactividad para c-Fos tanto en la región ventral como dorsal del NSQ. El número total de células positivas a c-Fos en los grupos OO-LO y LL-LO se vio disminuido en comparación con el grupo LD ($F_{(2,12)} = 39.93$, $P < 0.0001$). Este efecto fue también observado en la región ventral ($F_{(2,12)} = 11.78$, $P < 0.005$) y en la región dorsal después del pulso de luz ($F_{(2,12)} = 14.33$, $P < 0.005$), (Figura 4A y B).

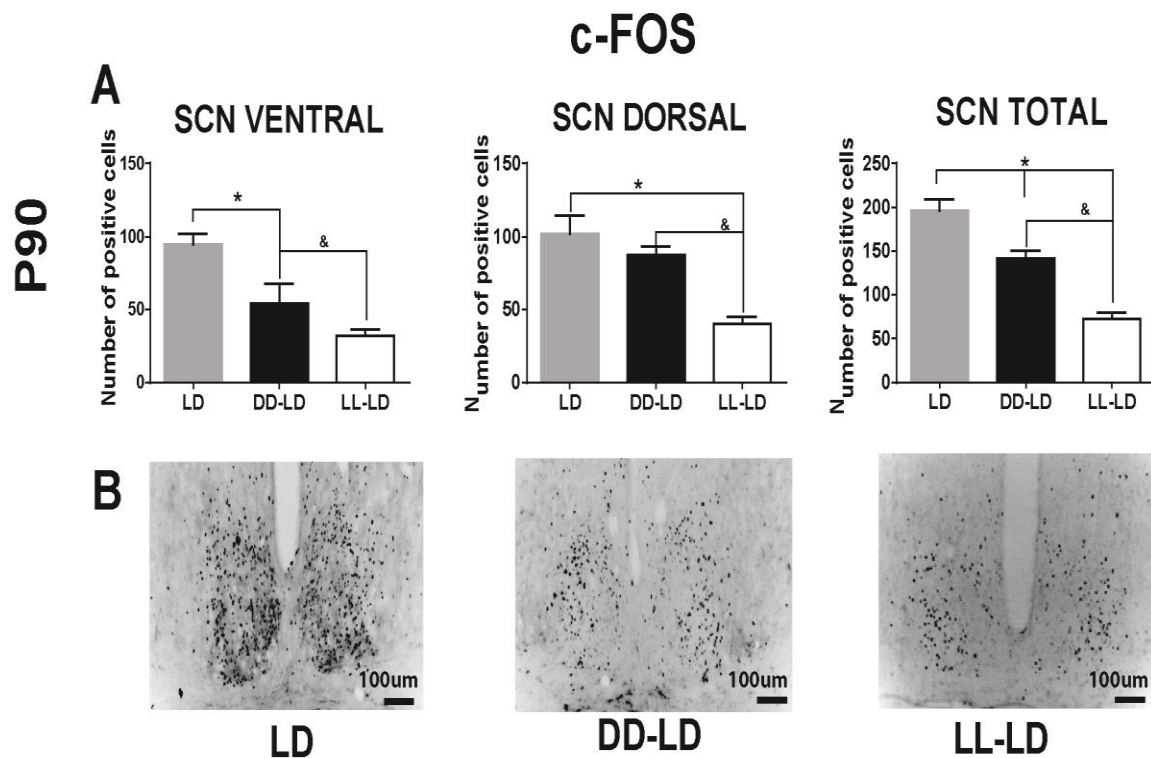


Figura 4. A) Numero de células inmunopositivas c-Fos en el área dorsal, ventral y total del SCN. * y & = $p < .05$. B) Microfotografías representativas del núcleo supraquiasmático medial que muestran células positivas para c-Fos una hora después del pulso de luz.

6.4 Las ratas expuestas a condiciones de luz constante durante la lactancia tardaron más ciclos transitorios para resincronizarse después de un avance de fase de 6 horas.

La inspección visual de los actogramas nos permitió identificar que durante la línea base todas las ratas exhibieron un ritmo diario de actividad locomotora (Figura 4A, C y E). Para el grupo LO, la media de la acrofase se encontró en ZT18 y para los grupos OO-LO y LL-LO se encontró en ZT17.53 y ZT17.35, respectivamente. Después de un avance de fase de 6 horas, el grupo control mostró 6 ciclos transitorios para la resincronización de la actividad locomotora cuando se analizó el último día del análisis ($t=0.3629$, $df=5$, $P=0.05$ t test; Fig. A y B). Los animales bajo las condiciones de OO-LO y LL-LO no fueron capaces de re sincronizarse después de 6 días (OO-LO $t=4.344$, $df=5$, $P<0.05$, LL-LO $t=3.488$, $df=5$, $P<0.05$; Fig.4 C- F).

PHASE ADVANCE

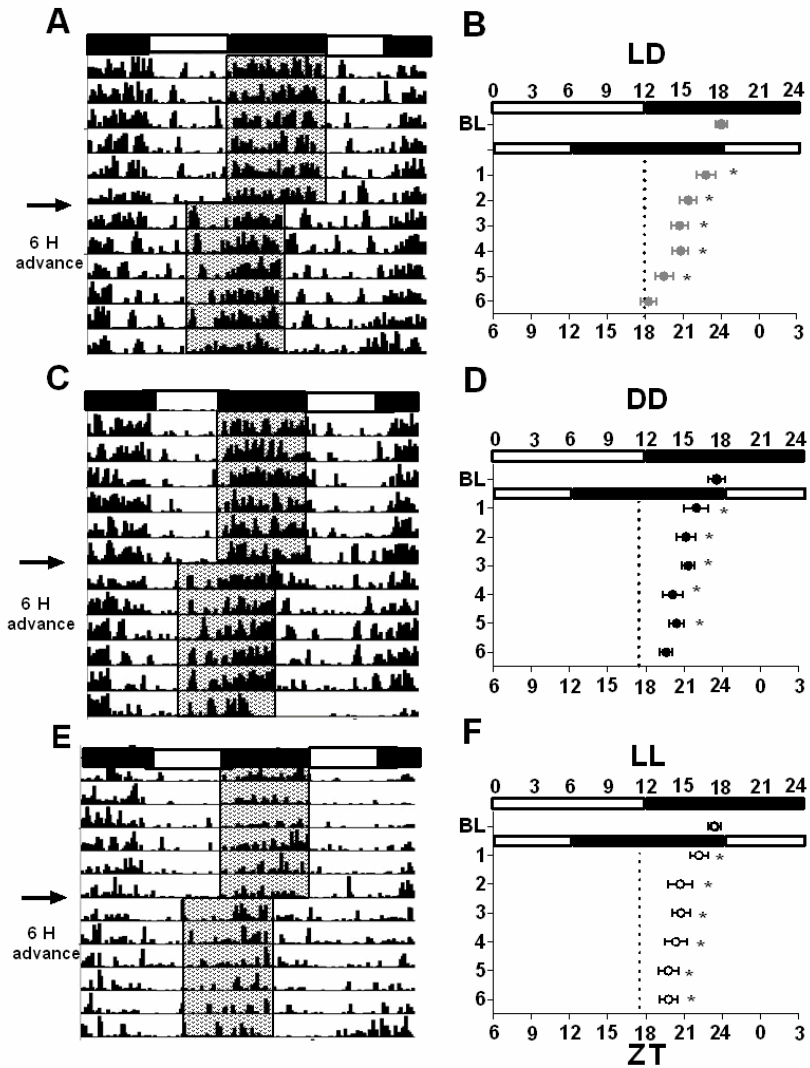


Figura 5. Resincronización después de un avance de fase de 6h. Actogramas representativos de la actividad general de los grupos LO-LO (A), OO-LO (C) y LL-LO (E) expuestos a un avance de fase de 6 h (flecha en eje izquierdo). B, D, F) Mapa de acrofases mostrando las medias \pm EEM de la actividad general durante la línea de base (BL) y durante los siguientes 6 días después del cambio de fase. (N=6). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a la nueva fase esperada (línea de puntos) después del avance de fase de 6 h ($P < 0.05$). Las barras horizontales blancas y negras sobre el eje X y sobre los actogramas indican el ciclo de luz - oscuridad.

7. DISCUSIÓN

Con el presente estudio determinamos que las condiciones constantes de luz durante la lactancia generan un impacto negativo sobre el desarrollo del sistema circadiano y sobre la regulación metabólica. Otros estudios han observado efectos adversos similares sobre el metabolismo y sobre la salud en roedores nocturnos adultos y en humanos (Chang, et al, 2015; Haim & Zubidat, 2015). En esta tesis observamos que las condiciones constantes de luz (luz u oscuridad constantes) ejercen efectos adversos en el desarrollo del sistema circadiano, nuestros resultados muestran que tras la exposición a un ciclo LO después de la lactancia, se revirtió el patrón arrítmico de la actividad locomotora, sin embargo, no se restauró el patrón circadiano de VIP, AVP, y PER1, lo que generó una alteración a largo plazo sobre la función del NSQ. Las condiciones constantes de luz durante la lactancia también indujeron cambios morfológicos en la retina, así como una disminución en el número de células ganglionares, en la inervación hacia el NSQ vía el TRH, así como dificultad en la capacidad de NSQ para responder a la luz y a un cambio de fase de 6 horas. Nuestros resultados indican que las condiciones de iluminación constante durante las primeras etapas de desarrollo tienen efectos negativos, no sólo a corto plazo, en la edad adulta, también se observó un efecto negativo, sobre la función del sistema circadiano y en la regulación de variables metabólicas.

Estudios previos han demostrado que las condiciones de luz constante durante la lactancia pueden alterar el desarrollo del NSQ y alterar los patrones de actividad locomotora general en etapas tempranas del desarrollo. (Canal et al., 2000; Ohta et al., 2005). Los resultados de esta tesis confirman este efecto ya que, la mayoría de las camadas expuestas a las condiciones de LL mostraron patrones de actividad locomotora arrítmicos. Los actogramas obtenidos en esta tesis durante la etapa de lactancia son una representación de la camada total, es decir se refleja la actividad general de las crías y la actividad de las madres que amamantaban cada 12 horas, La primera fase (23 días) es un registro de la actividad locomotora de las ratas neonatas junto con la rata madre lactante. El registro conductual del grupo LL mostro un decremento en la cantidad de

actividad durante las 24 horas con un patrón arrítmico. Nuestros resultados también coinciden con los de Hidenobu en 2006 (Hidenobu et, al. 2006) donde las ratas neonatas bajo condiciones de luz constante muestran arritmicidad y disminuye su actividad locomotora.

Nuestro trabajo aporta información novedosa ya que las crías expuestas a OO exhibieron ritmos de baja amplitud, indicando que es la falta de un ciclo diario de LO la que tiene efectos adversos. Este mismo efecto fue observado sobre el NSQ, siendo evidente una baja amplitud o la pérdida de ritmos observada en las fluctuaciones diarias de VIP, AVP y PER1, que se reflejó en la pérdida de ritmos en los niveles séricos de glucosa y TG. Efectos similares sobre el NSQ se habían descrito previamente en roedores adultos expuestos a LL, en donde los ritmos de ARNm de VIP y AVP se veían abolidos en ratas expuestas durante tres semana a condiciones de LL, (Isobe & Nishino, 1998), lo cual concuerda con nuestros resultados.

Además de la pérdida de ritmicidad en el NSQ, bajo condiciones constantes, encontramos una reducción en el número de células inmunopositivas para VIP, AVP y PER1. Previamente una reducción de neuronas y células gliales en el NSQ de roedores expuestos a condiciones constantes durante la lactancia había sido descrita (Cambras et al.,2015) , señalando a esta etapa como un período crítico para la plasticidad y el desarrollo del NSQ.

Los efectos encontrados sobre el NSQ persistieron a los 90 días postnatales, lo cual indica que la falta del ciclo LO durante la lactancia tiene efectos a largo plazo sobre el sistema circadiano. Es importante indicar que, aunque se vieron disminuidas las células positivas a VIP y AVP, estas células estaban presentes en el NSQ en la etapa adulta, estas células, fueron suficientes para generar actividad locomotora circadiana a largo plazo. Diferentes estudios han demostrado que después de lesiones electrolíticas, la supervivencia de al menos 25% de cualquier porción del NSQ es suficiente para generar ritmicidad (Davis & Gorski, 1988; Van den Pol & Powley, 1979), comparado con este estudio, nosotros encontramos al díaP90, más del 70% de células en comparación con el grupo LD, tanto para AVP y VIP en los grupos OO-LO y LL-LO, lo cual explicaría porque los animales vuelven a presentar una conducta de sincronización

Durante la lactancia, la madre es capaz de sincronizar a las crías a través de señales conductuales y fisiológicas (Christ & Von Gall, 2012; Davis & Gorski, 1988). La sincronización materna es necesaria hasta que la cría adquiere la capacidad de sincronizarse por sí misma con en el ciclo LO (Sumova et al., 2012). Diferentes estudios han demostrado que durante la gestación la melatonina materna juega un papel importante para la sincronización de las crías y para el desarrollo del sistema circadiano, así como del metabolismo (Ferreira et al., 2012; Mendez et al., 2012; Rowe & Kennaway, 2002). Toki y colaboradores (Toki et al., 2007) demostraron en ratas que las condiciones de iluminación alteran la regulación circadiana en la madre lactante y alteran las interacciones madre-hijo, lo cual genera a largo plazo trastornos en la conducta emocional y produce déficits cognitivos. Tomando en cuenta estos resultados, implementamos una manipulación experimental donde sólo se expuso a las crías a condiciones constantes y permitió mantener a las hembras lactantes en un ciclo de 12:12/ LO. Este procedimiento evitó que las madres estuvieran expuestas a condiciones constantes, lo cual podría haber tenido un impacto sobre los ritmos hormonales y de variables metabólicas que podrían alterar a las crías.

La exposición a condiciones normales de LO después de la lactancia impuso un ritmo definido con actividad predominante durante la noche, lo que sugiere que los efectos observados en la actividad general en las crías bajo OO y LL pueden revertirse. Efectos similares fueron reportados por Ohta et al. (Ohta & McMahon, 2006) en ratones criados desde P0 hasta P20 bajo LL, y que pasado este tiempo fueron expuestos a LO. Además, ratas y ratones criados en LL u OO aunque pudieron re-sincronizarse al nuevo ciclo de LO, no recuperaron la amplitud del ritmo conductual (Canal, et al., 2000; Smith & Canal, 2009). Este proceso sugirió enmascaramiento ante el nuevo ciclo de LO (Mrosovsky, 1999) en el que otras estructuras cerebrales podrían estar guiando el ritmo observado en la actividad general. Se ha propuesto que la ritmicidad locomotora diaria también pudiera ser influenciada por señales fóticas que llegan directamente a otras áreas del cerebro, además, se ha descrito que las células ganglionares son capaces de proyectar a otras estructuras cerebrales

como la hojuela intergeniculada, el núcleo preóptico ventrolateral, la habénula lateral, entre otros (Hattar et al., 2006).

En este estudio, no exploramos otras regiones hipotalámicas o áreas que reciben información fótica de la retina. En un estudio de Husse (Husse et al., 2014), los ratones con ablación genética del NSQ fueron capaces de mantener los ritmos diarios en los osciladores periféricos y la relación de fase entre ellos se preservó bajo un ciclo LO. Sin embargo, cuando fueron expuestos a condiciones constantes (OO), los ritmos se atenuaron y más tarde se desincronizaron. Tales hallazgos sugieren que la vía fótica puede sincronizar la actividad locomotora y los osciladores periféricos a través de vías independientes al NSQ. Por lo anterior consideramos necesaria la exploración de la interacción del NSQ con otros núcleos hipotalámicos, con el fin de entender los mecanismos que pudieran imponer ritmicidad a la actividad general, independientes al NSQ.

En una segunda etapa demostramos que la retina, la principal entrada de luz al NSQ, tuvo un cambio morfológico y así como en el número de las células ganglionares en aquellos animales expuestos a condiciones de LL. La retina mostró una reducción en su grosor causado por una reducción en las capas PHL y GCL al finalizar la etapa de lactancia y en la PHL y ONL en la adultez. Esta reducción se observó a corto y a largo plazo, lo cual sugiere un daño permanente por las condiciones de LL. Estudios previos han encontrado resultados similares (Borges, et. al; 1990; Williams & Howell, 1983), en donde tras la exposición a LL la morfología de la retina de ratas Wistar se vio modificada.

Se ha propuesto que en ratas albinas la intensidad de luz y la edad son factores que inducen daño en la retina (Weisse et al., 1974). En nuestro estudio es importante resaltar que el número de células ganglionares, las cuales generan las proyecciones al NSQ mostraron una reducción en ratas expuestas a LL durante la lactancia. Como se mencionó previamente, un subgrupo de células ganglionares, las M1 Brn3b-negativas son las responsables de enviar información fótica a la retina al NSQ (Chew et al., 2017). Podemos especular que la reducción de CG que encontramos en P23 podría incluir a este subgrupo de células. Dado que las CG son la principal fuente de luz al NSQ una

reducción o pérdida de estas células podría llevar a déficits de la entrada fótica al sistema circadiano.

Como demostramos previamente los principales péptidos en el NSQ se encuentran arrítmicos ante la exposición a LL durante la lactancia. La expresión rítmica de estos péptidos es dependiente en parte de la entrada fótica, principalmente la de VIP en la región ventrolateral (Ban, et al., 1997). Por lo tanto, como encontramos una reducción en el número de células ganglionares decidimos evaluar si los axones de estas células alcanzaban a las células del NSQ.

Las proyecciones de las CG hacia el NSQ, alcanzaron tanto la región ventrolateral como la dorsomedial del NSQ, tal como se ha demostrado previamente en estudios con trazadores neuronales aplicados en la retina (Hattar et al., 2006). Interesantemente se encontró una reducción en la densidad óptica de los axones que alcanzan el NSQ en animales criados bajo LL. Estos resultados corresponden con la reducción de CG que encontramos, lo cual sugiere que parte de las células que se perdieron después de la exposición a LL pertenecían al subgrupo de células M1 Brn3b-negativas. Cabe resaltar, que incluso en P90 después de la exposición a LD (P23-P90) la reducción en la densidad de proyección del TRH hacia el NSQ fue evidente, lo cual sugiere un efecto permanente a largo plazo. Dado que varios grupos han encontrado que un subgrupo de hasta 200 CGif son capaces de mediar la maduración dependiente de luz del reloj circadiano y de las proyecciones retinogeniculadas (Chew et al. 2017).

Asociado a la reducción de CG y de la reducida inervación al NSQ, animales criados en condiciones constantes de luz (LL y OO) mostraron un decremento en la respuesta de c-Fos a un pulso de luz tanto en la región VL como en la DM. Estos resultados podrían estar relacionados con la reducción en la expresión rítmica de VIP, AVP y PER1 observada por nosotros. Otros grupos han descrito que animales KO del receptor a VIP (VPAC2R) muestran una reducción en la expresión de c-Fos ante un pulso de luz (Harmar et al., 2002; Shen et al., 2000), lo cual sugiere que la respuesta fótica esta mediada parcialmente por las células VIPérgicas. Las células de VIP de la región ventrolateral expresan principalmente el gen reloj Per1, el cual ante un pulso de

luz muestra una reducción en su expresión (Kuhlman, et al. 2003). La carencia de ritmicidad en células que expresan VIP y PER1 en la región ventrolateral, podría repercutir sobre la pérdida de ritmo de AVP en la región dorsomedial de animales criados bajo condiciones constantes de iluminación, dado que la interrelación que existe entre las regiones ventrolateral y dorsomedial es necesaria para la ritmicidad endógena. En esta función las células de AVP son necesarias para el acoplamiento neuronal entre ambas regiones (VL y DM ; Mieda et al., 2015b).

En animales LL a pesar de que los principales péptidos en el NSQ fueron arrítmicos, el ritmo de actividad locomotora mostró un patrón sincronizado al ciclo LO, con mayor actividad durante la fase de oscuridad y menor durante la fase de luz. Estos resultados pudieran deberse a la supresión de la actividad locomotora ante la exposición a luz (efecto de enmascaramiento) (Mrosovsky, 1999; Redlin & Mrosovsky, 1999) ya que las células ganglionares son suficientes para inervar al NSQ y a otras regiones relacionadas con la actividad locomotora (Fernandez et al., 2016). Nuestros resultados contrastan con los del grupo de Cambras (Canal & Cambras, 2000), quienes demostraron que animales expuestos a condiciones de LL durante la etapa de lactancia se mantuvieron arrítmicos durante la etapa adulta, mientras que otro grupo de animales a los que se les expuso a LL en una etapa más tardía se mantenían arrítmicos hasta la edad adulta. Cabe resaltar que estos animales eran mantenidos toda la vida en LL, lo anterior demuestra que la etapa donde se aplique la luz constante puede modificar la expresión de la actividad locomotora en la edad adulta. Dado que en este estudio encontramos una reducción en el número de células ganglionares y en la respuesta del NSQ a un pulso de luz, proponemos que la entrada de luz hacia el NSQ es suficiente para permitir la sincronización. Sin embargo, esta función se vio afectada cuando los animales fueron retados con un cambio de fase. Bajo esta condición, se evidenció la deficiencia del sistema a resincronizarse eficientemente. Mientras que animales criados bajo LD la resincronización al nuevo ciclo se alcanzó en 6 días tal como ha sido reportado por otros estudios (Yamazaki, 2000), los animales bajo LL y OO no lograron sincronizarse en 6 ciclos al nuevo ciclo LD. Esto podría estar relacionado con las alteraciones morfológicas de la retina y el número de

células ganglionares, lo cual coincide con previos hallazgos en donde se ha encontrado que animales KO específicos de glutamato en las CGif, muestran un mayor número de ciclos transitorios para resincronizarse a un avance de fase de 6 horas (Purrier, et al., 2014). Efectos similares se observaron con ratones KO de melanopsina que muestran ritmos estables ante un ciclo LD, pero cuando los animales KO de melanopsina fueron expuestos a un cambio de fase de luz la respuesta para resincronizarse a un cambio de fase fue un 40 % menos eficiente que en aquellos animales WT (Panda et al., 2002; Ruby et al., 2003) .

Se ha demostrado que la ablación específica de las células ganglionares que no inervan el NSQ, no tiene efecto sobre la sincronización ante un avance de fase. Los resultados de esta tesis doctoral muestran que la muerte de fotorreceptores retinianos afecta a largo plazo a todas las capas de la retina que pudieran provocar a largo plazo la muerte de las CGR, tal y como otros autores lo han descrito por un efecto de toxicidad (Villegas-Perez et al, 1998, Wang y cols, 2003). Se ha demostrado que tras la degeneración retiniana pudiera haber una remodelación retiniana que causa daños en las CGR como efectos secundarios a la muerte de los fotorreceptores retinianos, sin embargo en un estudio de Chen ,2011 (Chen et al.,2011), se demostró que al dejar intactas las CGs que inervan el NSQ la capacidad de los animales para adaptarse a un nuevo ciclo LD permanecía intacta, lo cual enfatiza el papel de las CGs en la adaptación a los cambios de luz, dado que nosotros encontramos una reducción general de células ganglionares, sugerimos que la reducción de células ganglionares que encontramos incluye a las células que inervan al NSQ, ya que los animales LL y OO tomaron un mayor número de ciclos transitorios para adaptarse a un nuevo ciclo LD.

8. CONCLUSIONES

Los presentes resultados destacan la importancia de respetar la periodicidad entre el ciclo luz-oscuridad. La alternancia día-noche es vital para el buen desarrollo postnatal y para el adecuado orden temporal interno guiado por el sistema circadiano. La lactancia es un período crítico para el desarrollo y funcionamiento del sistema circadiano, en esta etapa la iluminación constante

puede ejercer efectos adversos a largo plazo y permanentes sobre el sistema circadiano y metabólico.

En esta tesis demostramos que el modelo de iluminación por luz constante es un valioso modelo para estudiar el aumento de peso durante el desarrollo y la degeneración de la retina, dado que encontramos una degeneración completa de los fotorreceptores y cambios en la morfología de la retina, las condiciones de luz constante indujeron la degeneración de células ganglionares de la retina.

9. LISTA DE ABREVIATURAS

AVP: péptido de arginina vasopresina; CRY: Cryptochrome; OO: oscuridad constante; DM: Dorsomedial; LO: ciclo de luz-oscuridad; LL: luz constante; UCIN: Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales; P: días postnatales; PER: Período; SEM: Error Estándar; NSQ: núcleo supraquiasmático; TG: triacilglicéridos; VIP: péptido gastrointestinal; VL; ventrolateral; ZT: tiempo de Zeitgeber.

10. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Buijs por el anticuerpo AVP. Madahi Palma Gómez es estudiante de doctorado del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) 474129 de CONACYT. Este estudio fue apoyado por el programa universitario PAPIIT-DGAPA IG-200314 e IG-200417 y CONACyT 239403.

8. REFERENCIAS

Albrecht, U., Zheng, B., Larkin, D., Sun, Z. S., & Lee, C. C. (2001). MPer1 and mper2 are essential for normal resetting of the circadian clock. *Journal of Biological Rhythms*, 16 (2), 100–104. <https://doi.org/10.1177/074873001129001791>

Albrecht, U., & Ripperger, J. A. (2009). Clock Genes. *Encyclopedia of Neuroscience*, 1, 759–762.

Anders, T.F. (1982) Biological rhythms in development. *Psychosomatic Medicine* 1; (44):61-72.

Aton, S. J., Colwell, C. S., Hattar, A. J., Waschek, J., & Herzog, E. D. (2005). Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat Neurosci*, 8(4), 476–483.

Ban, Y., Shigeyoshi, Y., & Okamura, H. (1997). Development of Vasoactive Intestinal Peptide mRNA Rhythm in the Rat Suprachiasmatic Nucleus, 17(10), 3920–3931.

Bendová, Z., Sumová, A., & Illnerová, H. (2004). Development of circadian rhythmicity and photoperiodic response in subdivisions of the rat suprachiasmatic nucleus. *Developmental Brain Research*, 148(1), 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2003.10.007>

Bobu, C., Sandu, C., Laurent, V., Felder-Schmittbuhl, M.-P., & Hicks, D. (2013). Prolonged light exposure induces widespread phase shifting in the circadian clock and visual pigment gene expression of the *Arvicantha ansorgei* retina. *Molecular Vision*, 19(November 2012), 1060–73.

Borges JM, Edward, DP, Tso MO. (1990). A comparative study of photic injury in four inbred strains of albino rats. *Curr Eye Res* 9:799-803.

Borniger, J. C., McHenry, Z. D., Abi Salloum, B. A., & Nelson, R. J. (2014). Exposure to dim light at night during early development increases adult anxiety-like responses. *Physiology and Behavior*, 133, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.05.012>

Brandon, D. H., Holditch-Davis, D., & Belyea, M. (2002). Preterm infants born at less than 31 weeks' gestation have improved growth in cycled light compared with continuous near darkness. *Journal of Pediatrics*, 140(2), 192–199. <https://doi.org/10.1067/mpd.2002.121932>

Brooks, E., & Canal, M. M. (2013). Development of circadian rhythms: Role of postnatal light environment. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.02.012>

Brooks, E., Waters, E., Farrington, L., & Canal, M. M. (2011). Differential hypothalamic tyrosine hydroxylase distribution and activation by light in adult mice reared under different light conditions during the suckling period. *Brain Structure and Function*, 216(4), 357–370. <https://doi.org/10.1007/s00429-011-0318-9>

Brown, T. M., Colwell, C. S., Waschek, J. a, & Piggins, H. D. (2007). Disrupted neuronal activity rhythms in the suprachiasmatic nuclei of vasoactive intestinal polypeptide-deficient mice. *Journal of Neurophysiology*, 97(3), 2553–8. <https://doi.org/10.1152/jn.01206>.

Buijs RM, Van Eden CG, Goncharuk VD, Kalsbeek A. (2003) The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. *J Endocrinol.* Apr; 177(1):17-26.

Cambras, T., Canal, M. M., Cernuda-Cernuda, R., García-Fernández, J. M., & Díez-Noguera, a. (2015). Darkness during early postnatal development is required for normal circadian patterns in the adult rat. *Chronobiology International*, 32(2), 178–86. <https://doi.org/10.3109/07420528.2014.960048>

Cambras, T., López, L., Arias, J. L., & Díez-Noguera, A. (2005). Quantitative changes in neuronal and glial cells in the suprachiasmatic nucleus as a function of the lighting conditions during weaning. *Developmental Brain Research*, 157(1), 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.devbrainres.2005.02.014>

Canal-Corretger, M. M., Cambras, T., Vilaplana, J., & Díez-Noguera, a. (2000). Bright light during lactation alters the functioning of the circadian system of adult rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 278(Ld), R201–R208.

Canal-Corretger, M. M., Vilaplana, J., Cambras, T., & Díez-Noguera, a. (2001). Functioning of the rat circadian system is modified by light applied in critical postnatal days. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 280(4), R1023–R1030.

Canal, M. M., Mohammed, N. M., & Rodríguez, J. J. (2009). Early Programming of Astrocyte Organization in the Mouse Suprachiasmatic Nucleus By Light. *Chronobiology International*, 26(8), 1545–1558. <https://doi.org/10.3109/07420520903398542>

Ciarleglio C. , Gamble K. , Axley J. , Strauss B. , Cohen J. , Colwell C. , and McMahon D. (2009) Population encoding by circadian clock neurons organizes circadian behavior. *J Neurosci* 29:1670-1676

Chang, A.-M., Aeschbach, D., Duffy, J. F., & Czeisler, C. A. (2015). Evening use of light-emitting eReaders negatively affects sleep, circadian timing, and next-morning alertness. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(4), 1232–1237. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418490112>

Chen, S. K., Badea, T. C., & Hattar, S. (2011). Photoentrainment and pupillary light reflex are mediated by distinct populations of ipRGCs. *Nature*, 476(7358), 92–96. <https://doi.org/10.1038/nature10206>

Chew, K. S., Renna, J. M., Mcneill, D. S., Fernandez, D. C., Keenan, W. T., Thomsen, M. B., Hattar, S. (2017). A subset of ipRGCs regulates both maturation of the circadian clock and segregation of retinogeniculate projections in mice, 1–26. <https://doi.org/10.7554/eLife.22861>

Christ, E., Korf, H. W., & von Gall, C. (2012). When does it start ticking? Ontogenetic development of the mammalian circadian system. *Progress in Brain Research* (1st ed., Vol. 199). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59427-3.00006-X>

Ciarleglio, C. M., Axley, J. C., Strauss, B. R., Gamble, K. L., & McMahon, D. G. (2010). Perinatal photoperiod imprints the circadian clock. *Nature Publishing Group*, 14(1), 25–27. <https://doi.org/10.1038/nn.2699>

Davis, F. C., & Gorski, R. A. (1988). Development of hamster circadian rhythms : role of the maternal suprachiasmatic nucleus, 601–610.

Díez, A., Cambras, T., Vilaplana, J., Casamitjana, (1996) Text-guia: Cronobiología. Publicaciones Universidad de Barcelona.

Duffy, J. F., & Wright, K. P. (2005). Entrainment of the Human Circadian System by Light. *Journal of Biological Rhythms*, 20(4), 326–338. <https://doi.org/10.1177/0748730405277983>

Evans, J. A., & Davidson, A. J. (2013). Health consequences of circadian disruption in humans and animal models. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-396971-2.00010-5>

Fernandez, D. C., Chang, Y.-T., Hattar, S., & Chen, S.-K. (2016). Architecture of retinal projections to the central circadian pacemaker. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, (23), 201523629. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523629113>

Ferreira, D. S., Amaral, F. G., Mesquita, C. C., Barbosa, A. P. L., Lellis-Santos, C., Turati, A. O., Anhô, G.F. (2012). Maternal melatonin programs the daily pattern of energy metabolism in adult offspring. *PLoS ONE*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038795>

Fisiologia-divisio, D. De, & Di, A. (2000). Bright light during lactation alters the functioning of the circadian system of adult rats, (Ld), 201–208.

Fonken, L. K., Workman, J. L., Walton, J. C., Weil, Z. M., Morris, J. S., Haim, A., & Nelson, R. J. (2010). Light at night increases body mass by shifting

the time of food intake. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008734107>

Fonken, L. K., Kitsmiller, E., Smale, L., & Nelson, R. J. (2012). Dim nighttime light impairs cognition and provokes depressive-like responses in a diurnal rodent. *Journal of Biological Rhythms*.
<https://doi.org/10.1177/0748730412448324>

Fonken, L. K., & Nelson, R. J. (2014). The effects of light at night on circadian clocks and metabolism. *Endocrine Reviews*, 35(4), 648–670.
<https://doi.org/10.1210/er.2013-1051>

Foster, R. G., Provencio, I, Hudson, D., Fiske, S., De Grip W, Menaker, M. (1991). Circadian photoreception in the retinally degenerate mouse (rd/rd). *J Comp Physiol.*, 169(1):39-50.

Dustin M., Graham., Kwoon Y. Wong, 2016. Melanopsin expressing, intrinsically photosensitive retinal ganglion cells (IPRGCS)- Wang XF, Iannaccone A, Jablonski MM. Permissive glycan Report of photoreceptor outer segment assembly occurs via a non-metabolic mechanism. *Molecular Vision*. ; 9:701–709.

Golombek, D. A., & Rosenstein, R. E. (2010). Physiology of Circadian Entrainment. *Physiological Reviews*, 90(3), 1063–1102.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00009.2009>

Gooley JJ, Lu J, Chou TC, Scammell TE, Saper CB. (2001) Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract. *Nat Neurosci*. 4:1165. [PubMed: 11713469]

Gruart, A., Delgado, J.M., Escobar, C., Aguilar, R.R. (2002) Los relojes que gobiernan la vida. *La ciencia para todos*. Vol.188. Fondo de Cultura Económica. México. D.F.

Haim, A., & Zubidat, A. E. (2015). Artificial light at night: melatonin as a mediator between the environment and epigenome. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1667), 20140121–20140121. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0121>

Hannibal J, Fahrenkrug J. Melanopsin containing retinal ganglion cells are light responsive from birth. *Neuroreport*. 2004; 15:2317–2320. [PubMed: 15640747]

Harmar, A. J., Marston, H. M., Shen, S., Spratt, C., West, K. M., Sheward, W. J.

Hastings, M. H. (2002). The VPAC2 receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Cell*, 109(4), 497–508.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00736-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00736-5)

Hattar, S., Liao, H. W., Takao, M., Berson, D. M., & Yau, K. W.

(2002). Melanopsin-containing retinal ganglion cells: architecture, projections, and intrinsic photosensitivity. *Science*, 295(5557), 1065–70.
<https://doi.org/10.1126/science.1069609>

Hattar S., Lucas R.J., Mrosovsky N., Thompson S., Douglas R.H., Hankins M.W., Lem J, Biel M, Hofmann F., Foster R.G., Yau K.W.(2003). Melanopsin and rod-cone photoreceptive systems account for all major accessory visual functions in mice. *Nature*. Jul 3;424(6944):76-81. Epub Jun 15 <https://doi.org/10.1038/nature0176>

Hattar, S., Kumar, M., Park, A., Tong, P., Tung, J., Yau, K.-W., & Berson, D. M. (2006). Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. *The Journal of Comparative Neurology*, 497(3), 326–349.
<https://doi.org/10.1002/cne.20970>

Husse, J., Leliavski, A., Tsang, A. H., Oster, H., & Eichele, G. (2014). The light-dark cycle controls peripheral rhythmicity in mice with a genetically ablated suprachiasmatic nucleus clock. *FASEB Journal*, 28(11), 4950–4960.
<https://doi.org/10.1096/fj.14-256594>

Isobe, Y., & Nishino, H. (1998). AVP rhythm in the suprachiasmatic nucleus in relation to locomotor activity under constant light. *Peptides*, 19(5), 827–832. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(98\)00021-7](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(98)00021-7)

Jin X., Shearman L. P., Weaver D. R., Zylka M. J., de Vries G. J. and Reppert S. M. (1999) A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic nucleus. *Cell* 96, 57–68.

JoBorges, J.M. D. P. E. and M. O. M. T. (1990). A comparative study of photic injury in four inbred strains of albino rats, 9(8), 799–803.

Ko, C. H., & Takahashi, J. S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics*, 15(SUPPL. 2), 271–277. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddl207>

Kooijman, S., van den Berg, R., Ramkisoensing, A., Boon, M. R., Kuipers, E. N., Loeff, M., Rensen, P. C. N. (2015). Prolonged daily light exposure increases body fat mass through attenuation of brown adipose tissue activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(21), 6748–6753.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1504239112>

Krueger J, Rector DM, Roy S, Van Dongen HPA, Belenky G, Panksepp J.(2008) Sleep as a fundamental property of neuronal assemblies. *Nat. Rev. Neurosci.*

Kuhlman, S. J., Silver, R., Le Sauter, J., Bult-Ito, A., & McMahon, D. G. (2003). Phase resetting light pulses induce *Per1* and persistent spike activity in a subpopulation of biological clock neurons. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(4), 1441–50.
<https://doi.org/23/4/1441>

Laermans, J., & Depoortere, I. (2016). Chronobesity: Role of the circadian system in the obesity epidemic. *Obesity Reviews*, 17(2), 108–125. <https://doi.org/10.1111/obr.12351>

LeGates TA, Altimus CM, Wang H, Lee HK, Yang S, et al. 2012. Aberrant light directly impairs mood and learning through melanopsin-expressing neurons. *Nature* 491(7425):594–98

Li, J., Burton, K. J., Zhang, C., Hu, S., & Zhou, Q. (2009). Vasopressin receptor V1a regulates circadian rhythms of locomotor activity and expression of clock-controlled genes in the suprachiasm

Li, Jia-da, Katherine J Burton, Chengkang Zhang, Shuang-bao Hu, and Qun-yong Zhou (2008) "Vasopressin Receptor V1a Regulates Ci. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 92697, 824–830. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90463.2008>.

Lopez-Molina, L., Dubois-dauphin, M., & Schibler, U. (1997). The DBP gene is expressed according to a circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus and influences circadian behavior, 16(22), 6762–6771.

Lucas, R.J., Freedman, M.S., Muñoz, M., Garcia- Fernandez, J.M., Foster, R. G. (1999): Regulation of the mammalian pineal by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science*, 284(5413):505-7.

Mann, N. P., Haddow, R., Stokes, L., Goodley, S., & Rutter, N. (1986). Effect of night and day on preterm infants in a newborn nursery: randomised trial. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, 293(6557), 1265–7. <https://doi.org/10.1136/bmj.293.6557.1265>

Mendez, N., Abarzua-catalan, L., Vilches, N., Galdames, H. A., Spichiger, C., Richter, H. G., Torres-Farfan, C. (2012). T9imed Maternal Melatonin Treatment Reverses Circadian Disruption of the Fetal Adrenal Clock Imposed by Exposure to Constant Light. 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042713>

Mengual, R., Segovia, Y., and García, M. (2014) Características Morfológicas de la Retina del Calderón Común (*Globicephala melas*; Traill, 1809) y su relación con el Habitat. *International Journal of Morphology*. Vol. 32 no.4. 1399-1406.

Mieda, M., Ono, D., Hasegawa, E., Okamoto, H., Honma, K. ichi, Honma, S., & Sakurai, T. (2015a). Cellular clocks in AVP neurons of the scn are critical for interneuronal coupling regulating circadian behavior rhythm. *Neuron*, 85(5), 1103–1116. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.02.005>

Mirmiran, M., & Ariagno, R. L. (2000). Influence of light in the NICU on the development of circadian rhythms in preterm infants. *Seminars in Perinatology*, 24(4), 247–257. <https://doi.org/10.1053/sper.2000.8593>

Mirmiran M, Maas YG, Arigno RL. (2003). Development of fetal and neonatal sleep and circadian rhythms. *Sleep Med Rev.* 7: 321-34.

Mora, F., Sanguinetti, A.M. *Diccionario de neurociencias* (2004) Alianza editorial, Madrid

Moore, R. Y., Eichler, V. B. (1972). Loss of circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research.* 42, 201-206.

Moore, R. Y., Speh, J. C., & Leak, R. K. (2002). Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell and Tissue Research.*
<https://doi.org/10.1007/s00441-002-0575-2>

Morin, L. P., Blanchard, J. H., & Provencio, I. (2003). Retinal ganglion cell projections to the hamster suprachiasmatic nucleus, intergeniculate leaflet, and visual midbrain: Bifurcation and melanopsin immunoreactivity. *Journal of Comparative Neurology*, 465(3), 401–416. <https://doi.org/10.1002/cne.10881>

Mrosovsky, N. (1999). Masking: History, Definitions, and Measurement. *Chronobiology International*, 16(4), 415–429.
<https://doi.org/10.3109/07420529908998717>

Nagano, M., Adachi, A., Masumoto, K. hei, Meyer-Bernstein, E., & Shigeyoshi, Y. (2009). rPer1 and rPer2 induction during phases of the circadian cycle critical for light resetting of the circadian clock. *Brain Research*, 1289, 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.06.051>

Nakamura, W. (2005). Differential Response of Period 1 Expression within the Suprachiasmatic Nucleus. *Journal of Neuroscience*, 25(23), 5481–5487. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0889-05.2005>

Nováková, M., Sládek, M., & Sumová, A. (2015). Exposure of Pregnant Rats to Restricted Feeding Schedule Synchronizes the SCN Clocks of Their Fetuses under Constant Light but Not under a Light – Dark Regime, 25(5), 350–360. <https://doi.org/10.1177/0748730410377967>

Ohta, H., Yamazaki, S., & McMahon, D. G. (2005). Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nature Neuroscience*, 8(3) 267–269. <https://doi.org/10.1038/nn1395>

Ohta, H., Mitchell, A. C., & McMahon, D. G. (2006). Constant light disrupts the developing mouse biological clock. *Pediatric Research*, 60(3), 304–308. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000233114.18403.66>

Panda, S., Antoch, M. P., Miller, B. H., Su, A. I., Schook, A. B., Straume, M., Diego, S. (2002). Coordinated Transcription of Key Pathways in the Mouse by the Circadian Clock, 109, 307–320.

Panda, S., Nayak, S. K., Campo, B., Walker, J. R., Hogenesch, J. B., & Jegla, T. (2005). Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science*,

307(5709), 600–604. <https://doi.org/10.1126/science.1105121>

Preitner, N., Damiola, F., Zakany, J., Duboule, D., Albrecht, U., & Schibler, U. (2002). The Orphan Nuclear Receptor REV-ERB. Controls Circadian Transcription within the Positive Limb of the Mammalian Circadian Oscillator University of Geneva University of Geneva, 110, 251–260.

Prichard, J., Armacanqui, H., Benca, R. Behan, M., (2007). Light-dependent retinal innervation of the rat superior colliculus. *Anat. Rec. (Hoboken)* 290:341-348

Purrier, N., Engeland, W. C., & Kofuji, P. (2014). Mice deficient of glutamatergic signaling from intrinsically photosensitive retinal ganglion cells exhibit abnormal circadian photoentrainment. *PLoS ONE*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111449>.

Qidwai, Waris & Ishaque, Sidra & Shah, Sabeen & Rahim, Maheen. (2010). Adolescent Lifestyle and Behaviour: A Survey from a Developing Country. *PloS one*. 5. e12914. 10.1371/journal.pone.0012914.

Redlin, U., & Mrosovsky, N. (1999). Masking of locomotor activity in hamsters. *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 184(4), 429–437. <https://doi.org/10.1007/s003590050342>

Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 418(6901), 935–41. <https://doi.org/10.1038/nature00965>

Roenneberg Till, Wirz-Justice Anna, Mellow Martha (2003) Life between Clocks: Daily Temporal Patterns of human Chronotypes. *Journal of Biological Rhythms*. Vol 18. Issue 1. (80-90)

Rowe, S. A., & Kennaway, D. J. (2002). Melatonin in rat milk and the likelihood of its role in postnatal maternal entrainment of rhythms. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 282(3), R797–R804. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00228.2001>

Ruby, N. F., Brennan, T. J., Xie, X., & Cao, V. (2003). Role of Melanopsin in Circadian Responses to Light Role of Melanopsin in Circadian Responses to Light, (May 2014). <https://doi.org/10.1126/science.1076701>

Satchidananda Panda, Trey K. Sato, Ana Maria Castrucci, , Mark D. Rollag, Willem J. DeGrip, John B. Hogenesch, Ignacio Provencio, S. A. K. (2002). Melanopsin (Opn4) Requirement for Normal Light-Induced Circadian Phase Shifting. *Science*, 298(Dec 2002), 2213–2216. <https://doi.org/10.1126/science.1076848>

Shen, S., Spratt, C., Sheward, W. J., Kallo, I., West, K., Morrison, C. F. Harmar, A. J. (2000). Overexpression of the human VPAC 2 receptor in the

suprachiasmatic nucleus alters the circadian phenotype of mice, 97(21), 2–7.

Shibata, S., & Moore, R. Y. (1987). Development of neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*, 431(2), 311–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3040191>

Shibata, S., & Moore, R. Y. (1988). Development of a fetal circadian rhythm after disruption of the maternal circadian system Lesion SCN, 41, 313–317.

Smith, L., & Canal, M. M. (2009). Expression of circadian neuropeptides in the hypothalamus of adult mice is affected by postnatal light experience. *Journal of Neuroendocrinology*, 21(11), 946–953. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01914>.

Siegel JM 2005. Clues to the functions of mammalian sleep. *Nature* 437: 1264–1271

Sollars, P. J., Smeraski, C. A., Kaufman, J. D., Ogilvie, M. D., Provencio, I., & Pickard, G. E. (2003). Melanopsin and non-melanopsin expressing retinal ganglion cells innervate the hypothalamic suprachiasmatic nucleus. *Visual Neuroscience*, 20(6), 601–610

Stevens, R. G., & Zhu, Y. (2015). Electric light, particularly at night, disrupts human circadian rhythmicity: Is that a problem? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1667). <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0120>

Stephan, F. K., & Zucker, I. (1972). Circadian Rhythms, 69(6), 1583–1586.

Sumova, A., Sladek, M., Polidarova, L., Novakova, M., & Houdek, P. (2012). Circadian system from conception till adulthood. *Progress in Brain Research* (1st ed., Vol. 199). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59427-3.00005-8>.

Tapia-Osorio A, Salgado-Delgado R, Angeles-Castellanos M, Escobar C. 2013 Disruption of circadian rhythms due to chronic constant light leads to depressive and anxiety-like behaviors in the rat. *Behav Brain Res*. 2013;252:1–9.

Touitou, Y., Haus, E. (1994) *Biologic Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine*. Springer Verlag, Berlin.

Toki, S., Morinobu, S., Imanaka, A., Yamamoto, S., Yamawaki, S., & Honma, K. I. (2007). Importance of early lighting conditions in maternal care by dam as well as anxiety and memory later in life of offspring. *European Journal of Neuroscience*, 25(3), 815–829. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05288>.

Turek, F. W., Joshu, C., Kohsaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon,

E., Bass, J. (2005). Obesity and Metabolic Syndrome in Circadian in Mutant Mice. *Science*, 308(5724), 1043

Van den Pol, A., & Powley, T. (1979). (Accepted May 4th, 1978). *Brain Research*, 160, 307–326.

Villegas-Pérez MP, Lawrence JM, Vidal-Sanz M, Lavail MM, Lund RD. (1998) Ganglion cell loss in RCS rat retina: a result of compression of axons by contracting intraretinal vessels linked to the pigment epithelium. *J Comp Neurol.*; 392:58–77.

Wang XF, Lannaccone A, Jablonski MM 2003. Permissive glycan Rport of photoreceptor outer segment assembly occurs via a non-metabolic mechanism. *Molecular Vision*. 2003; 9:701–709.

Wassle H, Regus-Leidig H, Haverkamp S (2006) Expression of the vesicular glutamate transporter vGluT2 in a subset of cones of the mouse retina. *J Comp Neurol* 496: 544–555.

Williams, T. P., & Howell, W. L. (1983). Action spectrum of retinal light-damage in albino rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 24(3), 285–287.

Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R.I., Ueda, M. Tei H. (2000). Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*.