



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**LA DESINCRONIZACIÓN CIRCADIANA COMO
FACTOR QUE INCREMENTA EL CONSUMO DE
ALCOHOL EN UN MODELO EXPERIMENTAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MARICRUZ RESÉNDIZ FLORES



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. CAROLINA ESCOBAR BRIONES
2017**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno
Reséndiz
Flores
Maricruz
5569088958
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
309118734

2. Datos del tutor
Dra
Carolina
Escobar
Briones

3. Datos del sinodal 1
Dr
Alberto Manuel
Ángeles Castellanos
Juan Antonio

4. Datos del sinodal 2
Dra
Edith Araceli
Cabrera
Muñoz

5. Datos del sinodal 3
Dra
Fabiola
Hernández
Vázquez

6. Datos del sinodal 4
Dra
Natalí Nadia
Guerrero
Vargaz

7. Datos del trabajo escrito
La desincronización circadiana como factor que incrementa
el consumo de alcohol en un modelo experimental
85 p
2017

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta tesis a mis padres Beatriz Eugenia Flores Trejo y Ezequiel Reséndiz Arvizu, por apoyarme siempre sin importar las dificultades que se han presentado, por creer en mí y por todo su amor. No puedo decir gracias, no porque no me interese, sino porque no soy capaz de agradecerles ni la más mínima parte de todo lo que les debo. Los amo.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco principalmente a mi tutora Dra. Carolina Escobar Briones por darme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo, por su confianza y por brindarme todos los medios necesarios para llevar a cabo este trabajo, así como por su apoyo hacia mi formación académica.

Al Dr. Alberto Manuel Ángeles Castellanos por aceptar la revisión de este trabajo, por su disponibilidad, por todos los comentarios y observaciones para mejorar el escrito.

A la Dra. Edith Araceli Cabrera Muñoz por toda la ayuda brindada, por sus enseñanzas, consejos, accesibilidad y alegría; así como por las correcciones y comentarios a este trabajo; han sido de gran ayuda en mi formación académica.

A la Dra. Natalí Nadia Guerrero Vargas por todos los consejos y apoyo académico, por su disponibilidad y por los comentarios y correcciones que enriquecieron este trabajo.

A la Dra Fabiola Hernández Vázquez por acercarme al campo de la neurobiología especialmente al estudio de drogas de abuso y adicciones; por su tiempo y disponibilidad para la revisión de esta tesis, pero sobre todo porque su clase fue el primer paso para mi desarrollo académico en ésta área.

A todos los integrantes del laboratorio de Ritmos Biológicos y Metabolismo, por sus contribuciones, comentarios y críticas al trabajo. En especial agradezco a Estefa, Cinthya y Raful, por su apoyo, consejos y amistad, así como a la señora Bertha por toda la ayuda; todos sabemos que sin ella el laboratorio sería un caos.

A todas las ratas que fueron sacrificadas; sin sus vidas este trabajo no habría sido posible.

A mi hermana por estar conmigo siempre, por ser mi mejor amiga, por todas nuestras tonterías y peleas, por creer en mí, por la confianza, apoyo y amor incondicional, pero sobre todo por darme a la personita más hermosa del mundo, Luciana. A mi hermano porque siempre ha creído en mí, por cuidarme y consentirme, por su amor y confianza incondicional. No tienen idea de lo bonito que es tenerlos en mi vida.

A mis primas Vana y Frida por ser como mis hermanas pequeñas; no importa que pase siempre estaré para ustedes.

A Kendra, Rosa y Xime por estos nueve años de amistad. Ustedes son las hermanas que elegí, gracias por las locuras, por las pláticas interminables, los consejos, la felicidad y la tristeza, por los deslices y complicidad.

A Saddam por todo su apoyo, por creer en mí, por compartir tantos momentos hermosos y por ayudarme a ser una mejor persona. Gracias por todo el amor y gracias por volar conmigo, pero también por ayudarme a poner los pies en la tierra cuando hace falta.

A Ely por ser una extraordinaria compañera en la carrera, por toda su ayuda en mi formación y sobre todo por ser una gran amiga.

Les agradezco a todas las personas que han contribuido en mayor o menor medida a mi formación tanto académica como personal, por las alegrías compartidas y por su apoyo: Iván, Rene, Alma Hernández, Alma Celis, Julián, Jeesica, Diana, familia Reséndiz, familia Trejo, familia Báez López y familia Sánchez Romero.

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Ritmos Biológicos y Metabolismo de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Carolina Escobar Briones y financiada por CONACYT 239403 y PAPIIT IG200314.

“La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real.

Es un viaje, nunca una llegada”

Karl Popper

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
El sistema circadiano	2
Disrupción circadiana	5
Modelos experimentales de disrupción circadiana	5
Modelos experimentales para estudiar el consumo de alcohol	7
Sistemas neurales asociados al consumo de alcohol	8
Cambios plásticos asociados al consumo de alcohol	9
Disrupción circadiana y consumo de alcohol	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	14
OBJETIVOS	15
HIPÓTESIS	16
MÉTODOS	17
Animales y condiciones generales	17
Registro automatizado de conducta	19
Administración de alcohol	19
Prueba tipo atracón	20
Procesamiento de cerebros	21
Inmunohistoquímica para PER1, c-Fos y ΔFosB	21
Análisis de resultados	23
Análisis estadístico	23
RESULTADOS	25
Análisis conductual	25

Análisis neuronal previo al consumo de alcohol mediante Per1	28
Consumo de alcohol	37
Prueba de atracón	38
Actividad neuronal como respuesta al consumo de alcohol por medio de c-Fos	40
Acumulación de ΔfosB como respuesta al consumo de alcohol	50
DISCUSIÓN.....	60
 Previo al consumo de alcohol	60
 Consumo de alcohol	62
 Respuesta neuronal al consumo de alcohol	64
CONCLUSIONES.....	69
REFERENCIAS.....	70

RESUMEN

El estilo de vida moderno promueve que se realicen actividades por la noche, lo cual produce señales temporales conflictivas para el sistema circadiano, aumentando con ello, el riesgo de padecer diferentes enfermedades. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la desincronización o arritmicidad circadiana sobre la ingesta de alcohol, además de identificar posibles cambios a nivel de estructuras cerebrales que pudieran favorecer el consumo excesivo de alcohol.

Se utilizaron ratas macho Wistar (n = 48), alojadas individualmente en jaulas de acrílico con alimento y agua *ad libitum*. Las ratas fueron asignadas aleatoriamente a una de las siguientes condiciones: Control 12:12h Luz-oscuridad (C), luz constante (LL), o trabajo nocturno 12:12h luz -oscuridad con actividad forzada durante la fase de reposo (T).

El estudio consistió de dos fases:

En una primera fase (n=24) se evaluaron las condiciones de interrupción circadiana con un registro conductual y la determinación de la actividad día (9:00 hrs) / noche (20:00 hrs) de la proteína PER1 en áreas cerebrales (corteza infralímbica, núcleo accumbens *core* y *shell*, corteza ínsular y núcleo supraquiasmático) Los cerebros obtenidos de noche se aprovecharon para determinar niveles de c-Fos y Δ FosB en las mismas áreas sin alcohol.

Después de 3 semanas en sus condiciones correspondientes las ratas en LL mostraron arritmicidad en su actividad mientras que las del grupo C y T mantuvieron un ritmo de actividad nocturna. Por otro lado, con la evaluación de PER1 se observó que en el grupo C se presentó una diferencia día-noche en todas las áreas estudiadas. En el grupo T se perdió esta diferencia en las dos regiones del núcleo accumbens, sugiriendo desincronización circadiana interna, mientras que en el grupo de LL se perdió la diferencia día- noche en cuatro de las cinco áreas estudiadas, confirmando un proceso de arritmicidad circadiana.

En la segunda fase (n=24) los animales se mantuvieron en una de las condiciones ya descritas, por 28 días, posteriormente se les dio acceso al consumo de alcohol en una dilución del 10% en un paradigma de libre elección con agua. Se registró el consumo diario de alcohol y agua por 12 días para después privar a los animales de alcohol por 72 horas, al finalizar estas horas se corrió una prueba de atracón al alcohol para evaluar la conducta compulsiva al consumo; posterior a la cual, se extrajeron los cerebros para evaluar la respuesta de c-Fos y Δ FosB.

Las ratas del grupo C y LL mostraron una ingesta diaria de alcohol similar, mientras que el grupo T mostró un aumento en el consumo a lo largo de los 12 días. En la prueba de atracón tanto las ratas del grupo T como las del LL mostraron una mayor ingesta que las ratas del grupo C, sugiriendo una conducta compulsiva al consumo de alcohol.

En la respuesta de c-Fos se pudo observar el efecto agudo del consumo durante la prueba de atracón. El número de células positivas a c-Fos para el grupo C fue mayor tras el consumo de alcohol en la corteza infralímbica y en el núcleo supraquiasmático; mientras que para el grupo LL fue mayor en la corteza infralímbica, corteza ínsular y en el núcleo accumbens *core* y *shell*. Por otro lado, en el grupo T no se modificó la respuesta de c-Fos tras el consumo de alcohol en ninguna de las áreas.

Por otro lado, debido a la estabilidad de Δ FosB lo reportado refleja la acumulación de este marcador en las diferentes áreas estudiadas durante el protocolo completo de administración de alcohol, cuyos resultados corresponden a los datos conductuales de ingesta, indicando en conjunto un proceso de plasticidad neuronal.

Con base en los resultados obtenidos se concluye que la desincronización interna o arritmicidad circadiana potencializan diferencialmente los efectos obtenidos a partir del consumo de alcohol (ej.recompensa), facilitando con ello, un proceso de plasticidad neuronal, la cual puede contribuir al desarrollo de dependencia al mismo.

INTRODUCCIÓN

El alcohol es una de las sustancias psicoactivas más usadas a nivel mundial, al rededor del 38.3% de la población mundial mayor a los quince años lo consume regularmente, un 13.7% suspendió su consumo durante el último mes, mientras que un 48% ha sido abstemio de por vida. El abuso de alcohol es el quinto factor de riesgo de muerte prematura y discapacidad. Entre los 20-39 años de edad aproximadamente el 25% de muertes son atribuidas al consumo de alcohol; además, se asocia con el riesgo de desarrollar problemas de salud, entre ellos, diferentes tipos de cáncer y cirrosis hepática (World Health Organization, 2014; World Health Organization, 2015).

El estilo de vida moderno promueve actividades que alteran la exposición al ciclo luz-oscuridad (L-O) afectando al sistema circadiano, lo cual incrementa el riesgo de desarrollar desórdenes metabólicos, conductuales e inmunológicos (Tapia-Osorio *et al.*, 2013; Guerrero-Vargas *et al.*, 2015; Koojiman *et al.*, 2015).

Existen cada vez más estudios que muestran que las perturbaciones del sistema circadiano pueden contribuir al desarrollo de adicciones, entre ellas al consumo de alcohol, que es una de las sustancias psicoactivas de las que más se abusa a nivel mundial (Dorrian & Skinner, 2012; Logan *et al.*, 2014; McClung, 2007; Rosenwasser, 2015). Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el que alteraciones en este sistema modifican el consumo de alcohol. Es por ello que el presente estudio propone que la disrupción circadiana a nivel del reloj biológico (núcleo supraquiasmático, NSQ), y a nivel de núcleos cerebrales reguladores de la conducta emocional (corteza infralímbica, corteza insular y el núcleo accumbens en sus dos regiones (*core y shell*)) provocará modificaciones en la actividad neuronal de estas áreas, lo cual desencadenará un consumo excesivo de alcohol.

Para evaluar lo anterior se implementaron dos modelos experimentales: Uno que se asemeja a las condiciones de trabajo nocturno (T) y que produce desincronización interna (Salgado- Delgado *et al.*, 2008) y otro de arritmicidad por exposición crónica a luz constante (LL). Se evaluó la disrupción circadiana; por un lado, mediante el registro automatizado de actividad y, por otro lado, con la presencia de ritmo día-

noche en la expresión de la proteína PER1 a nivel cerebral. Se comparó el consumo de una solución a una concentración del 10% de alcohol, midiendo la cantidad de alcohol ingerida diariamente y en una prueba de atracción que permite determinar una conducta compulsiva al consumo. Se evaluó también la respuesta al consumo de alcohol a nivel de sistema nervioso con la expresión c-Fos y el desarrollo de cambios plásticos con la expresión de Δ FosB.

El sistema circadiano

El movimiento de rotación de la Tierra sobre su propio eje genera ciclos de aproximadamente 24 horas; 12 horas de luz y 12 de oscuridad. Para ajustarse a estos ciclos diarios, la mayoría de los organismos cuenta con sistemas de adaptación internos que les permiten responder a estas condiciones ambientales cíclicas, de tal manera que sus funciones se organizan formando patrones de oscilación conocidos como ritmos circadianos (Bell-Pedersen *et al.*, 2005; Panda *et al.*, 2002). Estos ritmos se presentan en diversos procesos biológicos, como en el ciclo sueño-vigilia, el ciclo celular, la temperatura corporal, la secreción hormonal y la función intestinal, entre otros.

En mamíferos, los ritmos circadianos se generan por el reloj biológico, el cual se encuentra en el NSQ del hipotálamo, éste transmite señales temporales a otros tejidos y órganos del cuerpo conocidos como osciladores periféricos (Panda *et al.*, 2002) y así, mantiene sincronizadas a las funciones fisiológicas y conductuales de tal modo, que se realicen obedeciendo a las fluctuaciones externas de luz - oscuridad; debido a ello se mantiene un orden temporal interno que permite el buen funcionamiento del organismo. En cronobiología este orden temporal se define como una correcta relación de fases, tanto entre los ritmos internos del organismo, como entre éstos y el ciclo ambiental. Una fase se refiere a un momento dado dentro de un ritmo, por ejemplo, el punto máximo de oscilación en un ritmo es denominado acrofase y se puede utilizar como punto de referencia de un ciclo. (Salgado- Delgado *et al.*, 2009).

En condiciones normales de exposición al ciclo L-O los ritmos circadianos del organismo asumen una relación de fase en concordancia con la señal de tiempo externa; además, las variables fisiológicas mantienen entre sí una relación de fase interna estable. Por consiguiente, la sincronización se define como el ajuste de fase del ritmo del reloj endógeno a las señales ambientales externas,

principalmente al ciclo de luz-oscuridad, el cual es el principal sincronizador del núcleo supraquiasmático, En cuyo caso la vía de sincronización es fótica. (Ángeles-Castellanos 2007).

Existen otras señales temporales que son capaces de sincronizar al sistema circadiano, entre las cuales se encuentran la actividad física, los horarios de sueño, de alimentación, los ciclos de temperatura y la interacción social (Figura 1) (Monk, 2010; Sharma & Chandrashekar, 2005). Las vías por las que llega la información externa al núcleo supraquiasmático son conocidas como vías de sincronización (Ángeles-Castellanos 2007).

Se ha descrito que, de acuerdo a su función y naturaleza los osciladores periféricos responden diferencialmente a diversas señales sincronizadoras y para que se considere que un individuo está sincronizado internamente y con el medio ambiente se requiere que exista concordancia entre todas estas señales (Asher & Schibler, 2011; Roberto Salgado-Delgado *et al.*, 2010).

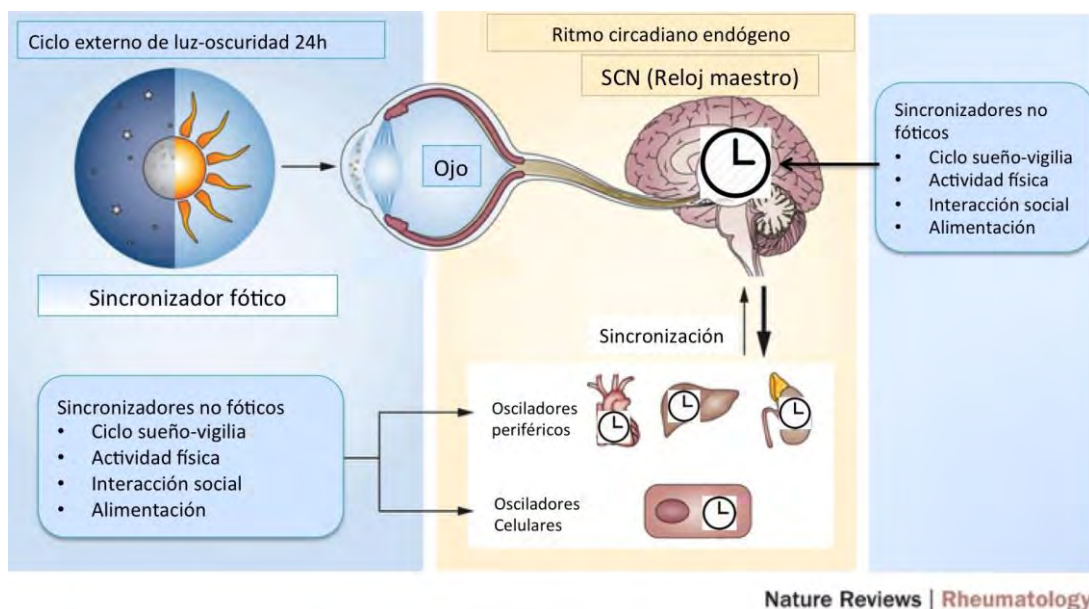


Figura 1. Sincronizadores del sistema circadiano. El núcleo supraquiasmático y los osciladores periféricos se sincronizan principalmente al ciclo L-O, pero responden a otras señales recurrentes que funcionan también como sincronizadores. (Figura modificada de Buttgerit, Smolen, Coogan, & Cajochen, 2015).

Por otro lado, el control de los ritmos circadianos a nivel celular en el NSQ se basa en una serie de asas moleculares de retroalimentación positiva y negativa que regulan la transcripción rítmica de genes reloj y sus proteínas en un curso de 24 horas.

El asa de retroalimentación comienza cuando los elementos positivos CLOCK (de sus siglas en inglés “Circadian Locomotor Output Cycles Kaput”) y BMAL1 (de sus siglas en inglés “Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1”) forman el heterodímero CLOCK: BMAL1 el cual se une a secuencias reguladoras E-box localizadas en los promotores de los genes *Per* (de sus siglas en inglés “Period”) y *Cry* (de sus siglas en inglés “Cryptochrome”). Esto activa la transcripción de los elementos que forman parte del asa negativa de retroalimentación, los genes *Per* (*Per1*, *Per2* y *Per3*) y *Cry* (*Cry1* y *Cry2*) cuyos mensajeros son traducidos a sus proteínas (PER y CRY) en el citosol a lo largo del día.

Durante el comienzo de la noche se forman heterodímeros PER:CRY que, al ser fosforilados por la enzima caseína quinasa 1 (CK1) ϵ y δ y la glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK3 β) se traslocan al núcleo, en donde se acumulan y secuestran a los heterodímeros CLOCK:BMAL1, interfiriendo con su unión a las secuencias E-box y así, inhibiendo su propia transcripción (Figura 2) (Bell-Pedersen *et al.*, 2005; Falcón & McClung, 2009; Logan *et al.*, 2014).

Es así como la maquinaria molecular del reloj regula el control rítmico de genes presentes en el cerebro y en la periferia; y de esta manera establece el ritmo circadiano a nivel celular de mamíferos.

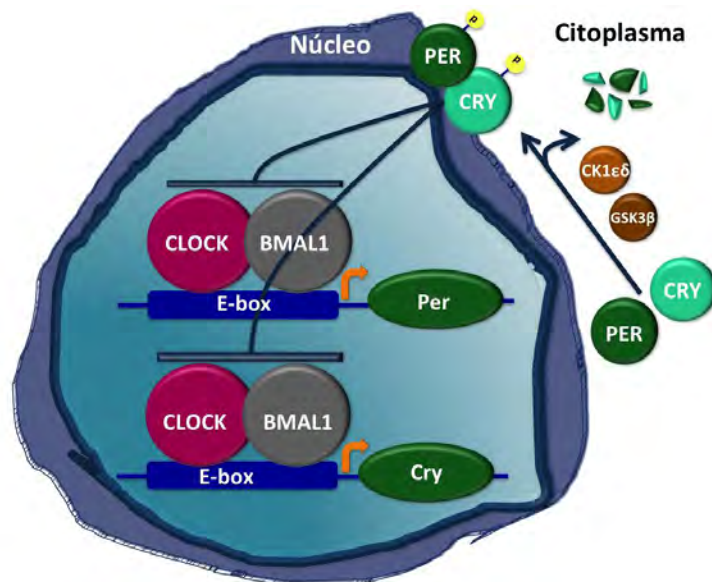


Figura 2. Reloj molecular de mamíferos.(Figura modificada de Falcón & McClung, 2009; Golombek, Bussi, & Agostino, 2014).

Disrupción circadiana

El ritmo de vida de la sociedad actual involucra actividades que modifican la organización temporal del sistema circadiano. Esto interfiere con las señales naturales que recibe el NSQ y que dicta a los osciladores periféricos en el cuerpo; sin embargo, en ausencia de señales externas normales éste núcleo mantiene la sincronía interna entre fases, manifestando los ritmos en forma endógena en corrimiento libre (*free-running*). No obstante, en condiciones en las que se prolonga esta condición de corrimiento libre puede perderse la relación de fases ocasionando una pérdida en el orden temporal provocando disrupción circadiana (Fonken & Nelson, 2014; Navara & Nelson, 2007).

Existen diferentes formas de disrupción circadiana, como son la desincronización externa e interna. En la desincronización externa, no existe una relación de fases del NSQ con el ambiente, mientras que en la desincronización interna, existe una correcta relación de fase entre el NSQ y el medio externo, pero hay una alteración en la salida de señales rítmicas de éste hacia los osciladores periféricos, lo cual ocasiona un desacoplamiento de estos con su reloj (Salgado-Delgado *et al.*, 2008; Salgado-Delgado *et al.*, 2010). Existe también la arritmicidad circadiana; en esta, se inhibe el ritmo del NSQ debido a una modificación en el ciclo ambiental (Chiesa *et al.*, 2010).

Hay diversas circunstancias que pueden ocasionar disrupción circadiana; entre ellas el acceso ilimitado a luz artificial, lo cual permite que los individuos permanezcan activos durante la noche, modificando así los horarios de actividad, alimentación e interacción social, entre otros. Asimismo, el trabajo nocturno y los viajes transmeridionales recurrentes que provocan *jet-lag*, son causa de disrupción circadiana (Navara & Nelson, 2007; Vosko *et al.*, 2010).

Modelos experimentales de disrupción circadiana

Para replicar las condiciones a las cuales se encuentran expuestos los seres humanos, y para estudiar los mecanismos que subyacen a la disrupción circadiana, se han desarrollado diversos modelos experimentales con roedores.

Luz constante. - Con este modelo se trata de emular las condiciones de contaminación lumínica y exposición a luz por la noche. Este es un fenómeno que

va en aumento y al que se exponen, por ejemplo, personas que trabajan de noche y jóvenes debido a actividades recreativas nocturnas.

Los estudios indican que mantener animales bajo condiciones de luz constante afecta la función del núcleo supraquiasmático, inhibiendo su actividad, lo cual produce arritmicidad circadiana (Ohta *et al.*, 2005; Navara & Nelson 2007; Chiesa *et al.*, 2010; Grone *et al.*; 2011).

En ratas macho se ha reportado que la exposición a luz constante durante ocho semanas provoca una pérdida del ritmo de la actividad locomotora, de los niveles de melatonina y corticosterona, entre otros (Tapia-Osorio *et al.*, 2013)

Además, hay mayor ganancia de masa corporal e intolerancia a la glucosa (Fonken *et al.*, 2010), un aumento en la predisposición a desarrollar tumores (Popovich *et al.*, 2013; Xiang *et al.*, 2015), y un incremento en el desarrollo de conductas tipo ansiedad o tipo depresivas (Fonken *et al.*, 2009; Tapia-Osorio *et al.*, 2013).

Trabajo nocturno. - Este modelo trata de replicar las condiciones en las que los trabajadores nocturnos (enfermeras, pilotos, veladores, obreros, entre otros) se ven forzados a mantenerse activos durante su fase de reposo.

Existe un modelo denominado *shift-lag*, que imita el trabajo por turnos. En este, se realizan cambios de fase en el ciclo luz-oscuridad y después los animales son reentrenados a nuevos ciclos luz-oscuridad. En este tipo de estudios se ha descrito una reducción en la supervivencia de hamsteres con cardiomiopatía. (Penev *et al.*, 1998). Además, se ha reportado que bajo estos cambios en el ciclo luz-oscuridad se promueve el desarrollo de cáncer de hígado (Filipski *et al.*, 2009) y por otro lado, se incrementa el consumo compulsivo de alcohol en ratones macho C57BL/6J (Gamsby & Gulick, 2015).

Estos estudios reportan condiciones de desincronización debida a los cambios constantes del ciclo de luz-oscuridad en trabajadores como pilotos y aeromozas; sin embargo, no imitan del todo la experiencia del trabajo nocturno ya que, para este, el ciclo luz-oscuridad es constante y lo que cambia es el patrón de actividad.

En el laboratorio de Ritmos biológicos y metabolismo de la Facultad de Medicina de la UNAM se desarrolló un modelo que imita de forma más adecuada, las

condiciones a las que se exponen los trabajadores nocturnos, ya que el ciclo luz-oscuridad se mantiene estable mientras que los animales son forzados a mantenerse activos durante la fase de reposo.

En este modelo experimental realizado para ratas macho, estas se colocan 8 horas diarias en cilindros de metal que giran lentamente (3rpm), lo cual evita que se duerman y las obliga a estar activas. En los cilindros las ratas tienen libre acceso a agua y alimento (Salgado-Delgado *et al.*, 2008). Durante los fines de semana las ratas no son expuestas a la rueda, lo cual es similar a lo que ocurre generalmente con el trabajador nocturno humano que trabaja por la noche en una semana laboral de 5 días pero al descansar los fines de semana intenta estar activo durante el día.

El hecho de utilizar horarios de trabajo que cambian entre semana y fin de semana puede potenciar las alteraciones circadianas causadas por el trabajo nocturno; ya que, además de estar activos en la fase de reposo y dormir durante la fase de actividad en los días laborales, tienen que re-sincronizarse constantemente el fin de semana.

Con el uso de este modelo se han reportado efectos similares a los observados en el trabajador nocturno, entre los que se encuentra una pérdida de la relación de fase temporal entre el núcleo supraquiasmático y los osciladores periféricos causando desincronización circadiana interna (Salgado-Delgado *et al.*, 2010) además de alteraciones en los ritmos de actividad general e ingesta de alimento, pérdida del ritmo de glucosa, un ritmo invertido de triglicéridos, mayor ganancia de peso y acumulación de grasa intraabdominal (Salgado-Delgado *et al.*, 2008; Salgado-Delgado *et al.*, 2010). Estos animales también presentan una respuesta inflamatoria exacerbada (Guerrero-Vargas *et al.*, 2015).

Modelos experimentales para estudiar el consumo de alcohol

Para estudiar los mecanismos que subyacen al consumo y dependencia de alcohol, se han desarrollado modelos que tratan de imitar las condiciones del consumo humano.

Naturalmente los roedores no consumen cantidades de alcohol necesarias para alcanzar niveles de intoxicación, por lo que se han desarrollado varios procedimientos para inducir su consumo, entre ellos se encuentran, la privación de

agua y comida para inducir polidipsia (sed extrema) (Ford, 2014), agregar sacarosa al alcohol (Broadwater *et al.*, 2012), un acceso intermitente con periodos de abstinencia (Simms *et al.*, 2008) y un escalamiento progresivo desde una dilución con poco porcentaje de alcohol hasta alcanzar el porcentaje deseado (Gamsby & Gulick, 2015).

En este estudio no se utilizó un modelo de inducción al consumo. Se utilizó una el modelo de elección libre entre dos botellas (*Two-bottle free choice paradigm*) que consiste en una prueba sencilla de preferencia entre una botella con agua y otra con una solución a una concentración al 10% de alcohol; las dos botellas están disponibles *ad libitum* y el consumo se mide cada 24 horas (Ritcher & Campbell, 1940; Crabbe *et al.*, 2011; 2011; Planeta, 2013).

Este ha sido un modelo ampliamente estudiado ya que resulta útil para evaluar el consumo de alcohol además de que el animal decide si lo consume o no, por lo cual imita la forma en que consumen los humanos.

Existen también modelos de alto consumo de alcohol como es el de tipo atracón (*Binge*) que es la forma de consumo excesivo más común.

El atracón (en humanos) se define como un patrón de consumo que eleva la concentración de alcohol en la sangre (BAC, por sus siglas en inglés) a 0.08 g/dL o más en un periodo de 2 horas. Repetidos episodios de esta forma de consumo pueden indicar el desarrollo de dependencia al alcohol (Lee *et al.*, 2015)

En estudios con modelos animales se ha descrito atracón cuando se presenta el consumo excesivo de alcohol en un periodo corto de tiempo sobre todo tras periodos de abstinencia, manteniendo el criterio de presentar BAC's de 0.08g/dL (Sabino *et al.*, 2013).

Sistemas neurales asociados al consumo de alcohol

El consumo de alcohol afecta sistemas neurobiológicos que generan respuestas hedónicas o aversivas. Entre estos sistemas se encuentra el sistema de recompensa, constituido por una red de estructuras que interactúan entre ellas generando un sistema clave en la motivación ante la búsqueda de fuentes naturales de recompensa, como la alimentación y la reproducción, pero también ante la búsqueda de drogas (Adinoff, 2004; Arias-Carrión *et al.*, 2010).

Entre las estructuras que conforman este sistema se encuentra la corteza prefrontal, que ejerce control sobre la toma de decisiones. Varias subregiones de la corteza prefrontal influyen en el consumo de drogas, entre ellas la corteza infralímbica, a la que se le ha atribuido un control inhibitorio sobre la búsqueda de alcohol. Se ha reportado que esta función se reduce al desarrollar dependencia, sobre todo tras periodos de abstinencia y recaída (Meinhardt *et al.*, 2013; Meinhardt *et al.*, 2015; Pfarr *et al.*, 2015).

Otra área dentro de este sistema es el núcleo accumbens, que se involucra con la integración de respuestas hedónicas y motivacionales a drogas como el alcohol (Perrotti *et al.*, 2008).

Este núcleo se subdivide en la región *core* y *shell*. La región *core* está asociada a respuestas anticipatorias, las cuales incluyen el componente de “deseo” de la motivación, la región *shell* genera respuestas inmediatas ante un estímulo por lo que constituye el componente de “gustar” (Di Chiara, 2002; Peciña, 2008).

En los últimos años la corteza insular ha sido involucrada en el consumo de alcohol. Esta área procesa estímulos de control ante el consumo de drogas ya que codifica señales interoceptivas que pueden promover un comportamiento aversivo, el cual se pierde progresivamente con el desarrollo de una adicción (Seif *et al.*, 2013). Se ha observado que la actividad de ésta área se reduce con el consumo de drogas afectando la toma de decisiones (Drouman *et al.*, 2015).

Los cambios progresivos que presentan estas regiones cerebrales con el consumo de alcohol sugieren que se echan a andar procesos de plasticidad neuronal que están relacionados con el desarrollo de dependencia o adicción al alcohol.

Cambios plásticos asociados al consumo de alcohol

El alcohol interactúa con numerosas estructuras neuronales, y es capaz de inducir cambios celulares, que van desde variaciones en la excitabilidad neuronal hasta la remodelación de conexiones interneuronales. El desarrollo de dependencia al alcohol es un proceso complejo, que presenta modificaciones funcionales en muchas áreas cerebrales entre las que se encuentran estructuras del sistema de recompensa y áreas del sistema corticolímbico (Hurtado *et al.*, 2014). Estas modificaciones se producen principalmente debido al efecto del alcohol sobre diferentes sistemas de neurotransmisores; entre ellos el de GABA (ácido γ -

aminobutírico) neurotransmisor inhibitorio por excelencia; el alcohol actúa como agonista de este neurotransmisor uniéndose a los receptores GABAA y de esta manera se incrementa su actividad en distintas áreas cerebrales, entre ellas en la corteza prefrontal y en núcleo accumbens (Gilpin & Koob, 2008).

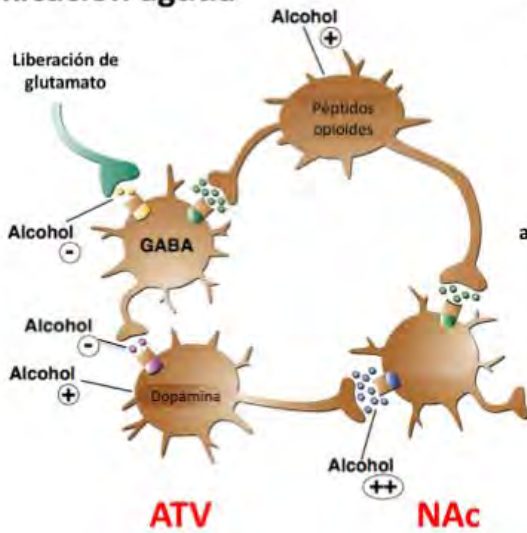
En contraste con el efecto que tiene sobre GABA, el alcohol inhibe la actividad del glutamato, neurotransmisor excitatorio por excelencia, en áreas como la corteza prefrontal, el núcleo accumbens, el ATV y la amígdala (Hoffman, 2003) entre otras.

Además de actuar sobre estos neurotransmisores, el alcohol incrementa la liberación de dopamina hacia el núcleo accumbens (Gilpin & Koob, 2008). Esto a través de la acción de péptidos opioides, moléculas producidas por el cuerpo que actúan de forma similar a la morfina y heroína, involucrándose en el proceso de reforzamiento. En el área tegmental ventral (ATV) existen neuronas dopaminérgicas, que en ausencia de estímulos de recompensa se encuentran inhibidas por la actividad de GABA; a diferencia de en otras áreas, al consumir alcohol, los péptidos opioides actúan inhibiendo la actividad GABAérgica en esta área, lo cual promueve la liberación de dopamina de esta área hacia el núcleo accumbens (Figura 3) (Clapp *et al.*, 2008).

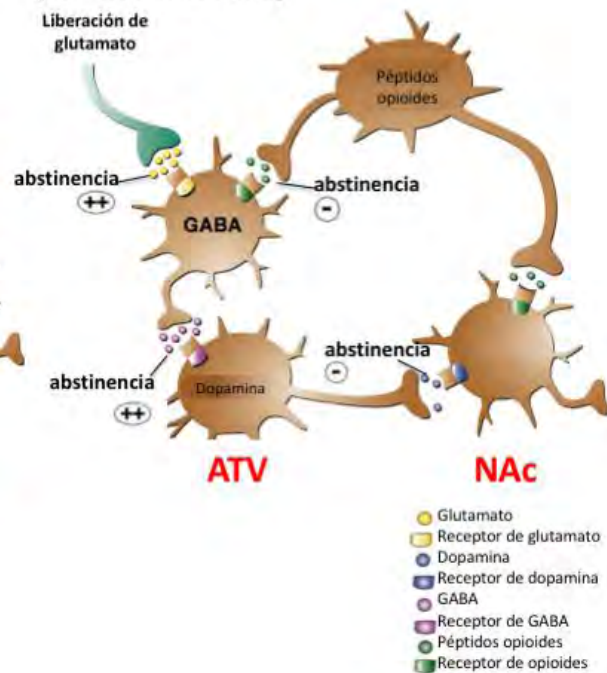
Con el consumo crónico se modifican patrones de liberación de estos neurotransmisores, por ejemplo, en el desarrollo de tolerancia, los receptores GABAA se desensibilizan a los efectos del alcohol, lo cual lleva a consumir una mayor cantidad para poder obtener los efectos iniciales.

Cuando se ha desarrollado tolerancia y el consumo de alcohol se detiene puede presentarse un “Síndrome de abstinencia” que ocurre debido a que existen diferentes áreas cerebrales sensibilizadas a una estimulación continua de GABA y cuando el alcohol (agonista) no está presente, se detiene la estimulación de los receptores GABAA y en consecuencia, se incrementa el efecto del glutamato, lo que ocasiona un estado de hiperexcitabilidad que contribuye a un consumo excesivo durante la recaída. Por otro lado, en el ATV se activa la liberación de GABA, lo que a su vez, inhibe la liberación de dopamina al núcleo accumbens; contribuyendo también al desarrollo de síndrome de abstinencia y a presentar recaídas al consumo (Figura 3.) (Bayard *et al.*, 2004; Gilpin & Koob, 2008; Clapp *et al.*, 2008).

Intoxicación aguda



Dependencia a alcohol (En abstinencia)



- Glutamato
- Receptor de glutamato
- Dopamina
- Receptor de dopamina
- GABA
- Receptor de GABA
- Péptidos opioides
- Receptor de opioides

Figura 3. Mecanismos de acción del alcohol a nivel cerebral. El alcohol tiene efectos sobre diferentes sistemas de neurotransmisores y péptidos opioides, los cuales son distintos durante una intoxicación aguda y durante un periodo de abstinencia. Modificada de Clapp *et al.*, 2008.

Desde hace tiempo se ha descrito que la regulación de la expresión génica es un componente importante de la plasticidad neuronal desarrollada a partir del consumo de alcohol y otras drogas; varios factores de transcripción se involucran en dicha regulación.

La familia de factores de transcripción fos incluye a cuatro miembros principales: c-Fos, FosB, FosL1 y FosL2. Los miembros de esta familia se heterodimerizan con miembros de la familia Jun para después formar complejos con la proteína activadora 1 (AP1), los cuales se unen a sitios AP-1 en secuencias promotoras, causando la expresión o supresión génica. Los genes que codifican para las proteínas Fos y Jun son denominados genes de expresión inmediata (IEG's), debido a que se activan rápidamente como respuesta a diversos estímulos, pero su expresión es transitoria (Ruffle, 2014).

Δ FosB (delta FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B) es una variante de alta estabilidad que se genera a partir de *splicing* alternativo del gen FosB. Es una proteína conformada por 237 aminoácidos que carece de los 101

aminoácidos presentes en la región carboxilo terminal de FosB, por lo que es una forma trunca de este factor de transcripción; sin embargo, también se heterodimeriza con miembros de la familia Jun formando complejos con AP-1. (Ruffle, 2014).

El consumo agudo de alcohol induce la expresión de factores de transcripción como c-Fos en diversas áreas cerebrales, tales como las del sistema de recompensa; sin embargo, con este tipo de administración, las proteínas regresan a niveles basales dentro de horas (Chang *et al.*, 1995; Renthal *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2016). Una respuesta distinta es observada en administraciones crónicas, en las cuales se reduce la expresión de factores como c-Fos y se observa la acumulación de Δ FosB en las mismas áreas cerebrales por semanas (Perrotti *et al.*, 2005; Perrotti *et al.*, 2008).

En exposiciones crónicas a alcohol, el gen Δ FosB es altamente inducido en el núcleo accumbens; esta inducción incrementa las respuestas de recompensa tras la administración de alcohol. Δ FosB también se ha detectado en áreas como el ATV, la amígdala, el hipocampo y en menor proporción en la corteza prefrontal, en la cual se asocia con los efectos de la droga sobre el rendimiento cognitivo. (Perrotti *et al.*, 2005; Ruffle, 2014).

La acumulación de células positivas a Δ FosB debida al consumo repetido de drogas se asocia al desarrollo de plasticidad neuronal por formación de espinas dendríticas (Lee *et al.*, 2006; Grueter *et al.*, 2013). Esta acumulación parece tener relación con un incremento de las respuestas motivacionales ante la exposición repetida de drogas como el alcohol lo cual puede ser un factor que incremente el consumo (Ozburn *et al.*, 2012).

Disrupción circadiana y consumo de alcohol

Las perturbaciones del sistema circadiano se consideran factores de riesgo para el desarrollo de trastornos adictivos al tabaco, a las drogas y al alcohol (McClung, 2007; Logan *et al.*, 2014). La literatura relaciona a las perturbaciones en los ritmos circadianos, a nivel genético o ambiental, con el consumo de alcohol (Gamsby *et al.*, 2013; Hammer *et al.*, 2010; Rosenwasser, 2015).

Spanagel *et al.*, 2005 reportaron que ratones macho mutantes para el gen reloj Per2 incrementaron el consumo de alcohol a diferentes concentraciones en un paradigma de libre elección con agua, esto respecto a ratones silvestres.

Del mismo modo, Gamsby *et al.*, 2013 observaron que ratones machos y hembras mutantes para Per1 o Per2 o para ambos genes, que expresan proteínas que carecen de un dominio clave para la función circadiana normal, incrementan el consumo de alcohol a diferentes concentraciones en un paradigma de libre elección con agua comparados con ratones silvestres.

A través de la manipulación del ciclo luz-oscuridad se ha descrito que en ratas de la cepa (HAD1) que presenta alto consumo de alcohol, adelantos de fase repetidos de 6 horas cada 3-4 semanas incrementa ligeramente el consumo de alcohol en hembras bajo un paradigma de libre elección con agua (Clark *et al.*, 2007).

Además, en ratones C57BL/6J con un periodo alternado que iba de 12 horas luz 12 oscuridad (12:12) a 18 horas luz y 6 horas oscuridad (18:6) cada tres días por tres semanas, se observó el desarrollo de un consumo compulsivo de alcohol al 8% (J (Gamsby & Gulick, 2015).

Por otro lado, se ha reportado que la exposición a luz constante no modifica el consumo de alcohol en tratamientos crónicos; por ejemplo, en ratas expuestas a luz constante, el consumo de alcohol al 10% no se modificó durante los primeros diez días de tratamiento; sin embargo, durante los siguientes diez días se observó una disminución en el consumo en comparación con un grupo control (Goodwin *et al.*, 1999). En hámsteres expuestos a luz constante, tampoco se observaron cambios en el consumo de alcohol al 20% bajo un paradigma de libre elección con agua (Hammer *et al.*, 2010).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Existe discordancia entre diversos estudios respecto al efecto de las alteraciones en el sistema circadiano y el consumo de alcohol. Los efectos parecen depender del sexo, de la especie, de la cepa y de la manera en que se ofrece el alcohol, entre otros. En estos estudios se ha evaluado la ingesta durante administraciones repetidas de alcohol; sin embargo, en ellos no se estudia lo ocurrido tras un periodo de abstinencia al mismo. Además, hace falta comprender cómo la disrupción circadiana podría modificar a los sistemas cerebrales que modulan la ingesta de alcohol para alterar el consumo.

El presente estudio propone que la disrupción circadiana afecta a los núcleos cerebrales reguladores de la conducta emocional (la corteza infralímbica, la corteza insular y el núcleo accumbens en sus dos regiones *core* y *shell*). La pérdida de coordinación circadiana en estas áreas podría ser la causa de que se desencadene un consumo exacerbado de alcohol.

Para evaluar lo anterior se implementaron dos modelos experimentales: Uno que se asemeja a las condiciones de trabajo nocturno (T) y que produce desincronización interna (Salgado- Delgado *et al.*, 2008) y otro de arritmicidad por exposición crónica a luz constante (LL). Se evaluó la disrupción circadiana; por un lado, mediante el registro automatizado de actividad y, por otro lado, con la presencia de ritmo día-noche en la expresión de la proteína PER1 a nivel cerebral. En una segunda fase se comparó el consumo de una solución a una concentración del 10% de alcohol en un paradigma de libre elección con agua, se midió la cantidad ingerida de cada uno diariamente y en una prueba de atracón que permite determinar una conducta compulsiva al consumo. Se evaluó también la respuesta al consumo de alcohol a nivel cerebral (corteza infralímbica, corteza insular, núcleo accumbens *core* y *shell* y núcleo supraquiasmático) con la expresión c-Fos y el desarrollo de cambios plásticos con la expresión de Δ FosB.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar el efecto que tiene la desincronización o arritmicidad circadiana en la rata sobre el consumo de alcohol.

Objetivos específicos

- Evaluar el establecimiento de desincronización o arritmicidad circadiana a nivel conductual.
- Evaluar el ritmo día-noche de Per1 en áreas del sistema de recompensa, C. insular y NSQ de ratas con desincronización o arritmicidad circadiana y sus controles.
- Evaluar la conducta compulsiva al consumo de alcohol en ratas con desincronización o arritmicidad circadiana y sus controles mediante una prueba de atracón.
- Evaluar el consumo de alcohol en ratas con desincronización o arritmicidad circadiana y sus con controles
- Evaluar los niveles basales de c-Fos y Δ FosB y su respuesta al consumo de alcohol en áreas del sistema de recompensa, C. insular y NSQ en ratas desincronizadas o arrítmicas y sus controles.

HIPÓTESIS

Hipótesis general

- Las ratas con desincronización o arritmicidad circadiana consumirán más alcohol que un grupo control sincronizado al ciclo luz-oscuridad.

Hipótesis específicas

- Las ratas desincronizadas o arrítmicas perderán un patrón definido de actividad nocturna.
- Las ratas con desincronizadas o arrítmicas perderán la diferencia día-noche de Per1 en áreas del sistema de recompensa, C. insular y NSQ mientras que sus controles lo mantendrán.
- Las ratas desincronizadas o arrítmicas consumirán más alcohol que el grupo control.
- Las ratas desincronizadas o arrítmicas desarrollaran una conducta compulsiva consumiendo una cantidad mayor de alcohol que el control durante una prueba de atracón.
- El consumo de alcohol se asociará a cambios en el número de células positivas a c-Fos y Δ FosB en el sistema de recompensa, C. insular y NSQ en ratas desincronizadas o arrítmicas y sus controles.

MÉTODOS

Animales y condiciones generales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (n=48) con un peso inicial entre 230-250g (dos y medio meses de edad) provenientes del bioterio central de la facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Se mantuvieron en cajas de acrílico individuales (45 x 30 x 20 cm) con agua y alimento *ad libitum*. Para el monitoreo automatizado de conducta los animales se alojaron en cuartos de registro, en los cuales se mantuvieron condiciones de iluminación reguladas, estos cuartos cuentan con intercambio de aire filtrado constante y una temperatura de 21 +/- 1° C.

Se ajustó el ciclo luz-oscuridad de acuerdo a su condición experimental. El manejo de los animales se realizó de acuerdo a lo establecido por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UNAM (063/2016).

El estudio consistió de 2 fases:

Diseño experimental fase 1

En una primera fase se evaluaron las condiciones de interrupción circadiana con un registro conductual y la determinación del ritmo día (9hrs) / noche (20 hrs) para la proteína PER1 mediante una prueba de inmunohistoquímica. Los cerebros obtenidos de noche se aprovecharon para determinar las células positivas a c-Fos y Δ FosB sin alcohol.

Los animales (n=24) se asignaron aleatoriamente a una de las siguientes condiciones:

- Control (C). - (n=8) Consistió en mantener a las ratas en un ciclo de luz-oscuridad 12:12 (Luz encendida a las 7:00h) durante 26 días
- Modelo de Trabajo nocturno (T). -(n=8). Las ratas asignadas a la condición de trabajo nocturno se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad 12:12 (Luz encendida a las 7:00h) por 26 días; además fueron colocadas 8 horas de lunes a viernes durante la fase de luz (de 9:00h a 17:00h) en cilindros rotatorios que giran a una velocidad de 1 revolución en 3 min.

- Luz constante (LL). - (n=8). Consistió en mantener a las ratas con la luz prendida (361 luxes) durante 26 días.

Después de 26 días de exposición a cada una de estas condiciones se determinó bajo condiciones basales sin alcohol, la expresión de Per1, c-Fos y Δ FosB (Figura 4).

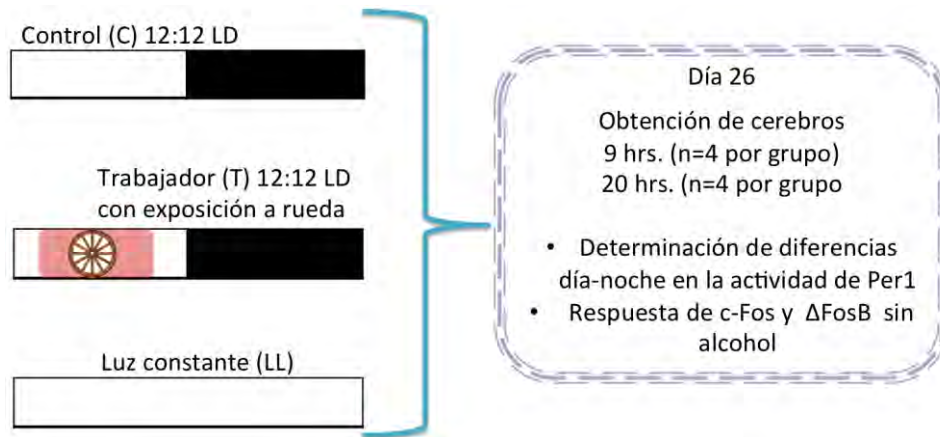


Figura 4. Diseño experimental de la fase 1.

Diseño experimental 2

En la segunda fase del estudio los animales se mantuvieron en una de las condiciones descritas en el diseño experimental de la fase 1 por 28 días posteriormente se les dio acceso al consumo de alcohol al 10% en un paradigma de libre elección con agua. Se registró el consumo diario de alcohol y agua por 12 días para después privar a los animales de alcohol por 72 horas, al finalizar estas horas se corrió una prueba de atracción al alcohol, posterior a la cual, se extrajeron los cerebros para evaluar la respuesta de c-Fos y Δ FosB mediante una prueba de inmunohistoquímica (Figura 5).



Figura 5. Diseño experimental de la fase 2.

Registro automatizado de conducta

El monitoreo automatizado de la conducta permitió determinar el proceso de sincronización/desincronización o arritmicidad de los ritmos de actividad. Las ratas se alojaron individualmente en cajas de acrílico transparente como se describió previamente. Estas cajas se colocaron en armarios sonoamortiguados que cuentan con un sistema de control del ciclo luz-oscuridad y un sistema de ventilación y circulación de aire. Los armarios tienen espacio para ocho cajas y bajo cada una de ellas hay una placa de metal con sensores de movimiento. Los movimientos de las ratas fueron transformados a pulsos analógicos, los cuales se colectaron por un sistema computarizado Spad9 (OMNIALVA) y se almacenaron en unidades de 1-5 minutos para un análisis posterior.

Los datos conductuales se representaron como actogramas y perfiles de actividad obtenidos a partir del promedio de actividad diario, se analizaron con el programa Spad9 diseñado para el laboratorio de Ritmos biológicos y metabolismo de la Facultad de Medicina, UNAM. Estas pruebas permitieron determinar la organización temporal de los animales bajo las distintas condiciones.

Administración de alcohol

Se utilizó un paradigma de libre elección entre agua y alcohol en una dilución al 10%. Para introducir la bebida de alcohol, y para que todos los sujetos lo probaran y así evitar neofobia durante el protocolo de consumo, las ratas fueron privadas de

agua por una noche y únicamente se les dio acceso a una botella con alcohol. Posteriormente, el acceso a alcohol fue de lunes a viernes de las 17:00 h y hasta las 9:00 h del día siguiente (16 horas diarias de exposición a alcohol) y *ad libitum* en fin de semana. Este esquema se siguió por 12 días para los tres grupos, tomando un registro diario de la cantidad consumida. Este horario se ajustó con base en el grupo T, modelo de trabajador nocturno, que requiere permanecer de 9:00 a 17:00 h en los cilindros rotatorios de lunes a viernes. Las botellas de agua y alcohol se intercambiaron de posición diariamente para evitar preferencia de lugar en las ratas.

El consumo de alcohol se reportó en g/kg de peso. Para la conversión de mL a g/kg se utilizaron los siguientes parámetros:

- Cantidad de alcohol ingerida por animal
- Porcentaje de alcohol en la dilución= 10%
- Densidad del alcohol a 19°C= 0.79029g/mL
- Peso por animal

Primero se multiplicó la cantidad de dilución ingerida por el porcentaje de alcohol en la misma.

$$(\text{mL de solución}) (0.1) = \text{mL de alcohol ingeridos}$$

Posteriormente se obtuvo la cantidad de alcohol en gramos equivalente a los mililitros de alcohol ingeridos, a partir de la fórmula de densidad.

$$\rho \text{ (g/mL)} = m/v \quad \text{Se despejó la masa } m(g) = \rho * v$$

$$(\text{densidad del alcohol g/mL}) (\text{volumen de alcohol ingerido mL}) = \text{gramos de alcohol ingerido}$$

Finalmente, con una regla de tres se obtuvo la equivalencia en gramos por kilogramo a partir del peso del animal y de los gramos de alcohol ingerido

$$\begin{array}{rcl} \text{gramos de alcohol ingerido} & - & \text{peso en kg del animal} \\ \boxed{\text{g/kg ingeridos}} & - & 1 \text{ kg} \end{array}$$

Prueba tipo atracón

Después de los 12 días de exposición al alcohol, siguió un periodo de 72 horas de privación al mismo, al término de este periodo se dio libre acceso a una cantidad

de 20 mL de alcohol al 10% y a 50 mL de agua durante una hora (17:00-18:00) y posteriormente se registró la cantidad de alcohol y agua ingeridos.

Procesamiento de cerebros

Después de 26 días en las condiciones circadianas asignadas se sacrificó a los animales en dos puntos temporales 9 h y 20 h. Por otro lado, posterior a la prueba de atracción se sacrificó a los animales 1:30 horas después del acceso al alcohol. Se les inyectó a los animales una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico (1mL) y luego se perfundieron a través de una punción cardiaca en el ventrículo izquierdo hacia la aorta dejando fluir durante 8 minutos 250 mL de solución salina isotónica al 0.9% para lavar el tejido, seguida de 250 mL de paraformaldehído al 4% en buffer fosfatos 0.1 nM y pH 7.2 (PB) para fijar el tejido. Se les extrajo el cerebro colocándolo en paraformaldehído para postfijarlo por 24 h seguido de crioprotección con sacarosa al 30% diluida en una solución de PB.

Se realizaron cortes coronales (40 μ m) en un criostato a -19°C los cuales se recolectaron en cuatro series y se colocaron en PB con NaCl al 0.9% (PBS), se mantuvieron en sacarosa al 30% diluida en una solución de PB hasta su procesamiento.

Inmunohistoquímica para PER1, c-Fos y Δ FosB

PER1

Se tomó una primer serie de los cortes de cada cerebro y se incubó con el anticuerpo primario anti PER1 hecho en cabra (Santa Cruz Biotechnology) a 4°C durante 72 horas a una dilución 1:500 en PBS con gelatina natural al 2.5% y tritón X-100 al 1% (PBSGT), posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario Biotinilado anti-cabra hecho en caballo (Vector Laboratories Inc.) a temperatura ambiente a una dilución de 5:1000 en PBSGT durante 90 minutos, finalmente se realizó una tercera incubación en el complejo AB (avidina-biotina, Vector Laboratories Inc.) a temperatura ambiente a una dilución de 9:1000 en PBSGT durante 90 minutos. Al finalizar la tercera incubación, se activó la reacción de oxidación con diaminobenzidina diluida en trizma pH 7.2 (1.54g por cada 100mL) y peróxido de hidrógeno (25 μ L de H₂O₂ al 30% por cada 50mL). Antes y después de cada una de las incubaciones, así como al finalizar el revelado con diaminobenzidina se realizaron tres lavados de diez minutos con PBS.

c-Fos

Se tomó otra serie de los cortes de cada cerebro y se incubó con el anticuerpo primario anti c-Fos hecho en conejo (Santa Cruz Biotechnology) a 4°C durante 72 horas a una dilución 1:1000 en PBSGT, posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario Biotinilado anticonejo hecho en cabra (Vector Laboratories Inc.) a temperatura ambiente a una dilución 5:1000 en PBSGT durante 90 minutos, finalmente se realizó una tercera incubación en complejo AB (avidina-biotina Vector Laboratories Inc.) a temperatura ambiente a una dilución 9:1000 en PBSGT durante 90 minutos. Al finalizar la tercera incubación, se activó la reacción de oxidación con diaminobenzidina diluida en trizma 7.2pH (1.54g por cada 100mL) y peróxido de hidrógeno (25 µL de H₂O₂ al 30% por cada 50mL). Antes y después de cada una de las incubaciones, así como al finalizar el revelado con diaminobenzidina se realizaron tres lavados de diez minutos con PBS.

ΔFosB

Se tomó una tercer serie de los cortes de cada cerebro y se incubó con el anticuerpo primario ΔFosB hecho en conejo (Santa Cruz Biotechnology) a 4°C durante 72 horas a una dilución 1:1500 en PBSGT, posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario Biotinilado anticonejo hecho en cabra (Vector Laboratories Inc.) a temperatura ambiente a una dilución de 5:1000 en PBSGT durante 90 minutos, finalmente se realizó una tercera incubación en complejo AB (avidina-biotina Vector Laboratories Inc.) a temperatura ambiente a una dilución de 9:1000 en PBSGT durante 90 minutos. Al finalizar la tercera incubación, se activó la reacción de oxidación con diaminobenzidina diluida en trizma 7.2pH (1.54g por cada 100mL) y peróxido de hidrógeno (25 µL de H₂O₂ al 30% por cada 50mL). Antes y después de cada una de las incubaciones, así como al finalizar el revelado con diaminobenzidina se realizaron tres lavados de diez minutos con PBS.

Los cortes se montaron en portaobjetos gelatinizados, una vez secos se deshidrataron gradualmente en un tren de histología con alcohol a diferentes concentraciones, 70, 80 90 y 100% y se aclararon con xilol, posteriormente se cubrieron con cubreobjetos y resina Entellan (Merck).

Análisis de resultados

Para la cuantificación de las células inmunopositivas a PER1, c-Fos y Δ FosB se seleccionaron cortes de acuerdo al atlas esterotáxico para rata de Paxinos y Watson (sexta edición compacta 2009) para la corteza infralímbica (3.24, 3.00 y 2.76 mm anterior a bregma), ínsula (1.56, 1.44, 1.28, 1.20 y 1.24 mm anterior a bregma), núcleo accumbens (1.56, 1.44, 1.28, 1.20 y 1.24 mm anterior a bregma) y núcleo supraquiasmático (-0.60, -0.72, -0.84 y -0.96 posterior a bregma). Se obtuvieron imágenes de estas áreas utilizando un microscopio óptico (Leica ICC50 HD), el cual cuenta con una cámara (Evolution LC color) conectada a una computadora, las imágenes se obtuvieron a un aumento de 10x (corteza infralímbica, núcleo Accumbens e ínsula) y 20x (núcleo supraquiasmático) y se digitalizaron con el sistema Image-Pro Plus 5.1.

El conteo de las células inmunopositivas para PER1, c-Fos y Δ FosB se realizó con el programa computarizado de análisis de imágenes imageJ Launcher (NIH).

Análisis estadístico

El análisis de las células inmunopositivas a PER1 se realizó con una “t” de Student pareada en la que se comparó el día contra la noche para cada grupo.

Para evaluar el consumo de alcohol se comparó el consumo por día entre grupos, mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para medidas repetidas, en el que los factores a comparar fueron los grupos (C, T y LL) y los días de exposición a alcohol, además de un análisis de comparaciones múltiples (prueba *post hoc*) mediante la prueba de Tukey.

El consumo promedio de alcohol y de agua por grupo se comparó mediante un ANOVA de una vía, en el que se compararon los grupos (C, T y LL), y un análisis de comparaciones múltiples (prueba *post hoc*) mediante la prueba de Tukey.

Para el consumo durante la prueba de atracción se utilizó un ANOVA de una vía en el cual se compararon los grupos (C, T y LL) contra el consumo de alcohol además de un análisis de comparaciones múltiples (prueba *post hoc*) mediante la prueba de Tukey.

Tanto el análisis de células inmunopositivas para c-Fos como para Δ Fos se realizó mediante un ANOVA de dos vías en el que se hizo una comparación entre grupos

(C, T y LL) e intra grupos antes vs. después del consumo de alcohol; además, se realizó un análisis de comparaciones múltiples (prueba *post hoc*) mediante la prueba de Tukey.

RESULTADOS

Análisis conductual

Después de tres semanas de exposición a las condiciones experimentales de los grupos control, trabajo nocturno o luz constante, los registros de actividad se evaluaron para observar el establecimiento de disrupción circadiana a nivel conductual.

El grupo control mostró un ritmo diario de actividad sincronizada al ciclo luz-oscuridad presentando mayor actividad durante la noche. En el lapso de 12 días de administración de alcohol, el patrón de actividad nocturna no se modificó (Figura 6).

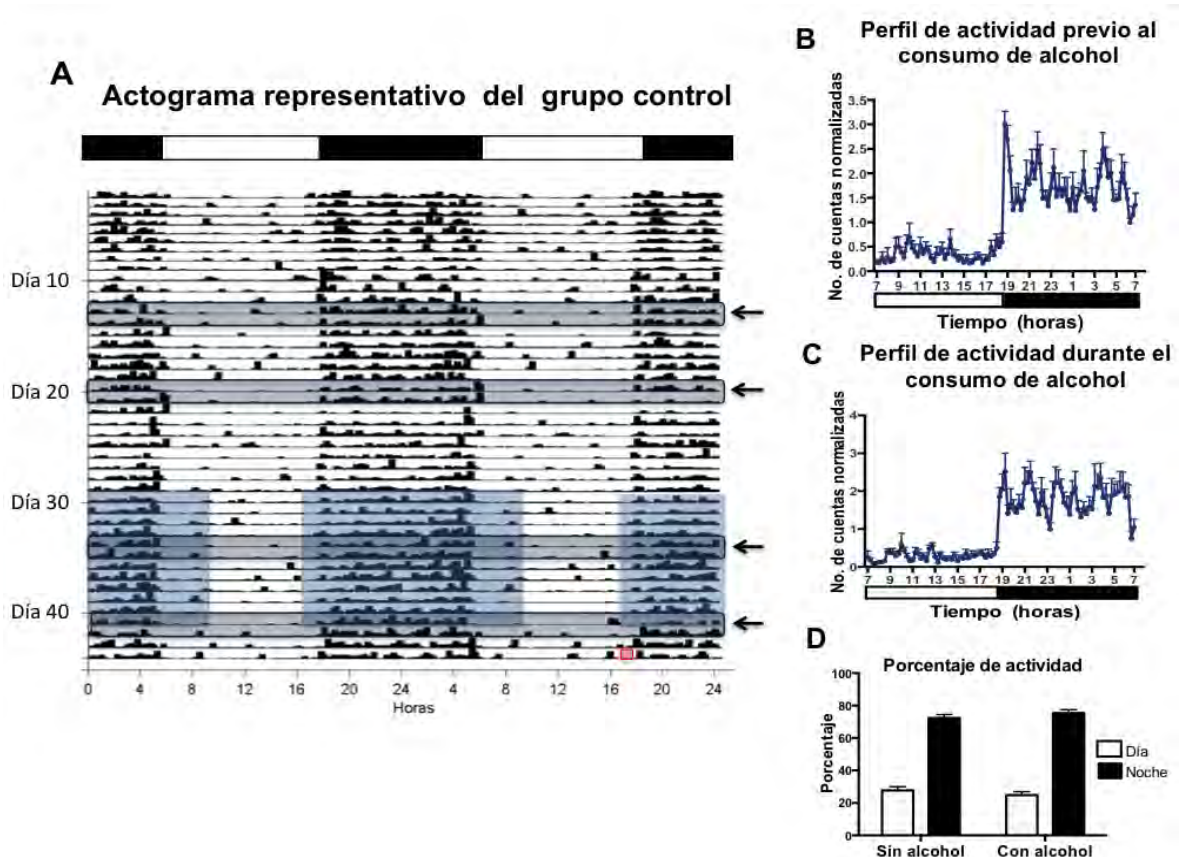


Figura 6. Actividad del grupo control. (A) Actograma en duplicado representativo de la actividad del grupo control. (B) Promedio de actividad diaria sin alcohol a lo largo de dos fines de semana previos al consumo de alcohol, señalados en el actograma con los rectángulos superiores azules (n=8). (C) Promedio de actividad diaria a lo largo de dos fines de semana durante el consumo de alcohol, señalados en el actograma con los dos rectángulos inferiores azules (n=8). (D) Porcentaje de actividad antes y durante el consumo de alcohol.

Se observa un patrón de actividad nocturna definido el cual no se ve alterado con la exposición a alcohol. Los cuadros azules en el actograma indican los días de exposición a alcohol. El cuadro rojo indica el acceso a alcohol durante la prueba de atracón (1 hora).

En las ratas bajo el protocolo de trabajo (T) prevaleció un patrón definido de actividad nocturna. No se observaron cambios en el patrón de actividad durante el periodo de administración de alcohol y en los fines de semana continuó observándose el mismo patrón de actividad nocturno (Figura 7).

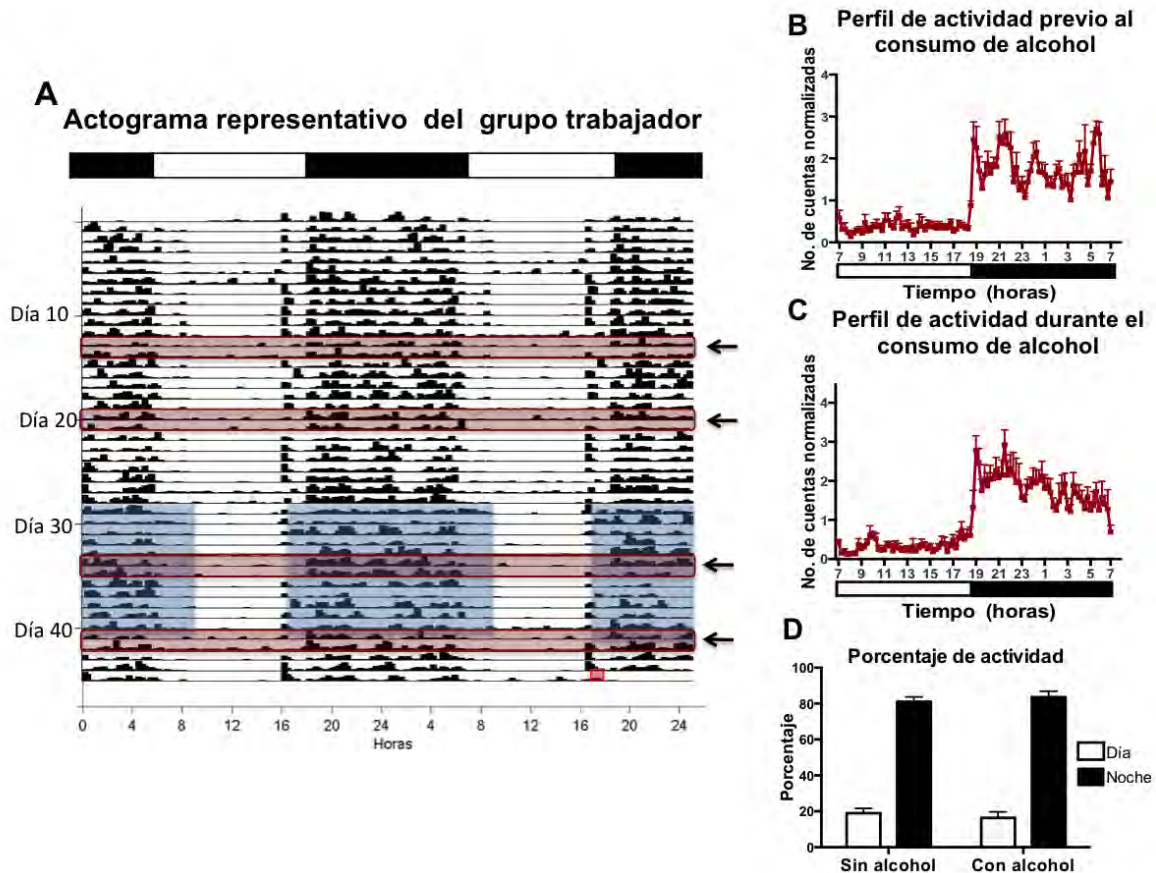


Figura 7. Actividad del grupo trabajador. (A) Actograma en duplicado representativo de la actividad del grupo trabajador (B) Promedio de actividad diaria sin alcohol a lo largo de dos fines de semana previos al consumo de alcohol, señalados en el actograma con los dos rectángulos superiores rojos (n=8). (C) promedio de actividad diaria a lo largo de dos fines de semana durante el consumo de alcohol, señalados en el actograma con los dos rectángulos inferiores rojos (n=8). (D) Porcentaje de actividad antes y durante el consumo de alcohol. Se observa un patrón de actividad nocturna definido, que corresponde con la exposición a la rueda, el cual no se alteró con el consumo de alcohol. Los cuadros azules en el actograma indican los días de exposición a alcohol. El cuadro rojo indica el acceso a alcohol durante la prueba de atracción (1 hora).

Para las ratas expuestas a luz constante se presentó inicialmente corrimiento libre, seguido por arritmicidad aproximadamente en la tercera semana, como puede observarse en el actograma. En el perfil de actividad se muestra una pérdida del ritmo circadiano de actividad observándose valores similares entre el día y la noche; sin embargo, se presentan picos de actividad alrededor de cada 3-4 horas. Esto continuó en el periodo de administración de alcohol. (Figura 8).

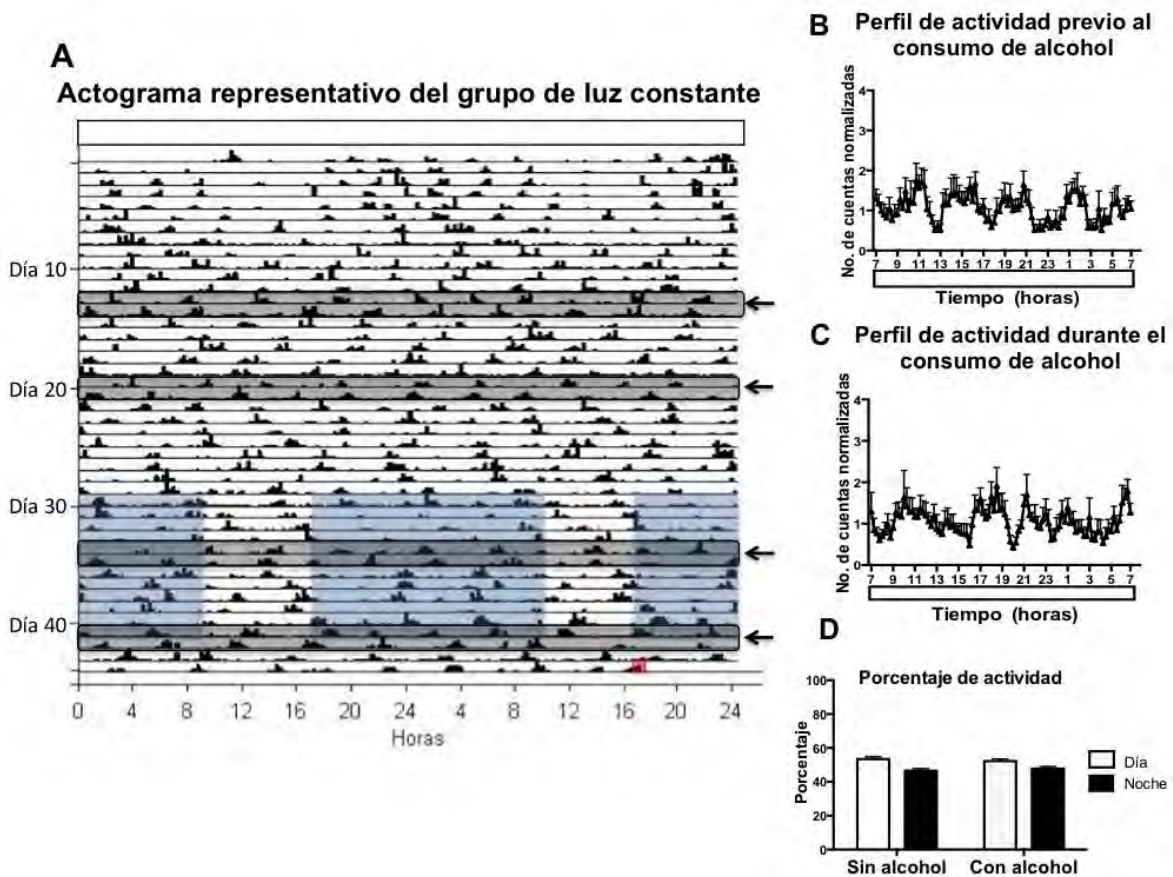


Figura 8. Actividad del grupo de luz constante. (A) Actograma en duplicado representativo de la actividad del grupo de luz constante. (B) Promedio de actividad diaria sin alcohol a lo largo de dos fines de semana previos al consumo de alcohol, señalados en el actograma con los dos rectángulos superiores negros (n=8). (C) promedio de actividad diaria a lo largo de dos fines de semana durante el consumo de alcohol, señalados en el actograma con los dos rectángulos inferiores negros (n=8). (D) Porcentaje de actividad antes y durante el consumo de alcohol. Se observa corrimiento libre seguido por arritmicidad, la cual persiste con el consumo de alcohol.

Los cuadros azules en el actograma indican los días de exposición a alcohol.

El cuadro rojo el acceso a alcohol durante la prueba de atracón (1 hora).

Análisis neuronal previo al consumo de alcohol mediante Per1

Previo al consumo de alcohol y para corroborar el establecimiento de un proceso de disrupción circadiana se evaluó el número de células inmunopositivas para PER1 en cinco áreas cerebrales: La corteza infralímbica, la corteza insular, el núcleo accumbens *core* y *shell* y el núcleo supraquiasmático, en dos puntos temporales, a las 9:00 h (n=4 por grupo) y a las 20:00 h (n=4 por grupo).

Los animales control (C) presentaron un ritmo día-noche de PER1 en todas las áreas, observándose un mayor número de células inmunopositivas durante la noche, a excepción de la corteza insular en donde se observó una tendencia similar, pero no fue estadísticamente significativa (Figuras 9-16). Una prueba “t” de Student indicó diferencias significativas para este grupo entre el día y la noche en la corteza infralímbica (*p=0.0002), núcleo accumbens *core* (*p=0.046) y *shell* (*p=0.016), y en el núcleo supraquiasmático (*p=0.002).

El grupo expuesto a trabajo forzado (T) mantuvo el ritmo día-noche de PER1 en la corteza infralímbica y corteza insular. La prueba “t” de Student indicó diferencias significativas para el grupo T entre el día y la noche en la corteza infralímbica (*p=0.013) y en la corteza insular (*p=0.023) (Figura 9-11)

Por otro lado, los animales del grupo LL perdieron el ritmo normal en estas dos áreas (Figuras 9, 10 y 11). En este caso La “t” de Student no indicó diferencias entre el día y la noche, ni en la corteza infralímbica (p= 0.47) ni en la corteza insular (p=0.057) (Figura 9-11).

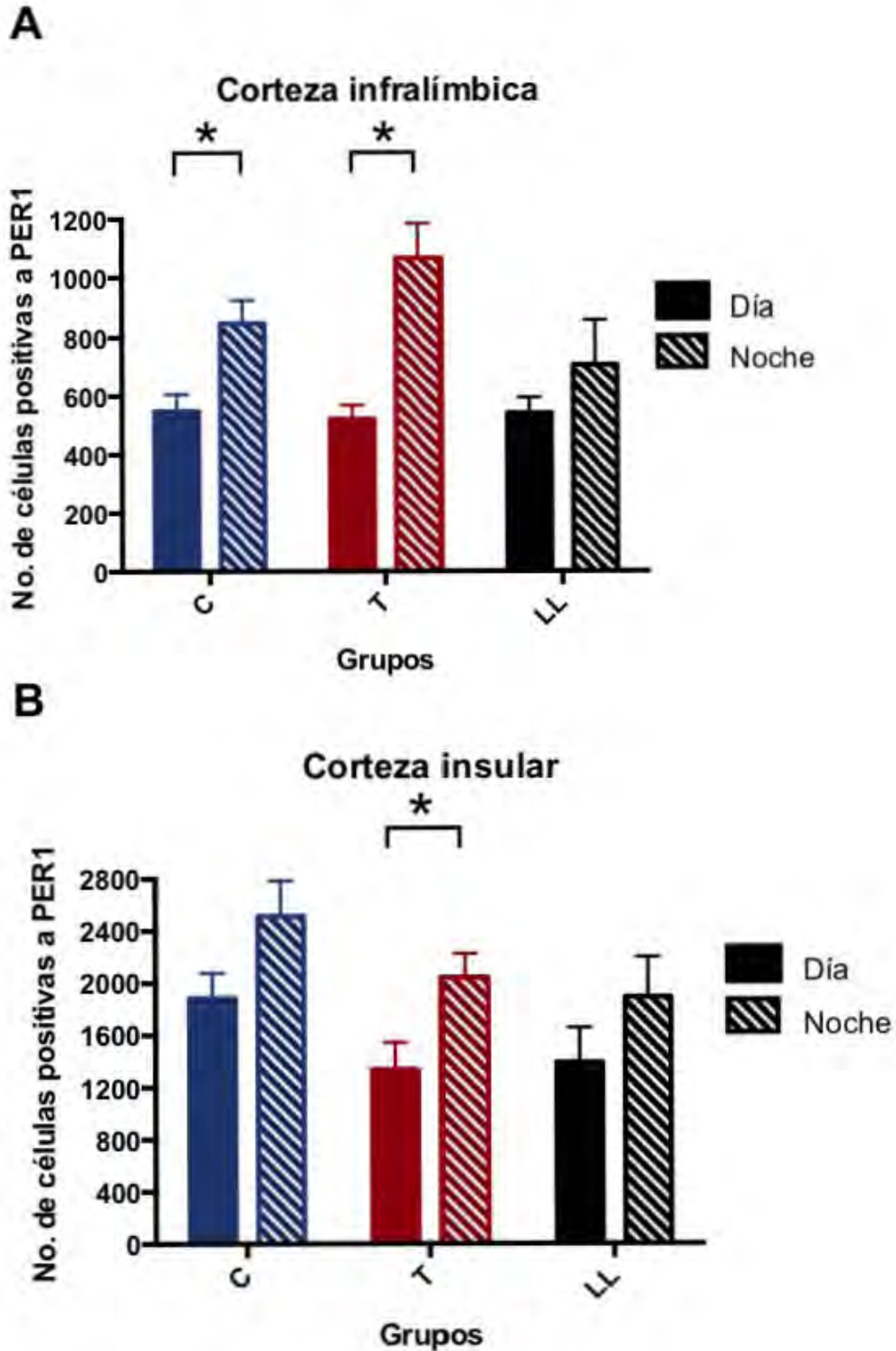


Figura 9. Número de células positivas a PER1 en A) Corteza infralímbica. Se encontraron diferencias significativas día vs noche en el grupo C ($p=0.0002$) y en el grupo T ($p=0.013$); el de LL no presentó ritmo. B) Corteza insular. Se encontraron diferencias significativas entre día y noche en el grupo T ($p=0.023$). Prueba “t” de Student; (n=4 por grupo).

Corteza infralímbica

Día

Noche

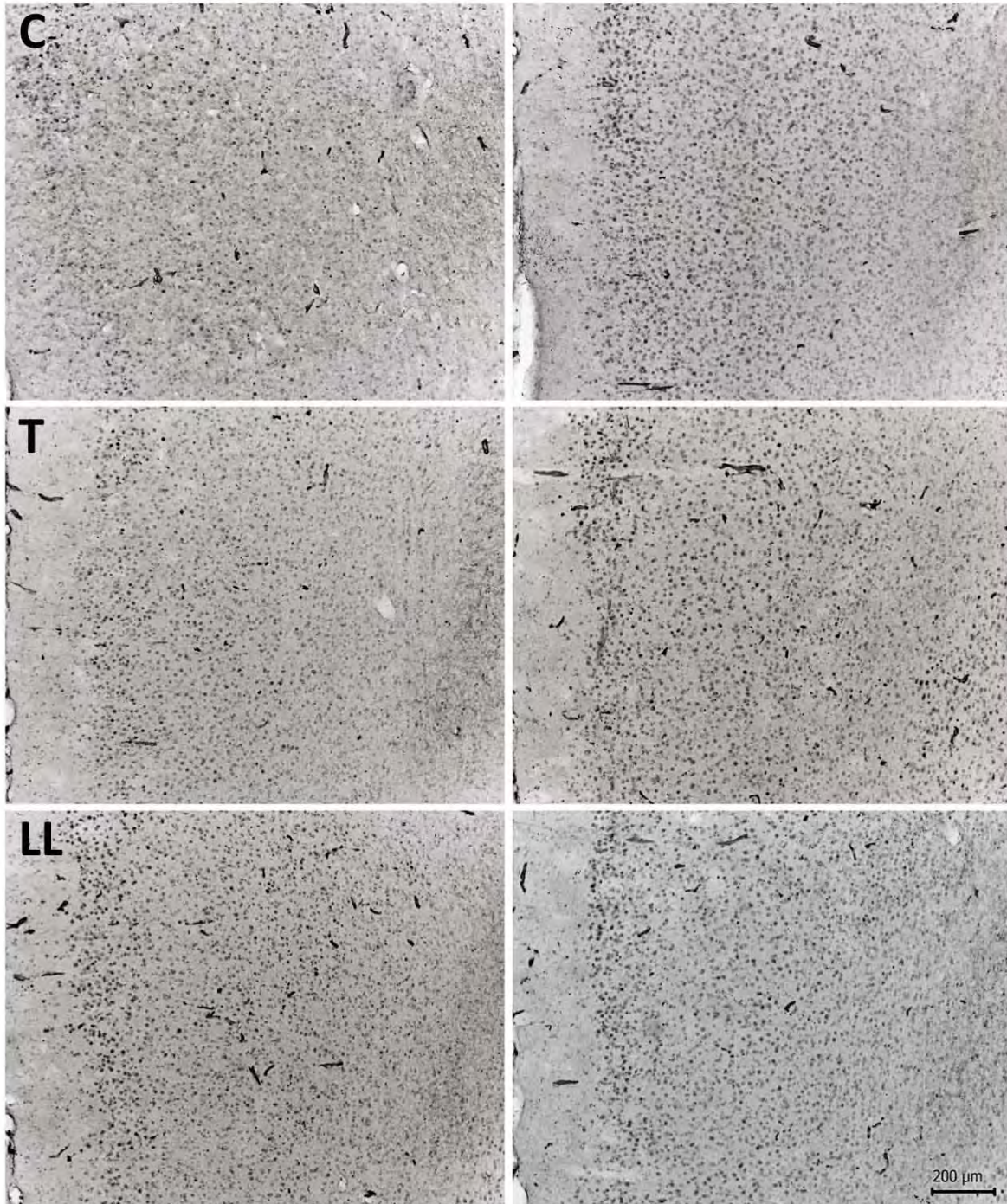


Figura 10. Fotografías representativas del número de células positivas a PER1 día vs noche en la corteza infralímbica de un animal. Arriba grupo control (C), centro grupo trabajador (T) y abajo grupo luz constante (LL).

Corteza insular

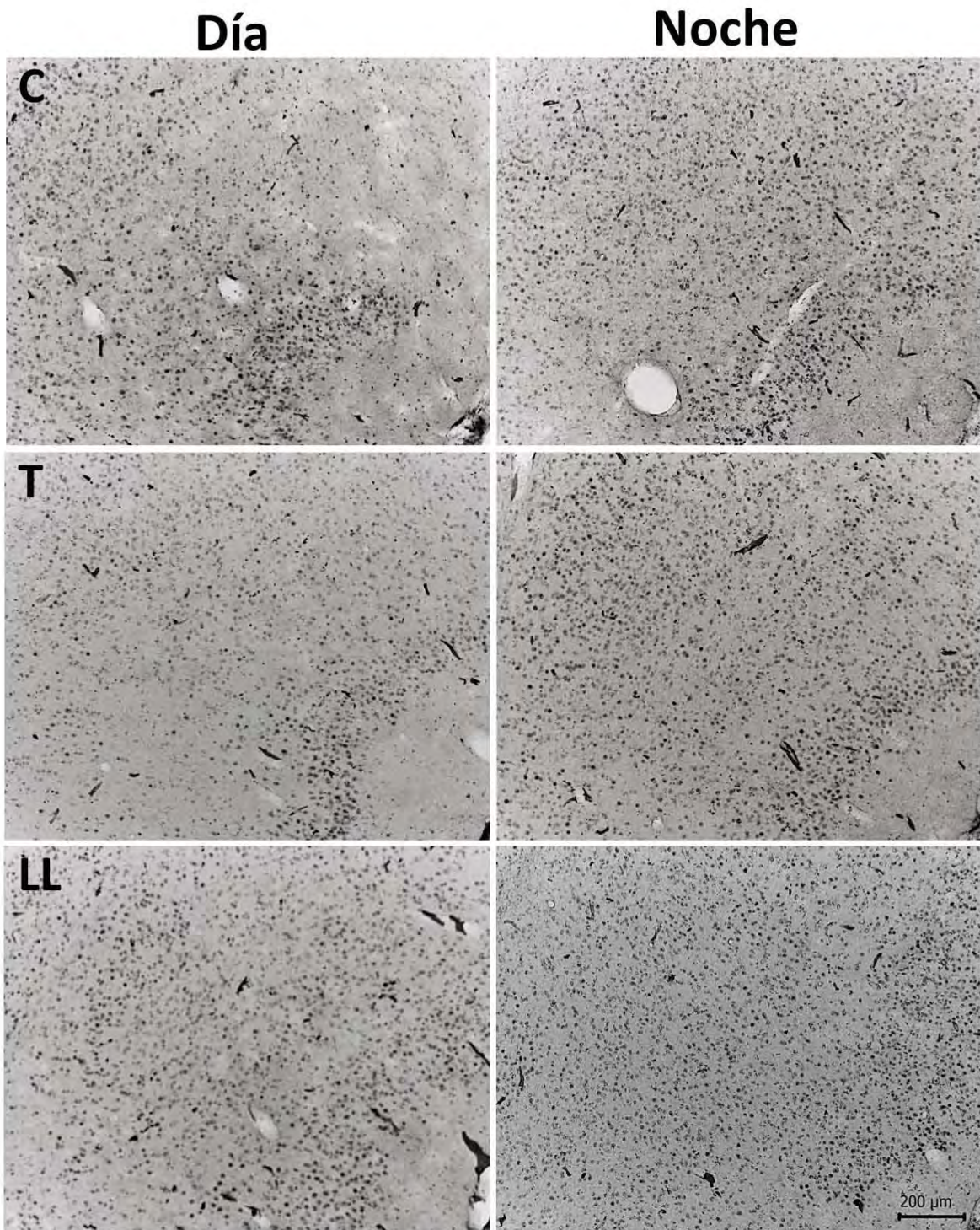


Figura 11. Fotografías representativas del número de células positivas a PER1 día vs noche en la corteza insular de un animal. Arriba grupo control (C), centro grupo trabajador (T) y abajo grupo luz constante (LL).

En el núcleo accumbens *core* y *shell*, el grupo T perdió el ritmo día-noche en el número de células positivas a PER1 ($p=0.60$) y ($p=0.94$) respectivamente.

El grupo bajo LL mostró valores más bajos en ambas regiones; perdió el ritmo en el *core* ($p=0.48$) y mostró una diferencia significativa día-noche en el *shell* ($*p=0.011$) (Figuras 12, 13 y 14).

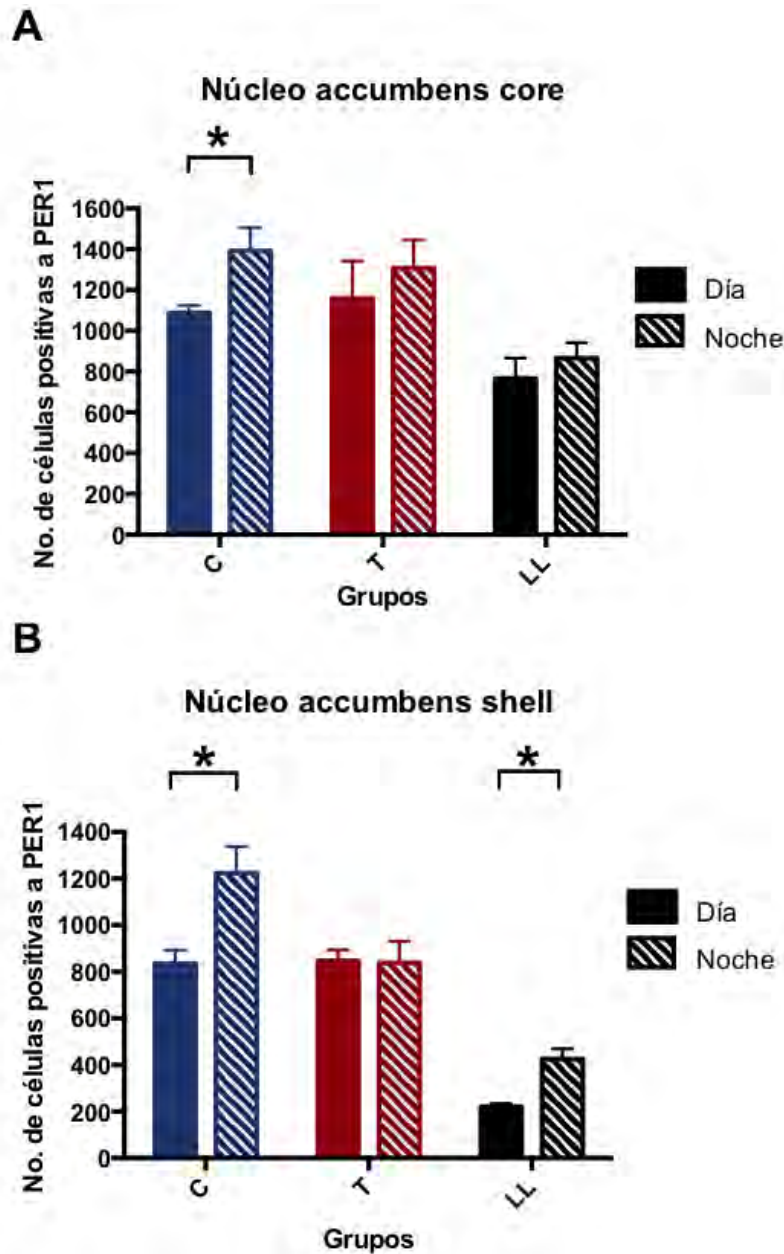


Figura 12. Número de células positivas a PER1 en A) Núcleo accumbens *core*. Se encontraron diferencias significativas día vs noche en el grupo C ($*p=0.046$); no se presentó ritmo en el T ni en el LL. B) Núcleo accumbens *shell*. Se encontraron diferencias significativas día vs noche en el grupo C ($*p=0.016$) y en el LL ($*p=0.011$); el T no presentó ritmo. Prueba “t” de Student; ($n=4$ por grupo).

Núcleo accumbens core

Día

Noche

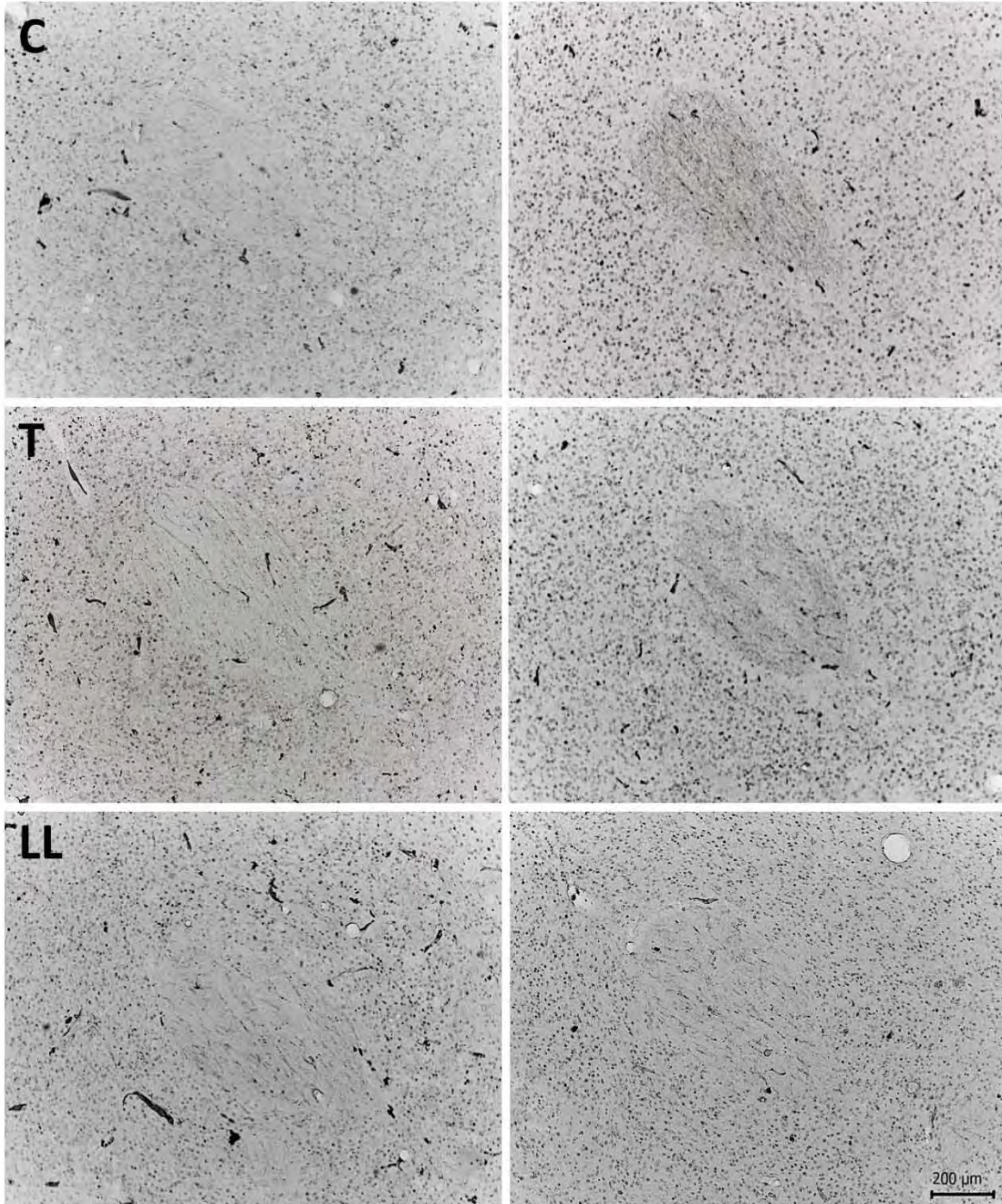


Figura 13. Fotografías representativas del número de células positivas a PER1 día vs noche en el núcleo accumbens core de un animal. Arriba grupo control (C), centro grupo trabajador (T) y abajo grupo luz constante (LL).

Núcleo accumbens *shell*

Día

Noche

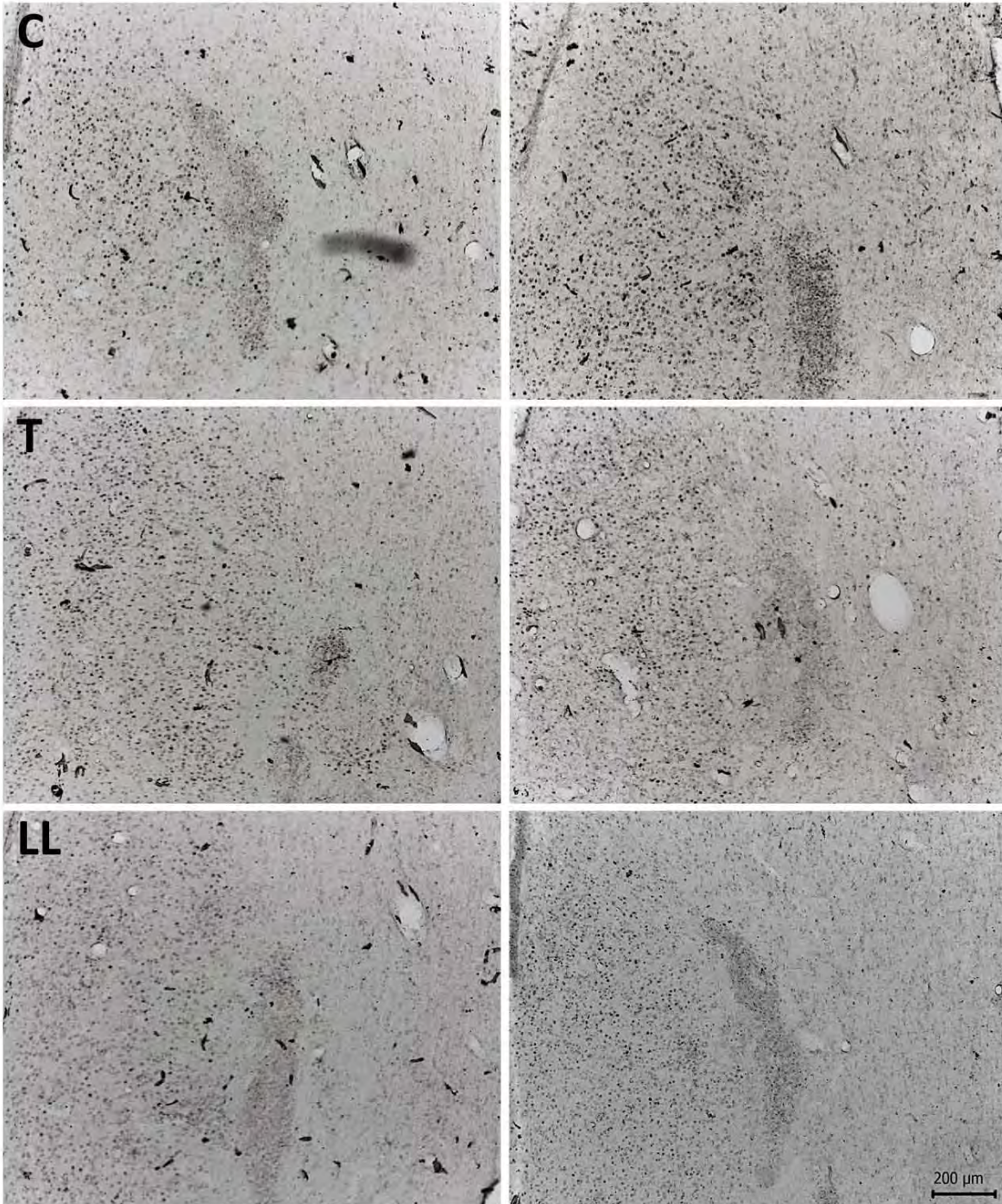


Figura 14. Fotografías representativas del número de células positivas a PER1 día vs noche en el núcleo accumbens *shell* de un animal. Arriba grupo control (C), centro grupo trabajador (T) y abajo grupo luz constante (LL).

En el núcleo supraquiasmático, se observa un ritmo día-noche en el grupo C (*p=0.002), asimismo las ratas del grupo T mantuvieron el ritmo (*p=0.0008), mientras que las ratas LL lo perdieron (p=0.06) (Figuras 15 y 16).

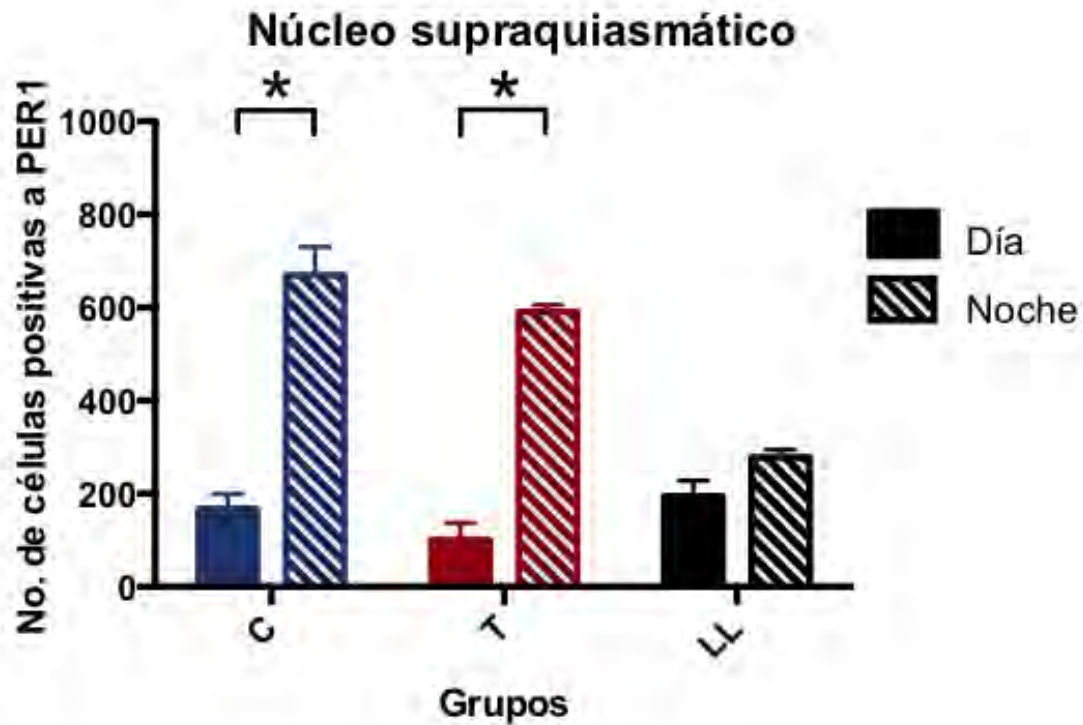


Figura 15. Número de células positivas a PER1 en el núcleo supraquiasmático. Se encontraron diferencias significativas día vs noche en el grupo C ($P^* < 0.002$) y el T ($P^* < 0.0008$), mientras que el grupo LL no mostró ritmo. Prueba "t" de Student; (n=4 por grupo).

Núcleo supraquiasmático

Día

Noche

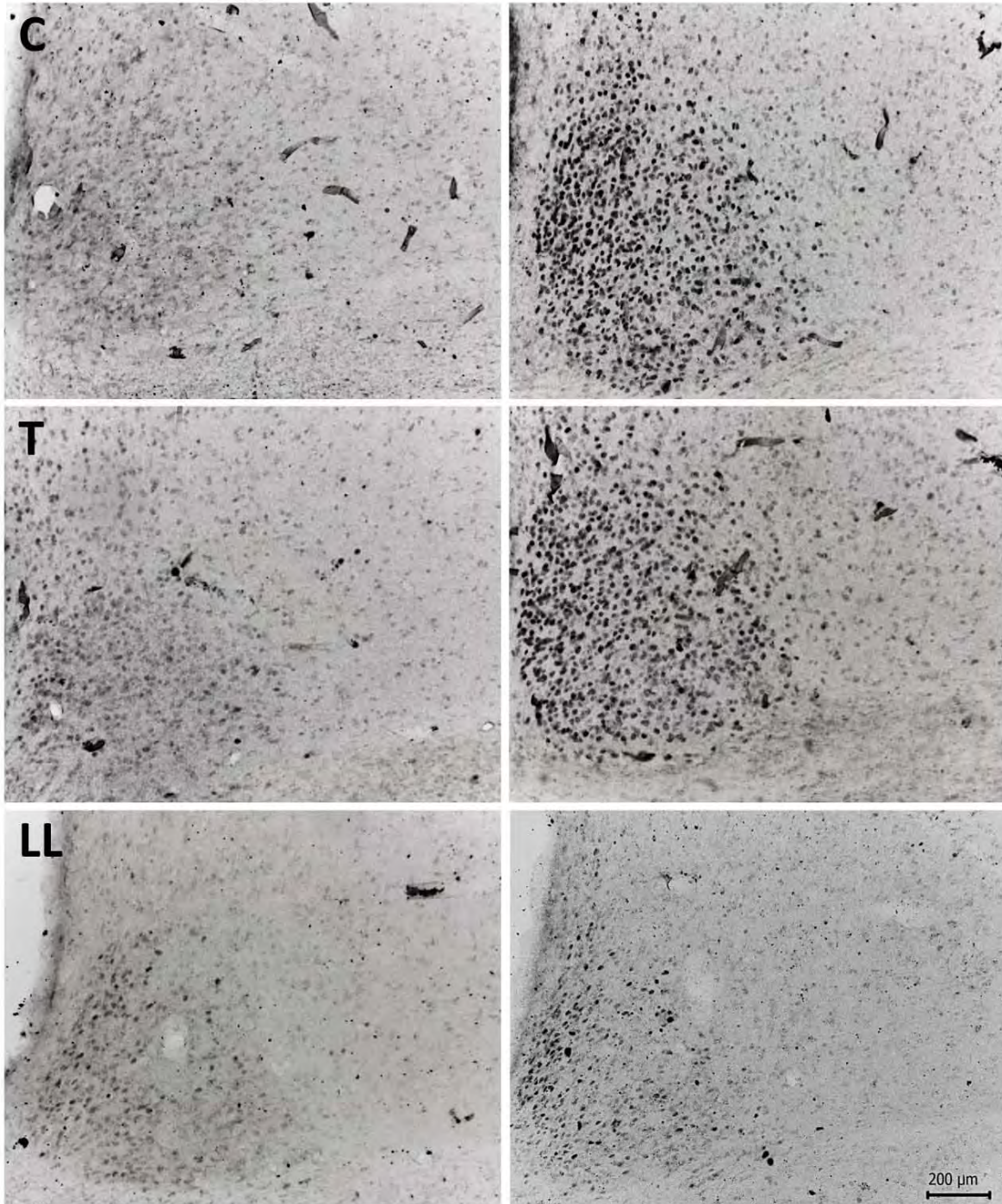


Figura 16. Fotografías representativas del número de células positivas aPER1 día vs noche en el núcleo supraquiasmático de un animal. Arriba grupo control (C), centro grupo trabajador (T) y abajo grupo luz constante (LL)

Consumo de alcohol

Al concluir el periodo de tres semanas de disrupción circadiana los animales de los tres grupos tuvieron acceso a una botella de agua y una botella de alcohol al 10% por 12 días (n=8 / grupo) (figura 17).

Por 12 días se tomó un registro diario de la ingesta de agua y de alcohol representado en g/kg de peso. Las ratas tuvieron acceso a 16 horas de alcohol entre semana (17:00-9:00 del día siguiente); y *ad libitum* durante el fin de semana.

Un ANOVA de dos vías indicó diferencias significativas en el consumo de alcohol entre grupos [$F_{(2, 14)} = 5.224$, $*p=0.020$], así como entre los días [$F_{(1, 77)} = 3.650$, $*p=0.0003$] siendo el grupo trabajador el que registró el mayor consumo. (Figura 17A). Mediante el análisis de comparaciones múltiples (prueba *post hoc*) con la prueba de Tukey se obtuvieron diferencias significativas entre el grupo C y el grupo T en los días 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 12 ($*p=0.05$); por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre los grupos C y LL a lo largo de la administración repetida ($p > 0.05$).

Se obtuvo también el consumo promedio diario de alcohol; en el cual, se obtuvieron diferencias significativas entre grupos [$F_{(2,33)} = 27.58$, $*p < 0.0001$]. La prueba *post hoc* indicó diferencias entre el grupo C y el grupo T, siendo éste último el que presentó el mayor consumo de alcohol (figura 17B).

El consumo de agua para los tres grupos (mL) se mantuvo sin diferencias a lo largo del protocolo de administración de alcohol; asimismo, al promediar el consumo diario entre grupos no se obtuvieron diferencias (figura 17C). No se obtuvieron diferencias significativas en el consumo de agua entre grupos [$F_{(2,21)} = 0.1349$, $p=0.065$].

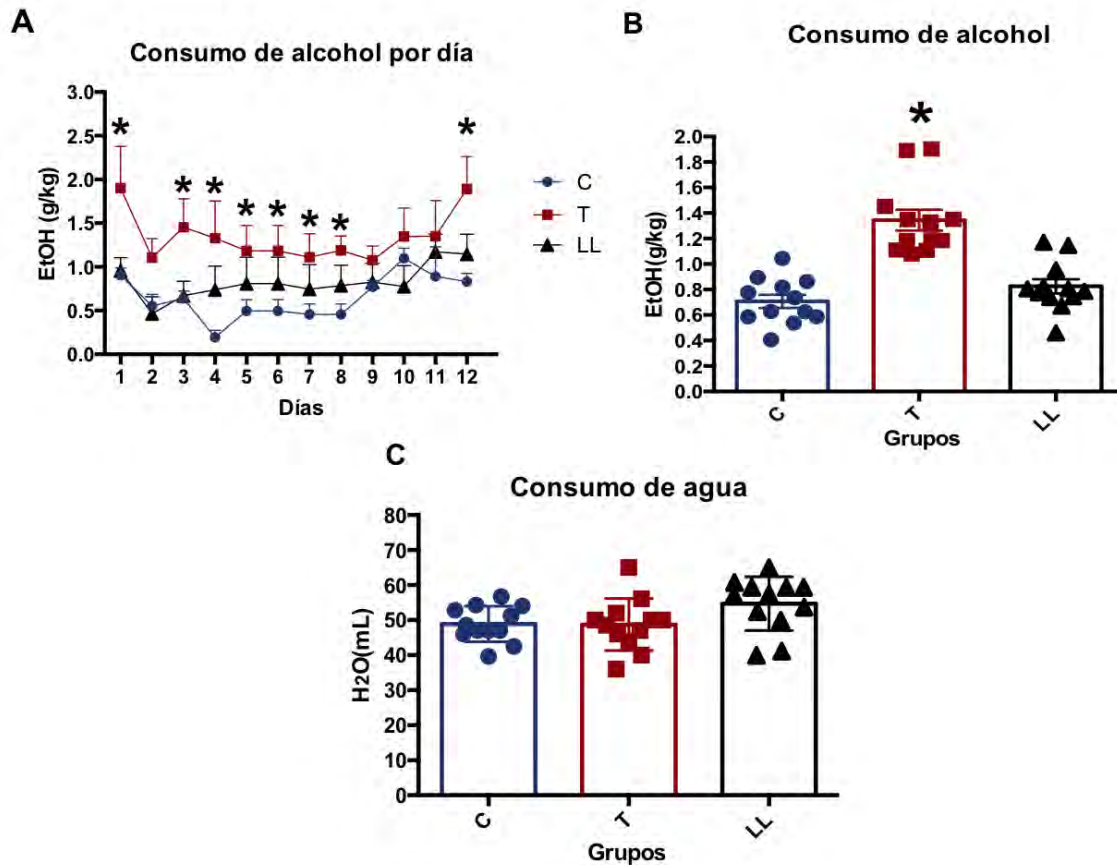


Figura 17. Consumo de alcohol. A) Consumo por día para los tres grupos. El grupo T presentó un mayor consumo que el grupo C (ANOVA de dos vías: $*p=0.020$). B) En el consumo promedio entre grupos se observó un mayor consumo de alcohol para el grupo T en comparación con el grupo C (ANOVA de una vía: $*p<0.0001$). C) No hubo diferencias en el consumo de agua entre tratamientos. (ANOVA de una vía: $P=0.065$) ($n=8$). El * indica una diferencia significativa con respecto al control.

Prueba de atracción

Durante esta prueba cada animal ($n=8$) tuvo libre acceso a una botella con 20 mL de alcohol y otra con 50 mL de agua durante una hora, se obtuvo el registro en g/kg de peso corporal para el alcohol y en mL para el agua (figura 18).

Se registró un mayor consumo de alcohol en el grupo T y en el grupo LL observándose variabilidad intragrupo para ambos, caracterizada por ratas con alto consumo y otras con bajo consumo. Para las ratas control el consumo se mantuvo con poca variabilidad (Figura 18A).

El análisis realizado indicó diferencias significativas entre grupos en el consumo durante la prueba de atracón [F (2, 21) = 5.211, *p= 0.014]. La prueba *post hoc* indicó diferencias entre el grupo C y el grupo T, así como entre el grupo C y el grupo de LL (figura 18A).

En cuanto al consumo de agua durante esta prueba todos los animales tomaron cantidades similares de agua (Figura 18B). No se obtuvieron diferencias significativas [F (2, 21) = 1.544, p= 0.236].

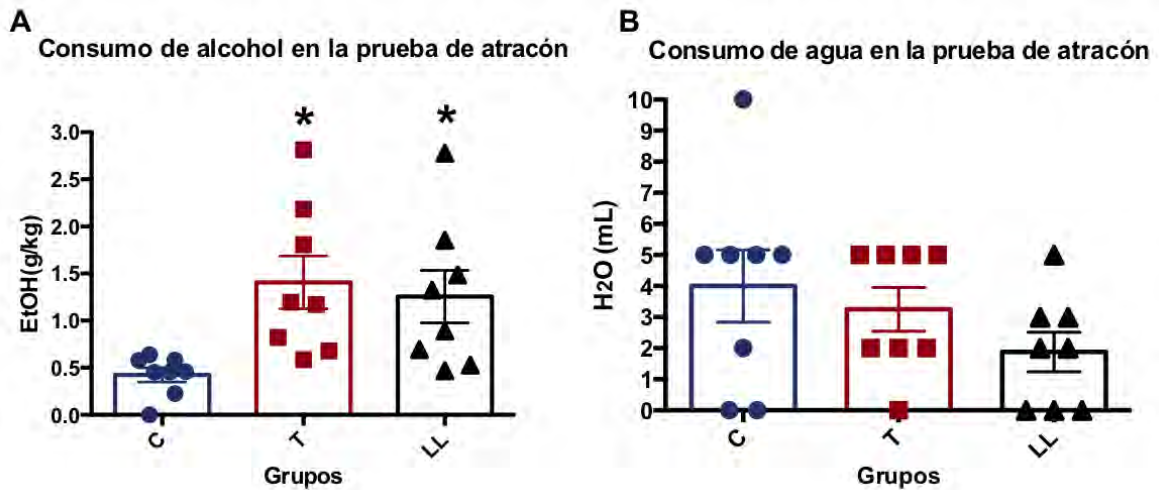


Figura 18. Consumo de alcohol durante la prueba tipo Binge. A) Tanto el grupo de LL como el T consumieron significativamente más alcohol que el grupo C durante una prueba de atracón. (ANOVA de una vía: *p=0.014)
 B) No se obtuvieron diferencias significativas en el consumo de agua (ANOVA de una vía p= 0.236) (n=8)
 El * indica una diferencia significativa con respecto al control.

Actividad neuronal como respuesta al consumo de alcohol por medio de c-Fos

Se evaluó el número de células inmunopositivas a c-Fos antes (20 horas) (n=4 por grupo) y después del consumo de alcohol en la prueba de atracción (19:30 horas) (n=6 por grupo) para los tres grupos en cinco áreas cerebrales: La corteza infralímbica, la corteza insular, el núcleo accumbens *core* y *shell* y el núcleo supraquiasmático. Las n's son distintas debido a que para la evaluación previa al consumo fueron utilizados solo los cerebros correspondientes al diseño experimental 1 del punto temporal nocturno; esto, para evitar variaciones circadianas de c-Fos.

Para la corteza infralímbica, los tres grupos en la fase previa a la exposición de alcohol mostraron un número similar de células positivas a c-Fos. Posterior al intervalo de consumo se observó un aumento de células positivas en el grupo C y en el grupo LL en donde la activación fue mayor para éste último. No se presentaron cambios en la activación para las ratas T (Figura 19A y 20).

El ANOVA de dos vías indicó diferencias en el factor tiempo (antes vs después del consumo de alcohol) [$F_{(1,24)} = 58.5$, $p < 0.0001$], además de indicar diferencias significativas entre grupos [$F_{(2,24)} = 16.57$ * $p < 0.0001$]. También se realizó un análisis de comparaciones múltiples (prueba *post hoc*) mediante la prueba de Tukey. En este sentido y respecto a antes vs después del consumo existieron diferencias en el grupo C y en el grupo LL (* $p=0.05$); por otro lado, se observaron diferencias entre los grupos C y T y también C y LL después del consumo de alcohol (* $p=0.05$).

Un efecto similar se observó en la corteza insular, en donde el grupo LL mostró un aumento en la activación de c-Fos posterior al consumo de alcohol, siendo mayor que la del grupo C. Mientras que el grupo T no mostró cambios (Figura 19B y 21). Se observaron diferencias antes vs después del consumo de alcohol, [$F_{(1,24)} = 33.15$, * $p < 0.001$] y también entre grupos después del consumo [$F_{(2,24)} = 15.25$, * $p < 0.001$]. En la prueba *post hoc* se observaron diferencias significativas antes vs después del consumo. Se obtuvieron diferencias significativas en el grupo LL (* $p=0.05$); así como entre los grupos C y T y los grupos C y LL tras el consumo de alcohol (* $p=0.05$).

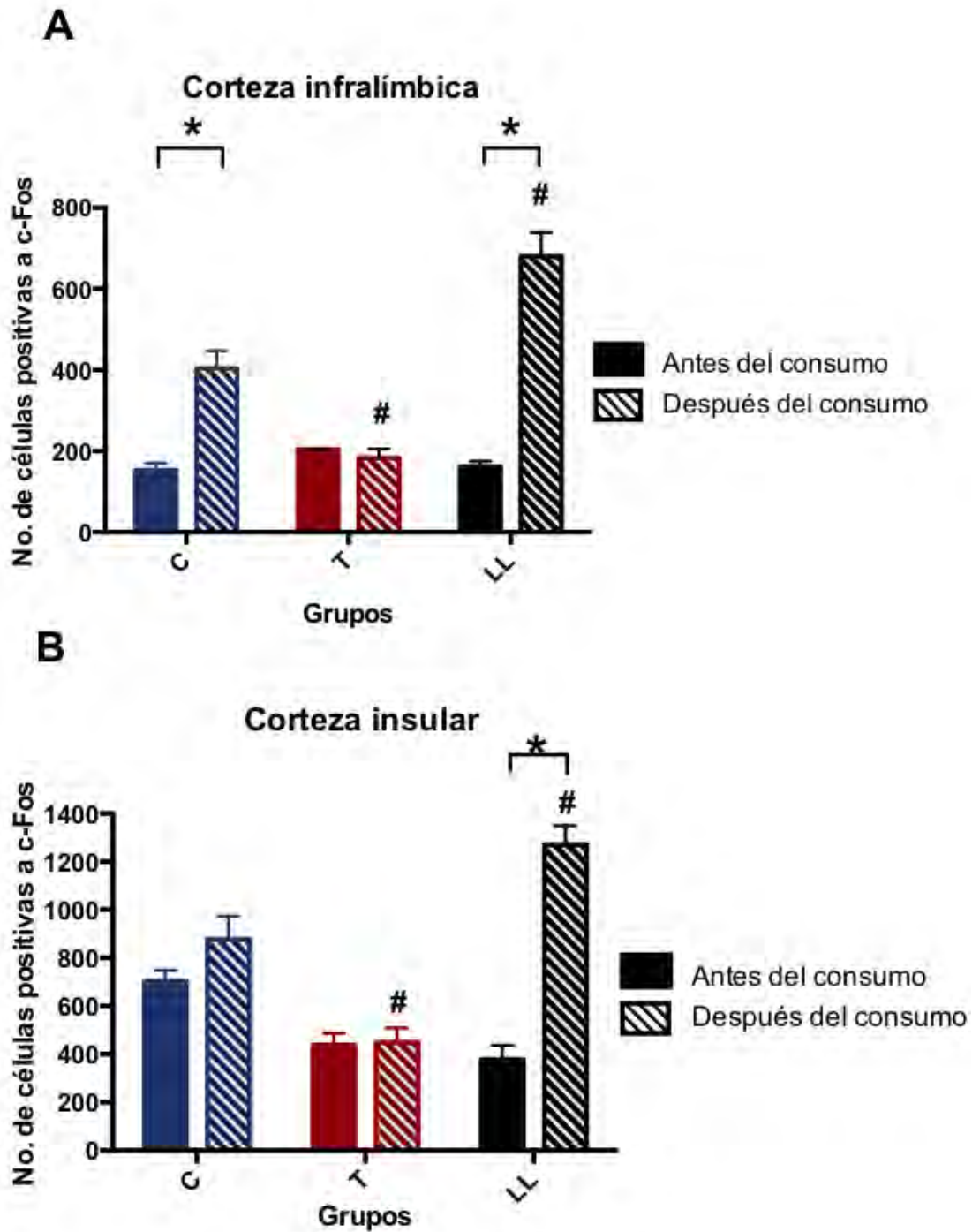


Figura 19. Número de células positivas a c-Fos. A) Corteza infralímbica. Se encontraron diferencias significativas antes vs después del consumo de alcohol en el grupo C y LL (ANOVA de dos vías: $p < 0.0001$) asimismo se encontraron diferencias significativas entre grupos después del consumo de alcohol (ANOVA de dos vías: $p < 0.0001$). B) Corteza insular. Se observaron diferencias significativas antes vs después del consumo de alcohol en el grupo de LL (ANOVA de dos vías: $p < 0.001$). Se encontraron también diferencias significativas entre grupos después del consumo de alcohol (ANOVA de dos vías: $p < 0.001$).

El * indica una diferencia significativa antes vs después del consumo de alcohol.

El # indica una diferencia significativa después el consumo de alcohol respecto al control.

Corteza infralímbica

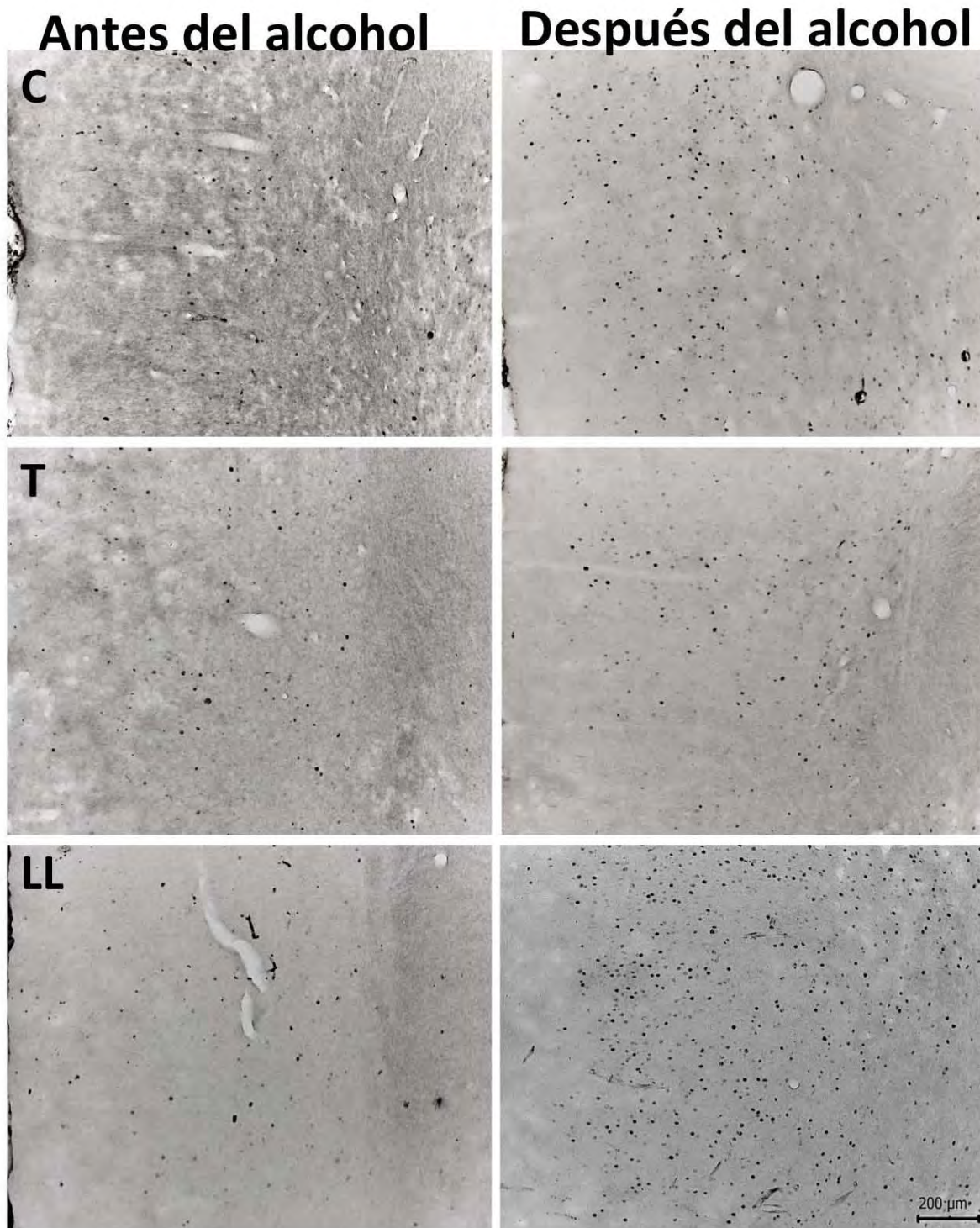


Figura 20. Fotografías representativas del número de células positivas a c-Fos antes vs después del consumo de alcohol en la corteza infralímbica de un animal. Arriba grupo control (C), centro grupo trabajador (T) y abajo grupo luz constante (LL)

Corteza insular

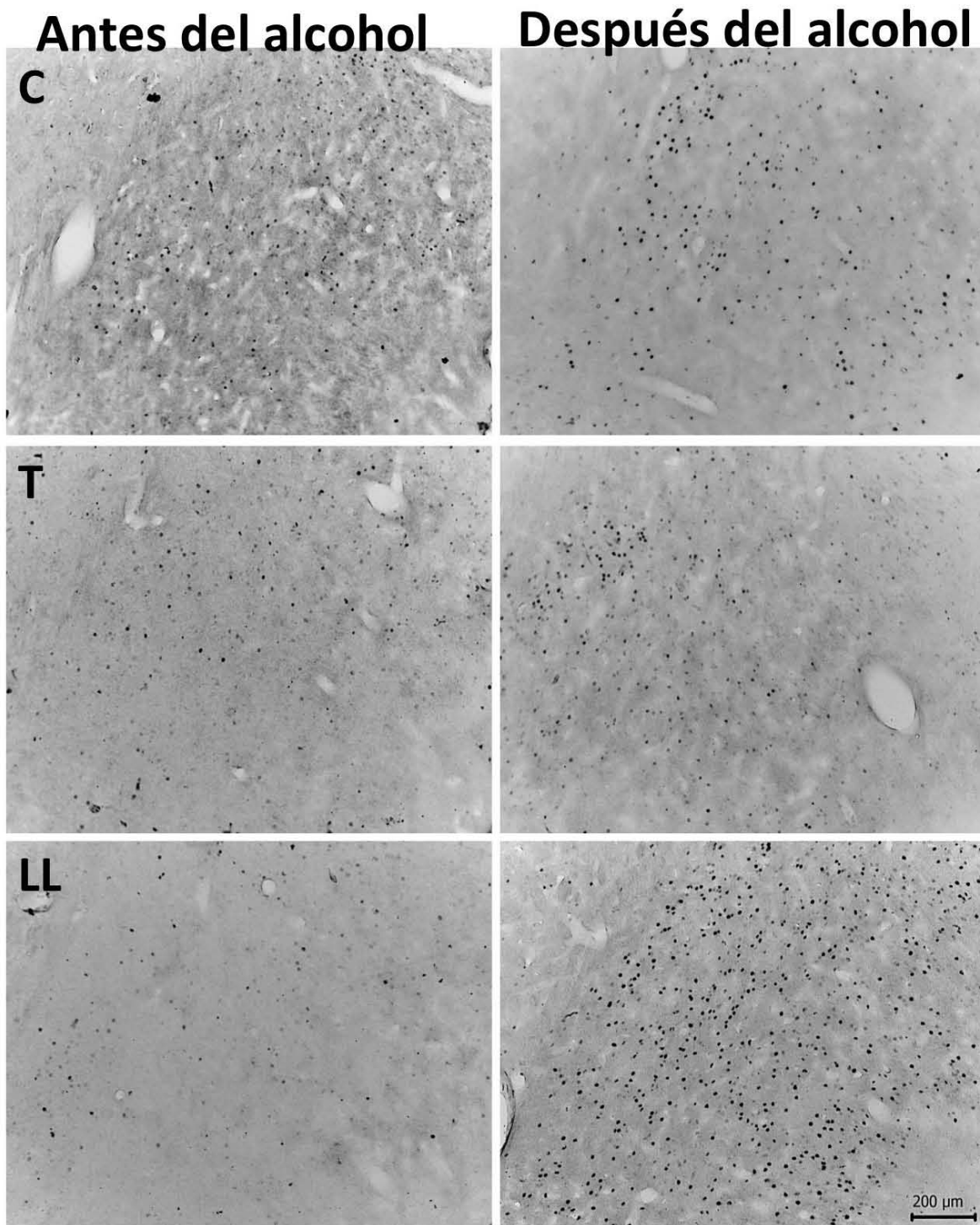


Figura 21. Fotografías representativas del número de células positivas a c-Fos antes vs después del consumo de alcohol en la corteza insular. Arriba grupo control (C), centro grupo trabajador (T) y abajo grupo luz constante (LL)

En el núcleo accumbens *core*, antes del consumo de alcohol, los tres grupos mostraron valores similares en el número de células positivas a c-Fos. Posterior al intervalo de exposición al alcohol, solamente el grupo LL mostró un aumento significativo respecto al control (Figura 22A y 23). Se observaron diferencias significativas antes vs después del consumo de alcohol [$F_{(1,24)}=6.319$, $*p= 0.019$]; asimismo, entre grupos [$F_{(2,24)}=1.514$ $*p= 0.05$]. En la prueba *post hoc* se observaron diferencias significativas antes vs después del consumo se obtuvieron diferencias significativas en el grupo LL ($*p= 0.05$); por otro lado, entre grupos se observaron diferencias significativas entre los grupos C y LL tras el consumo de alcohol ($*p= 0.05$).

En el accumbens *shell*, los tres grupos antes del consumo de alcohol, mostraron valores similares en el número de células positivas a c-Fos. Posterior al intervalo de acceso al alcohol el grupo C y el LL mostraron un aumento de células positivas a c-Fos mientras que en el grupo T esto no se modificó (Figura 22B y 24). Se obtuvieron diferencias significativas antes vs después del consumo de alcohol [$F_{(1,24)}=12.69$, $*p= 0.012$] y entre grupos [$F_{(2,24)}=5.142$, $*p= 0.013$]. En la prueba *post hoc* se observaron diferencias significativas antes vs después del consumo se obtuvieron diferencias significativas en el grupo LL ($*p= 0.05$); y, entre grupos se observaron diferencias significativas entre el grupo C y el grupo T después el consumo de alcohol ($*p= 0.05$).

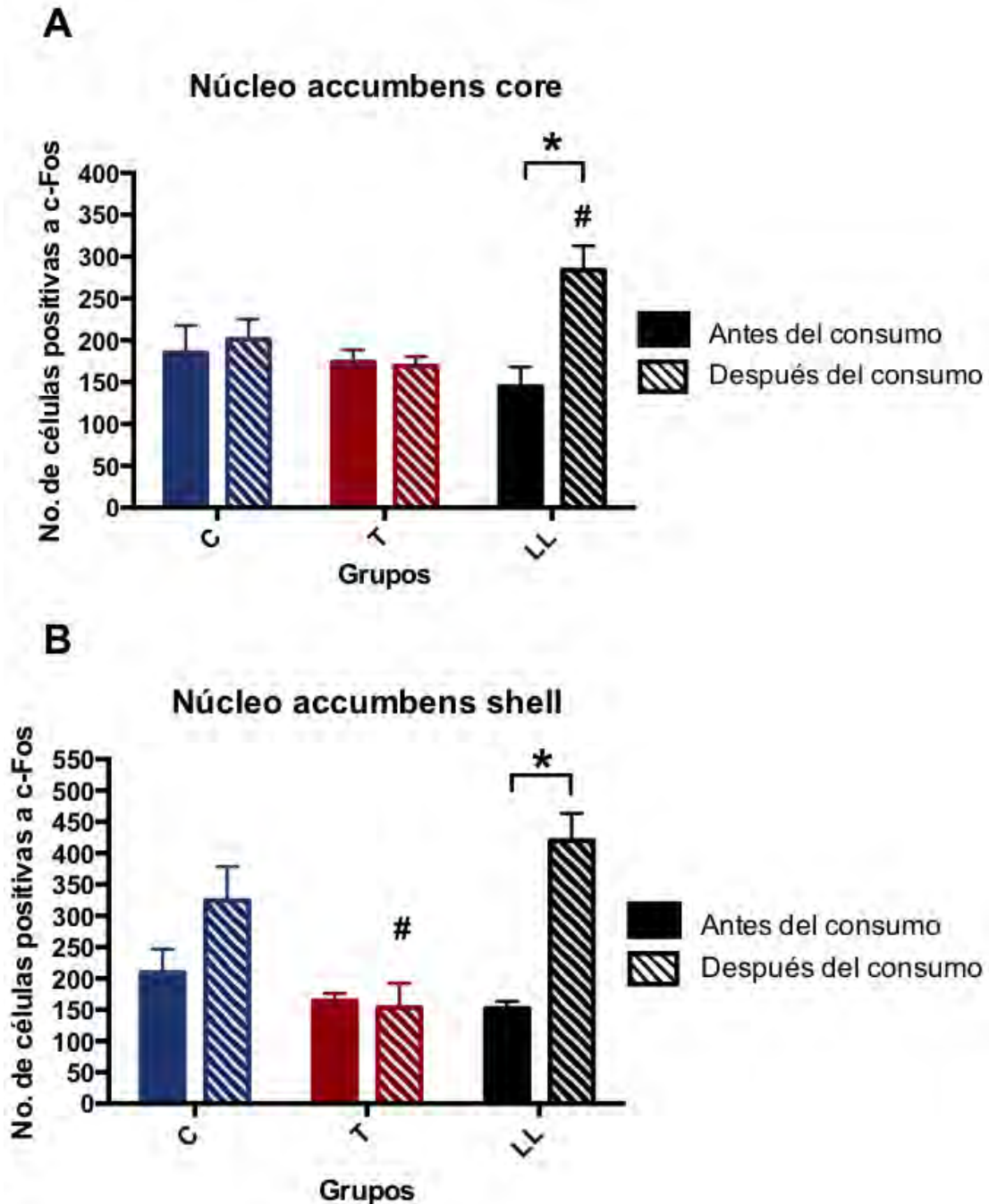


Figura 22. Número de células positivas a c-Fos. A) Núcleo accumbens *core*. Se encontraron diferencias significativas antes vs después del consumo de alcohol en el grupo de luz constante (ANOVA de dos vías: $*p=0.019$); asimismo se encontraron diferencias significativas entre grupos después del consumo de alcohol (ANOVA de dos vías: $*p=0.05$). B) Núcleo accumbens *shell*. Se encontraron diferencias significativas antes vs después del consumo de alcohol en el grupo LL (ANOVA de dos vías: $*p=0.012$) Se encontraron también diferencias significativas entre grupos después del consumo de alcohol (ANOVA de dos vías: $*p=0.013$)

El * indica una diferencia significativa antes vs después del consumo de alcohol.

El # indica una diferencia significativa tras el consumo de alcohol respecto al control.

Núcleo accumbens core

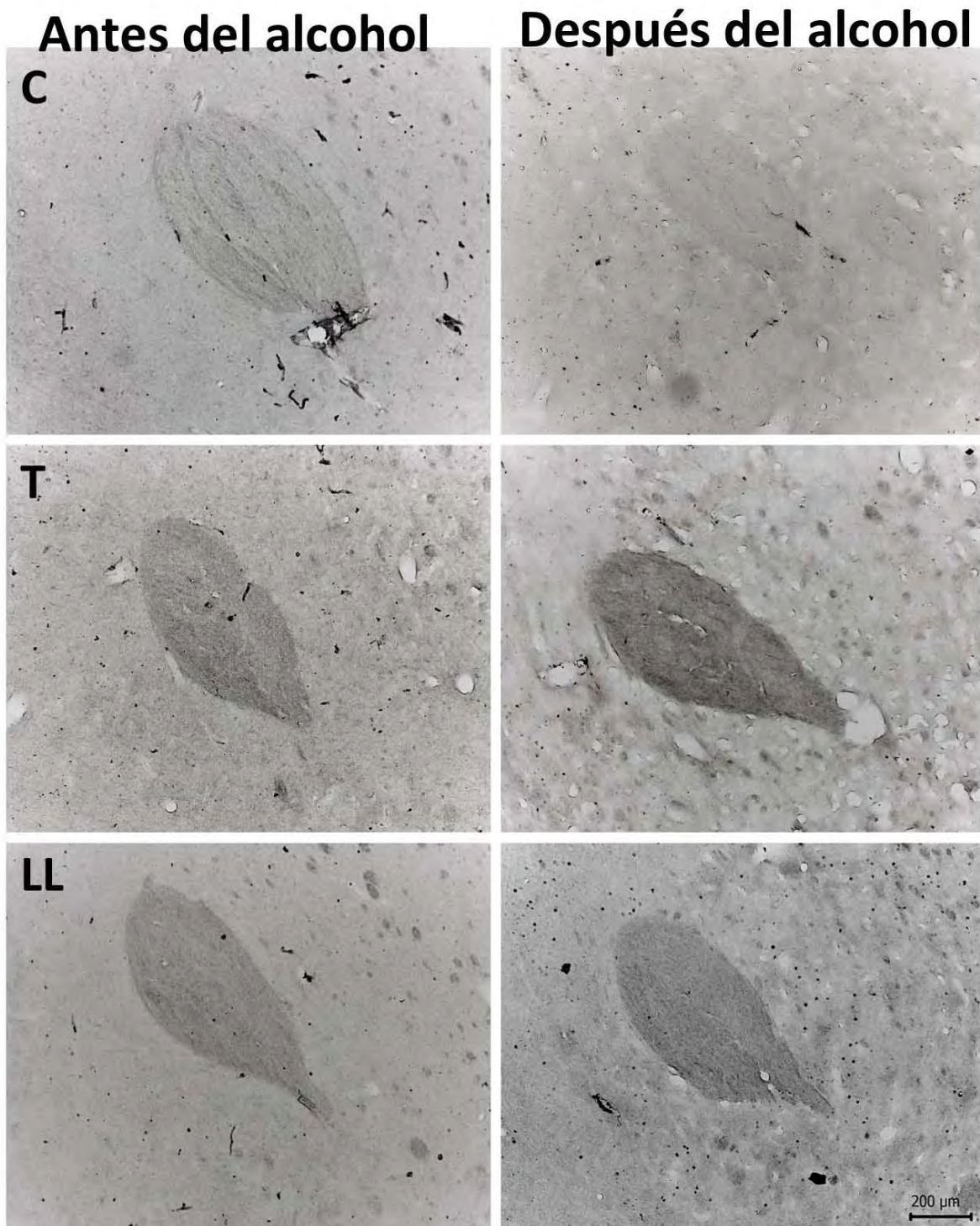


Figura 23. Fotografías representativas del número de células positivas a c-Fos antes vs después del consumo de alcohol en el núcleo accumbens core de un animal. Arriba grupo control (C), centro grupo trabajador (T) y abajo grupo luz constante (LL)

Núcleo accumbens *shell*

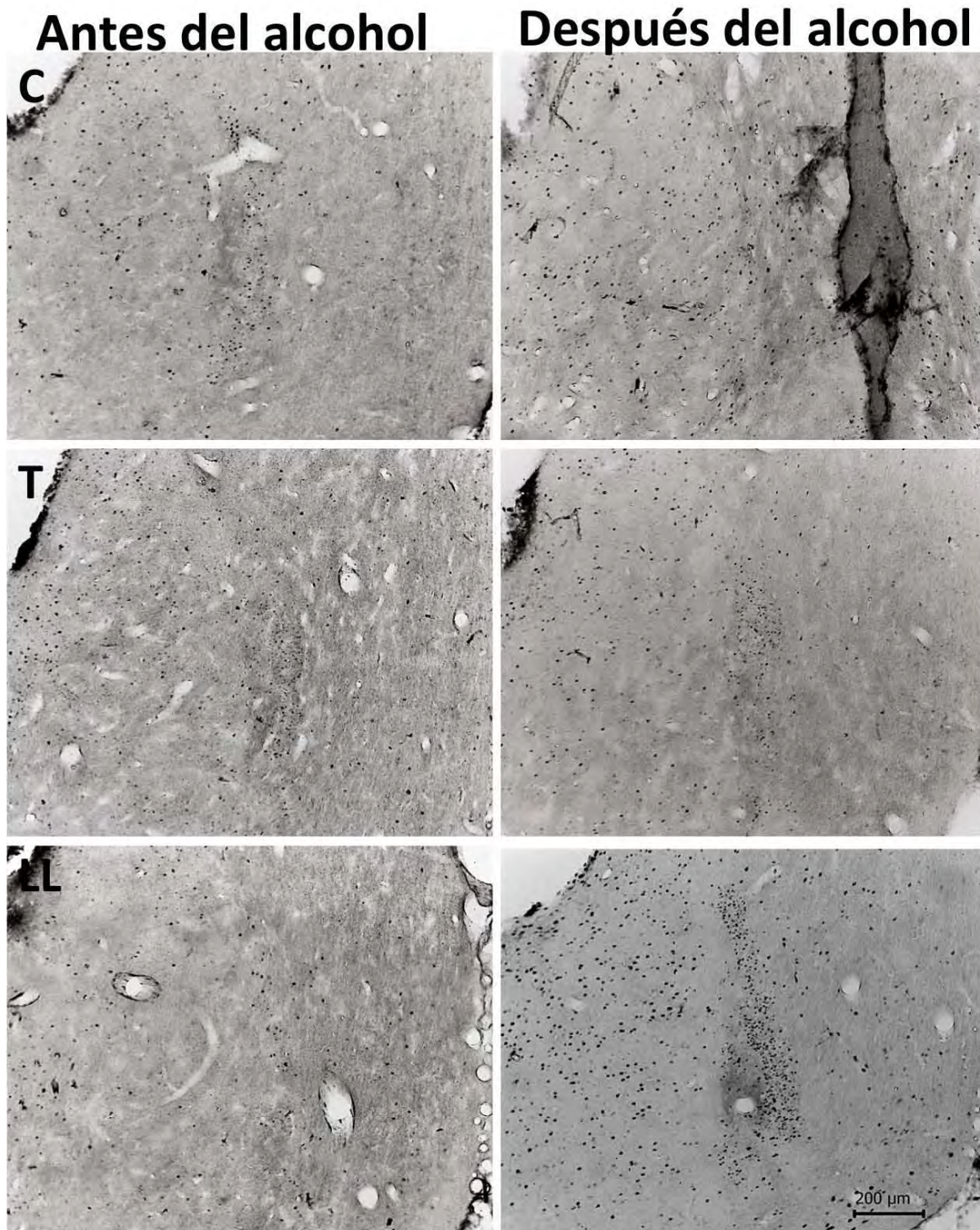


Figura 24. Fotografías representativas del número de células positivas a c-Fos antes vs después del consumo de alcohol en el núcleo accumbens shell. Arriba grupo control (C), centro grupo trabajador (T) y abajo grupo luz constante (LL).

En el núcleo supraquiasmático se encontraron valores similares de células inmunopositivas a c-Fos para todos los grupos antes de la exposición al alcohol. Después del intervalo de exposición al alcohol se encontró un aumento solamente en el grupo C, en los grupos T y LL los valores permanecieron similares a su fase previa (Figura 25 y 26). Se observaron diferencias significativas antes vs después del consumo de alcohol [$F_{(1, 24)} = 18.55$, $*p = 0.0002$] y, además diferencias significativas entre grupos [$F_{(2, 24)} = 15.62$, $*p < 0.0001$]. En la prueba *post hoc* se observaron diferencias significativas antes vs después del consumo se obtuvieron diferencias significativas en el grupo C ($*p = 0.05$); por otro lado, entre grupos se observaron diferencias significativas entre los grupos C y T, así como entre los grupos C y LL tras el consumo de alcohol ($*p = 0.05$).

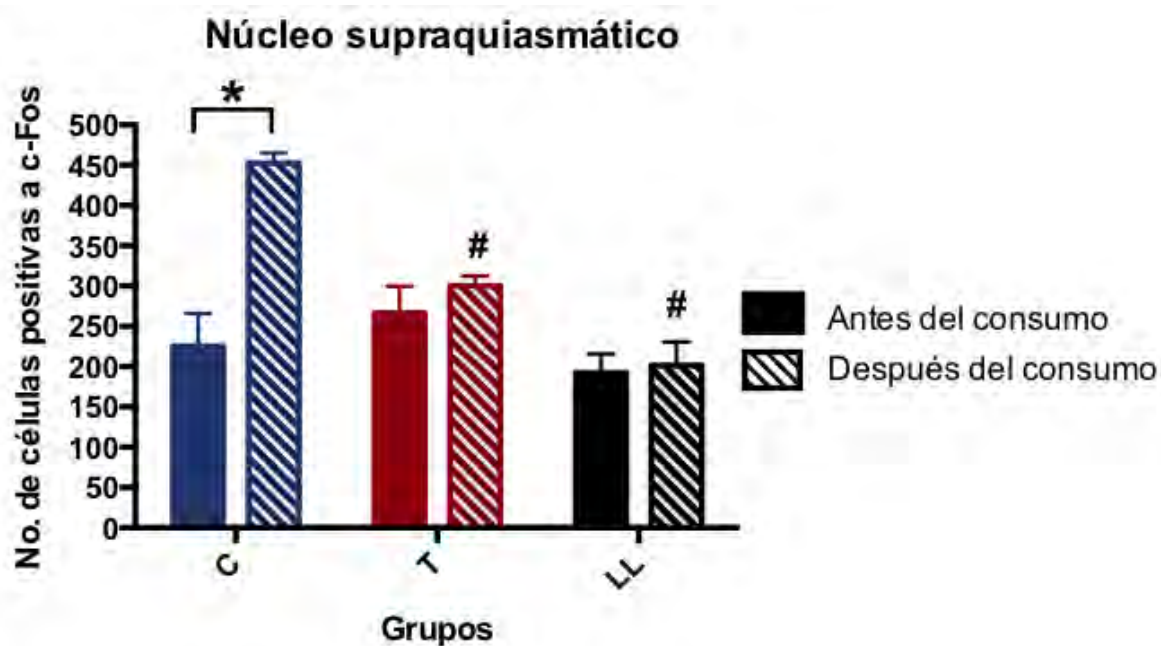


Figura 25. Número de células positivas a c-Fos. Núcleo supraquiasmático. Se encontraron diferencias significativas antes vs después del consumo de alcohol en el grupo control (ANOVA de dos vías: $*p = 0.0002$) asimismo se encontraron diferencias significativas entre grupos después del consumo de alcohol (ANOVA de dos vías: $*p < 0.0001$)

El * indica una diferencia significativa antes vs después de alcohol.

El # indica una diferencia significativa tras el consumo de alcohol respecto al control.

Núcleo supraquiasmático

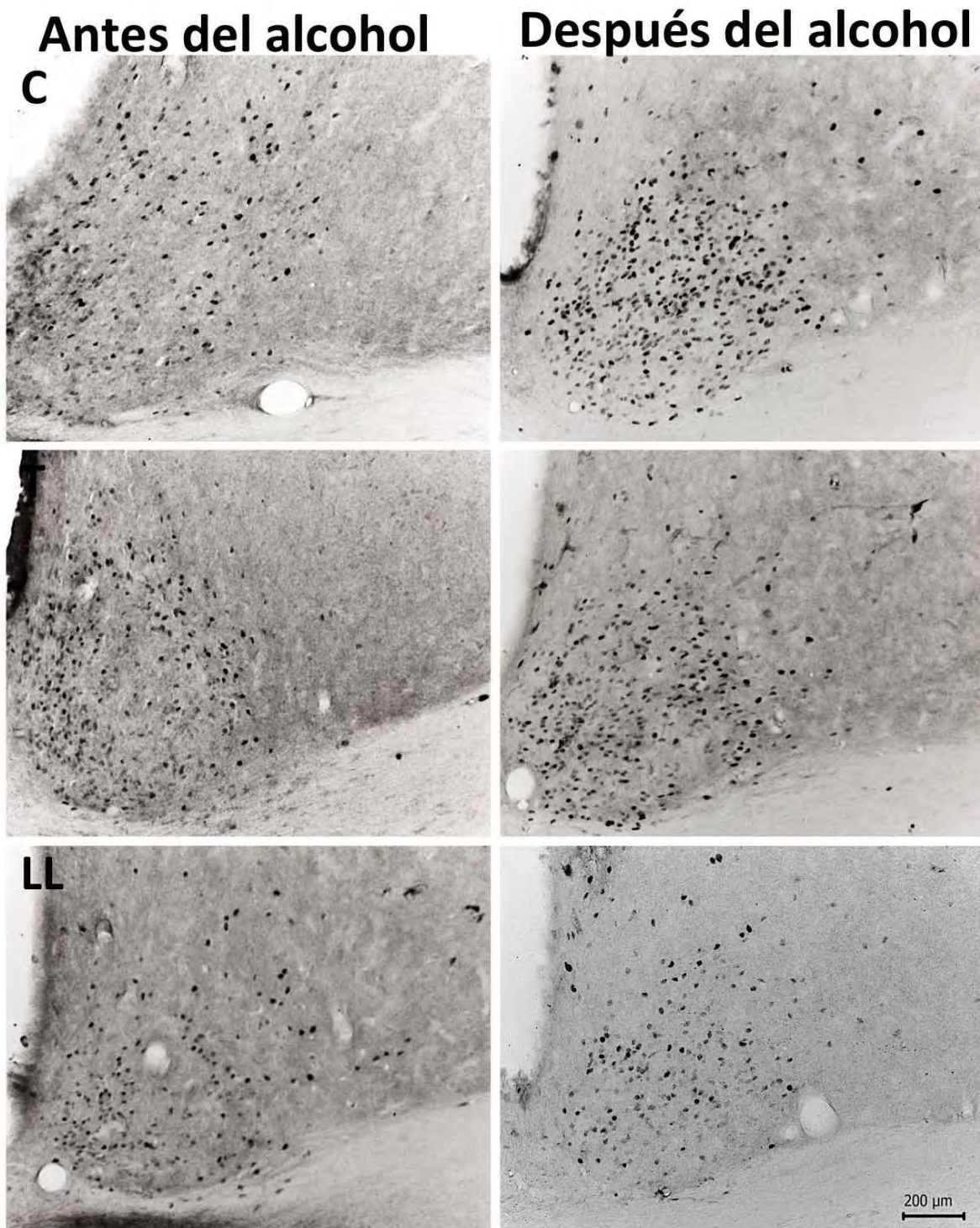


Figura 26. Fotografías representativas del número de células positivas a c-Fos antes vs después del consumo de alcohol en el núcleo supraquiasmático. Arriba grupo control (C), centro grupo trabajador (T) y abajo grupo luz constante (LL).

Acumulación de Δ fosB como respuesta al consumo de alcohol

Se evaluó la expresión del marcador de actividad neuronal Δ fosB antes (n=4 por grupo) y después del consumo de alcohol (n=5 por grupo) para los tres grupos en cinco áreas cerebrales: La corteza infralímbica, la corteza insular, el núcleo accumbens *core* y *shell* y el núcleo supraquiasmático. Las n's son distintas debido a que para la evaluación previa al consumo fueron utilizados solo los cerebros correspondientes al diseño experimental 1 del punto temporal nocturno; esto para evitar variaciones circadianas de Δ fosB.

En la corteza infralímbica los tres grupos mostraron una expresión similar en el periodo previo a la exposición a alcohol. Posterior al consumo el grupo C y el grupo LL mostraron un aumento en la activación de Δ fosB, siendo mayor la del grupo C, mientras que el grupo T no presentó cambios, (Figura 27A y 28). El ANOVA de dos vías indicó diferencias significativas en el factor tiempo (antes vs después del consumo de alcohol) [$F_{(1, 21)} = 74.42$, * $p < 0.0001$]. Asimismo, indicó diferencias significativas entre grupos [$F_{(2, 21)} = 10.78$ * $p = 0.0006$]. También se realizó un análisis de comparaciones múltiples (prueba *post hoc*) mediante la prueba de Tukey, en el cual se obtuvieron diferencias significativas respecto a antes vs después del consumo en el grupo C y en el grupo LL (* $p = 0.05$); por otro lado, se observaron diferencias entre los grupos C y T y también C y LL después del consumo de alcohol (* $p = 0.05$).

Para la corteza insular el grupo C presentó un aumento en la activación de Δ fosB posterior al consumo de alcohol comparado con la etapa previa. Posterior a la exposición al alcohol ni el grupo T ni el LL mostraron cambios (Figura 27B y 29). Se observaron diferencias significativas antes vs después del consumo de alcohol [$F_{(1, 21)} = 0.1756$, * $p = 0.001$] así como entre grupos [$F_{(2, 21)} = 5.338$, * $p = 0.013$]. En la prueba *post hoc* se observaron diferencias significativas antes vs después del consumo se obtuvieron diferencias significativas en el grupo C (* $p = 0.05$); además, entre grupos se observaron diferencias significativas entre el grupo C y el grupo LL después del consumo de alcohol (* $p = 0.05$).

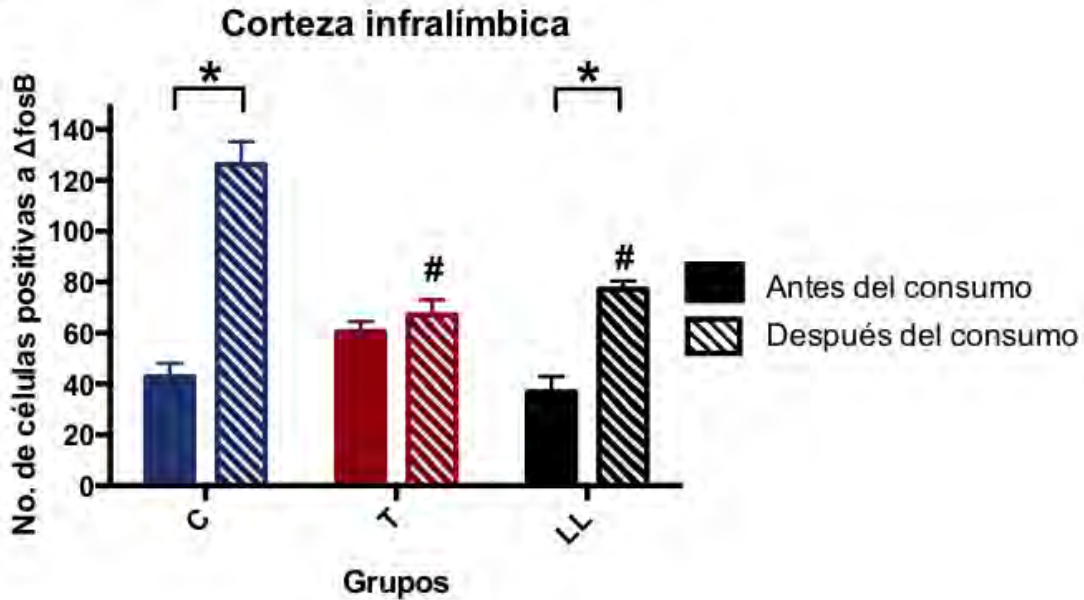
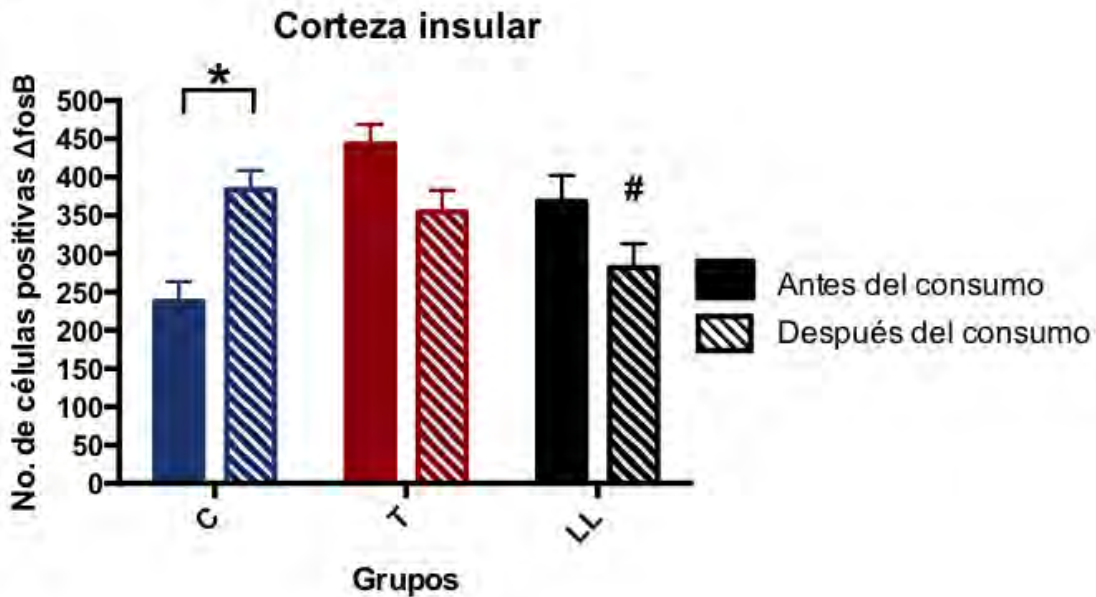
A**B**

Figura 27. Número de células positivas a Δ fosB. A) Corteza infralímbica. Se encontraron diferencias significativas antes vs después del consumo de alcohol en el grupo C y el de LL (ANOVA de dos vías: $*p < 0.0001$); asimismo, se encontraron diferencias significativas entre grupos después del consumo de alcohol (ANOVA de dos vías: $*p = 0.0006$). B) Corteza insular. Se encontraron diferencias significativas antes vs después del consumo de alcohol en el grupo C (ANOVA de dos vías: $*p < 0.001$). Se encontraron también diferencias significativas entre grupos después del consumo de alcohol (ANOVA de dos vías: $*p = 0.013$).

El * indica una diferencia significativa antes vs después del consumo de alcohol.

El # indica una diferencia significativa tras el consumo de alcohol respecto al control.

Corteza infralímbica

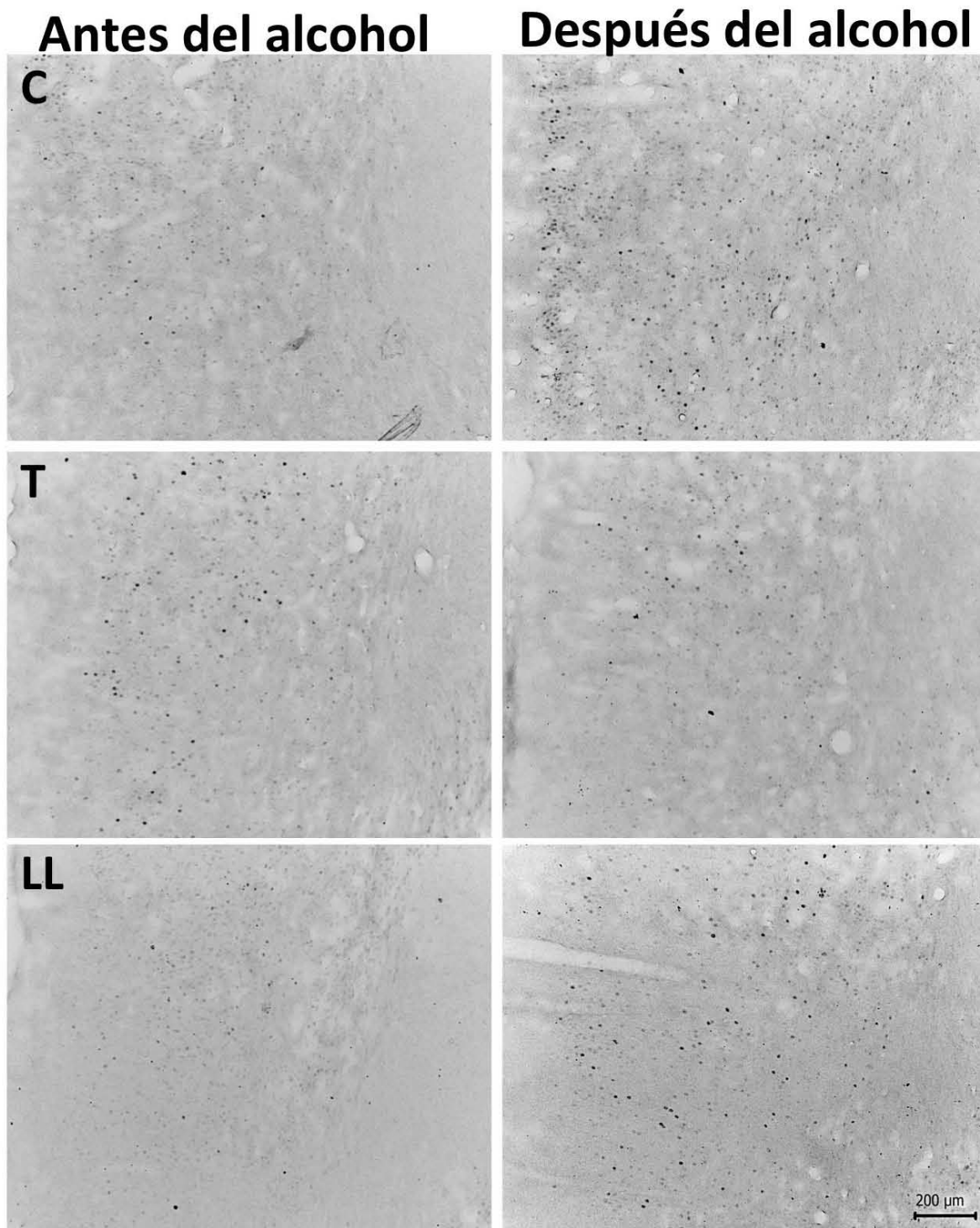


Figura 28. Fotografías representativas del número de células positivas a Δ fosB antes vs después del consumo de alcohol en la corteza infralímbica de un animal. Arriba grupo control (C), centro grupo trabajador (T) y abajo grupo luz constante (LL).

Corteza insular

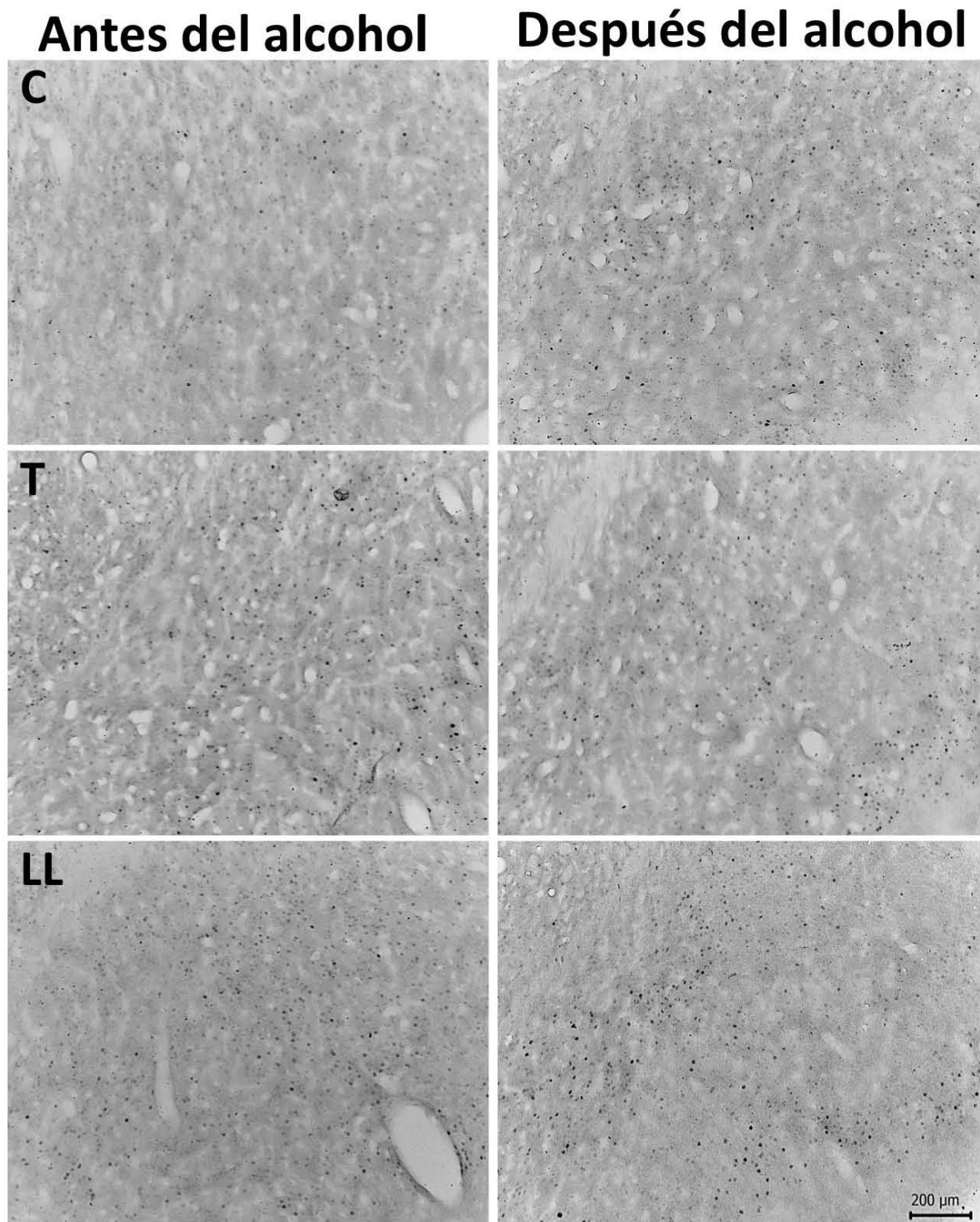


Figura 29. Fotografías representativas del número de células positivas a Δ fosB antes vs después del consumo de alcohol en la corteza insular de un animal. Arriba grupo control (C), centro grupo trabajador (T) y abajo grupo luz constante (LL).

Para el núcleo accumbens *core* los tres grupos presentaron valores similares en el número de células positivas a Δ fosB antes del consumo de alcohol. Posterior a la exposición los tres mostraron un aumento en la activación, la cual fue mayor para el grupo T en comparación con el grupo C (Figura 30A y 31). Se obtuvieron diferencias significativas antes vs después del consumo [$F_{(1, 21)} = 180.9$, $*p < 0.0001$]. Asimismo, se observaron diferencias significativas entre grupos [$F_{(2, 21)} = 7.575$, $*p = 0.003$]. En el análisis *post hoc* se obtuvieron diferencias antes vs después del consumo en los tres grupos ($*p = 0.05$); además, entre grupos se observaron diferencias significativas entre el grupo C y el grupo T después del consumo de alcohol ($*p = 0.05$).

En el núcleo accumbens *shell* el grupo T y el grupo LL presentaron una activación mayor posterior al consumo de alcohol, mientras que el grupo C no presentó diferencias (Figura 30B y 32). Se observaron diferencias significativas antes vs después del consumo [$F_{(1, 21)} = 44.12$, $*p < 0.0001$]. El análisis indicó además diferencias significativas entre grupos. [$F_{(2, 21)} = 3.799$, $*p = 0.039$]. En la prueba *post hoc* se observaron diferencias significativas antes vs después del consumo en el grupo T y en el grupo LL ($*p = 0.05$); asimismo, entre grupos, se observaron diferencias significativas entre el grupo C y el grupo T, así como entre el grupo C y el grupo LL después del consumo de alcohol ($*p = 0.05$).

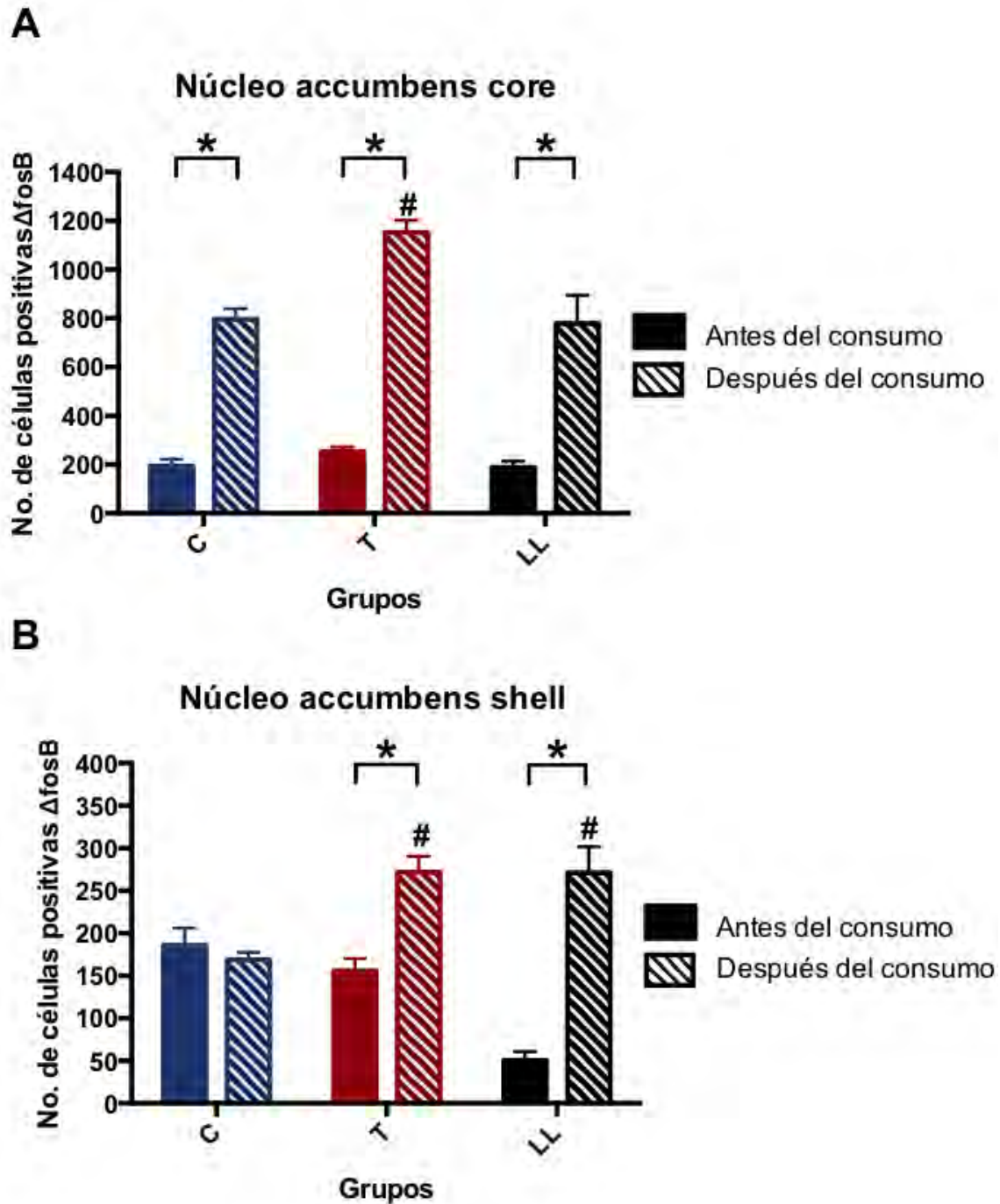


Figura 30. Número de células positivas a Δ fosB A) Núcleo accumbens *core*. Se encontraron diferencias significativas antes vs después del consumo de alcohol en los tres grupos (ANOVA de dos vías: $*p < 0.0001$) asimismo se encontraron diferencias significativas entre grupos después del consumo de alcohol (ANOVA de dos vías: $*p < 0.003$). B) Núcleo accumbens *shell*. Se encontraron diferencias significativas antes vs después del consumo de alcohol tanto en el grupo T como en el de LL (ANOVA de dos vías: $*p < 0.0001$) Se encontraron también diferencias significativas entre grupos después del consumo de alcohol (ANOVA de dos vías: $*p = 0.039$). El * indica una diferencia significativa antes vs después del consumo de alcohol. El # indica una diferencia significativa tras el consumo de alcohol respecto al control.

Núcleo accumbens core

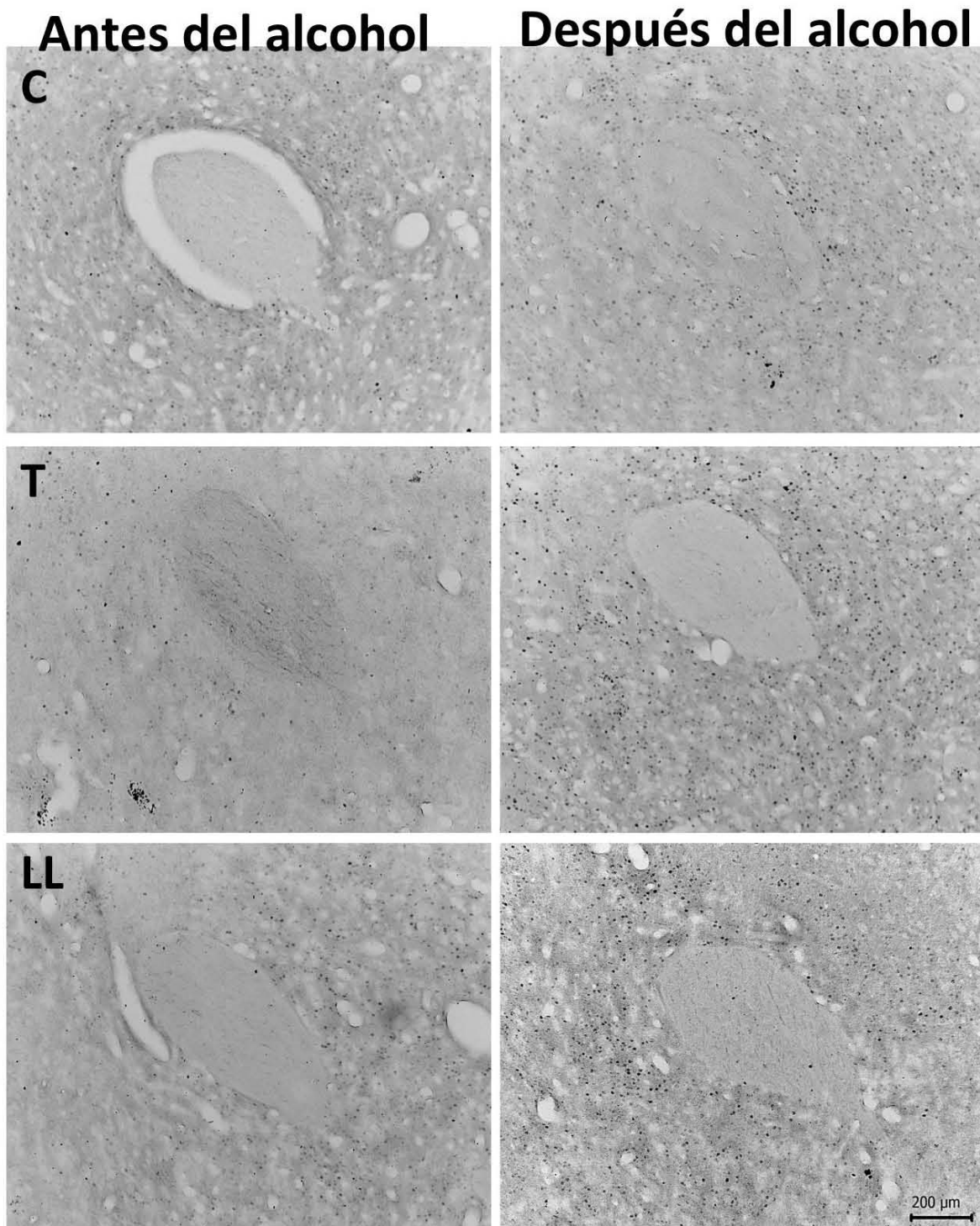


Figura 31. Fotografías representativas del número de células positivas a Δ fosB antes vs después del consumo de alcohol en el núcleo accumbens core. Arriba grupo control (C), centro grupo trabajador (T) y abajo grupo luz constante (LL).

Núcleo accumbens *shell*

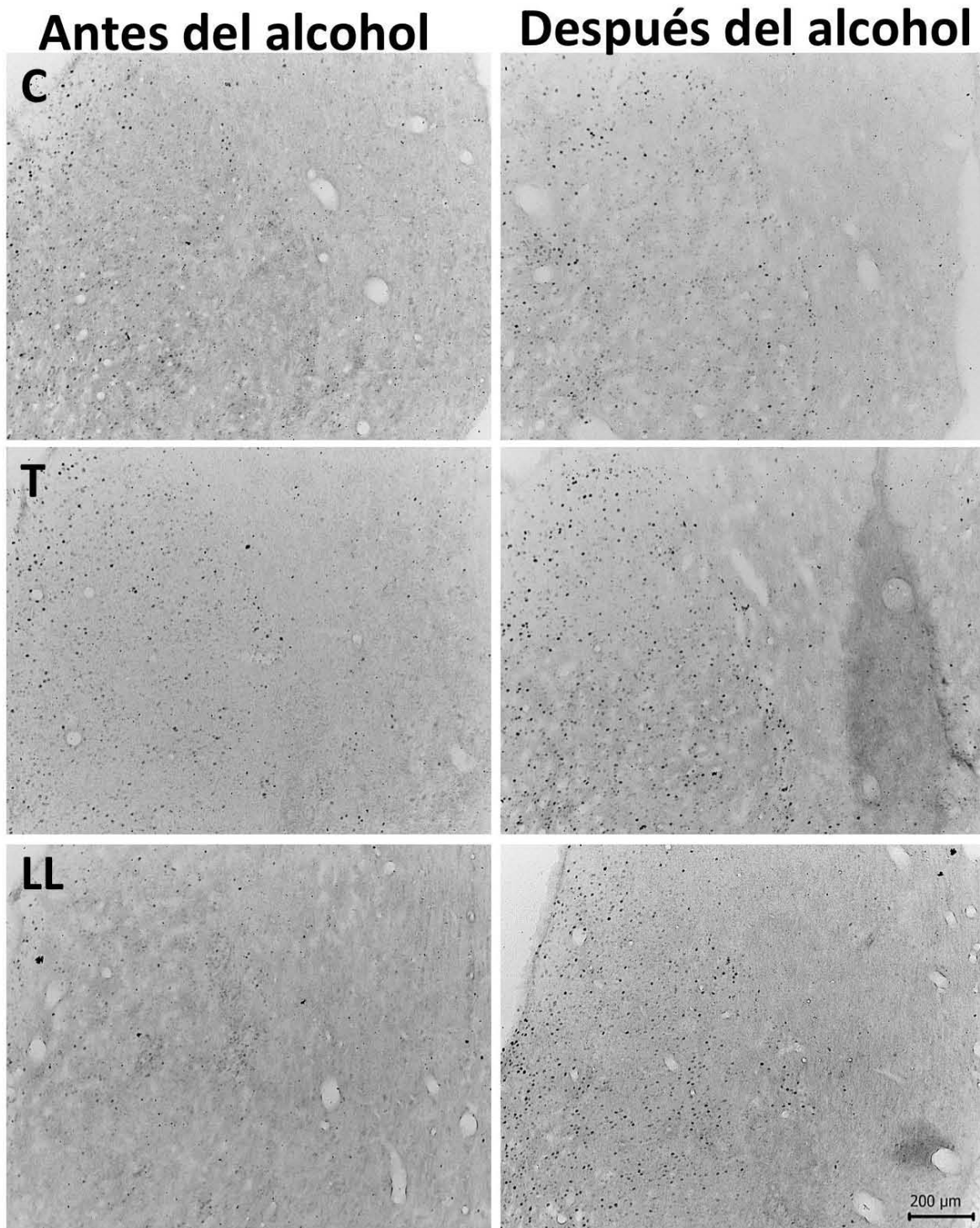


Figura 32. Fotografías representativas del número de células positivas a Δ fosB antes vs después del consumo de alcohol en el núcleo accumbens *shell*. Arriba grupo control (C), centro grupo trabajador (T) y abajo grupo luz constante (LL).

Para el núcleo supraquiasmático el grupo C presento un incremento en la activación de Δ fosB tras el periodo de exposición a alcohol, la cual fue mayor que la del grupo LL. Para los grupos T y LL no hubo diferencias entre el periodo previo y el de exposición a alcohol (Figuras 33 y 34). Se obtuvieron diferencias significativas antes vs después del consumo [$F_{(1, 21)} = 8.000$ * $p=0.01$]. El análisis indicó además diferencias significativas entre grupos [$F_{(2, 21)} = 63.68$ * $p < 0.0001$]. En la prueba *post hoc* se observaron diferencias significativas antes vs después del consumo en el grupo C (* $p= 0.05$); asimismo, entre grupos, se observaron diferencias significativas entre el grupo C y el grupo LL después del consumo de alcohol (* $p= 0.05$).

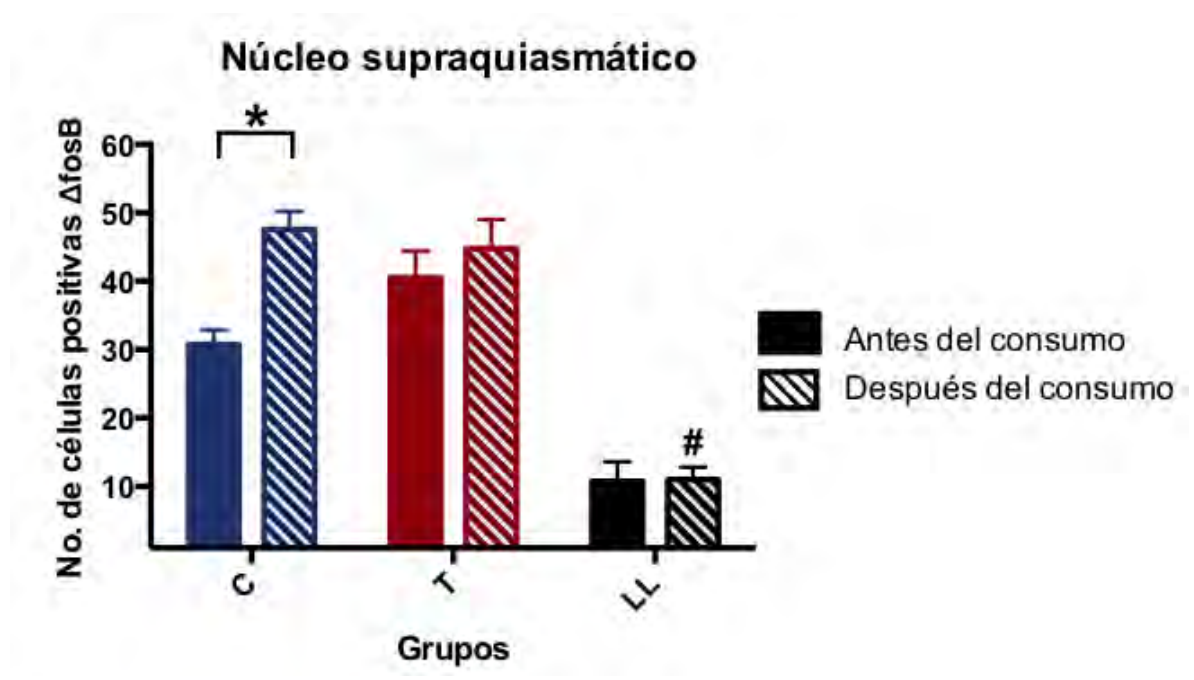


Figura 33. Número de células positivas a Δ fosB Núcleo supraquiasmático. Se encontraron diferencias significativas antes vs después del consumo de alcohol en el grupo C (ANOVA de dos vías: * $p=0.01$) asimismo se encontraron diferencias significativas entre grupos después del consumo de alcohol (ANOVA de dos vías: * $p < 0.0001$). El * indica una diferencia significativa entre antes y con consumo de alcohol. El # indica una diferencia significativa tras el consumo de alcohol respecto al control.

Núcleo supraquiasmático

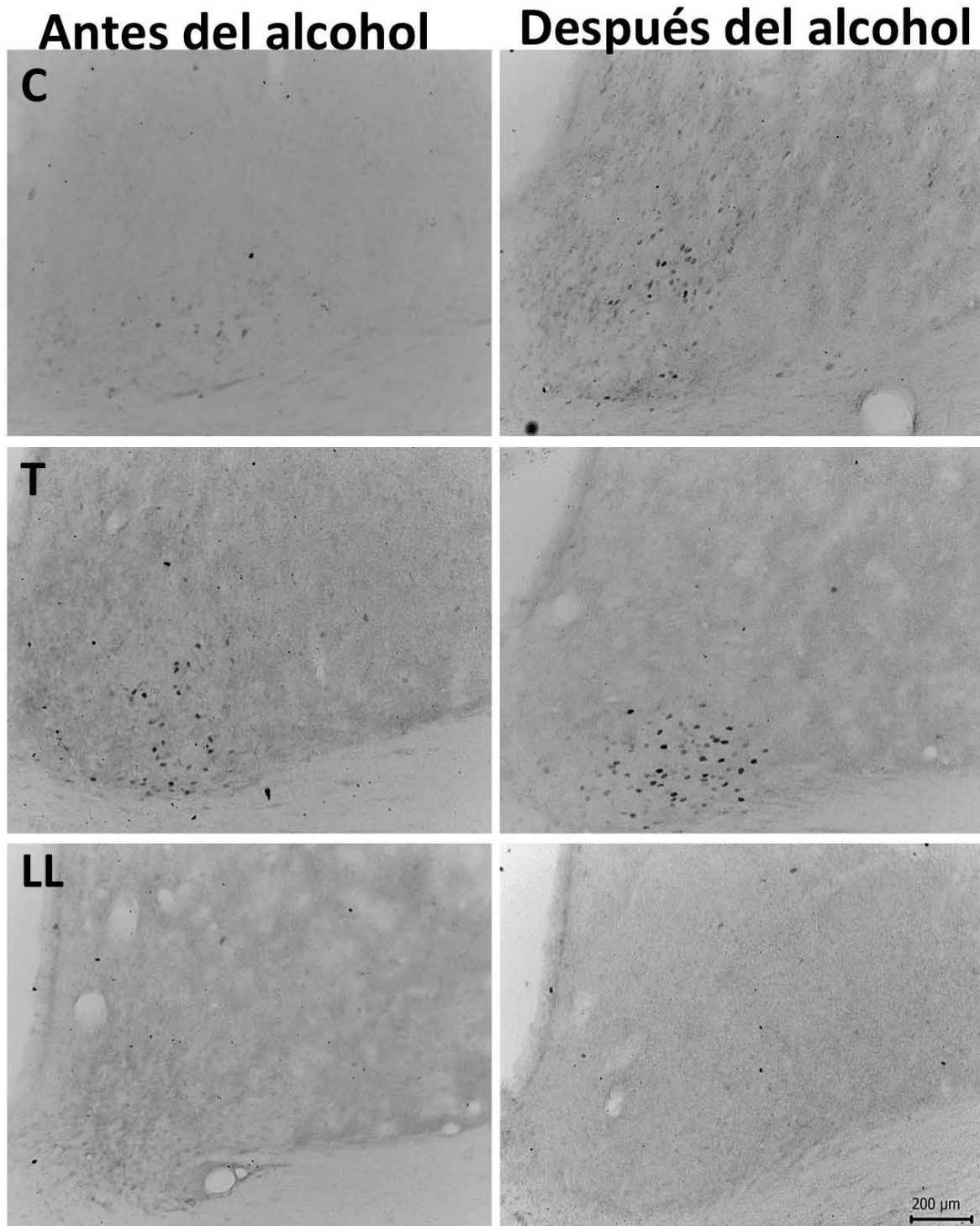


Figura 34 Fotografías representativas del número de células positivas a Δ fosB antes vs después del consumo de alcohol en el núcleo supraquiasmático. Arriba grupo control (C), centro grupo trabajador (T) y abajo grupo luz constante (LL).

DISCUSIÓN

En este estudio se examinó el efecto de la interrupción circadiana sobre el consumo de alcohol utilizando dos modelos distintos, uno de trabajador nocturno y otro de luz constante.

Previo al consumo de alcohol

Evaluación conductual

En la primera parte del estudio se corroboró que los modelos usados generaran interrupción circadiana. De acuerdo a los actogramas y el análisis del promedio de actividad obtenidos, se constató que el grupo control y el del modelo de trabajador nocturno estaban sincronizadas al ciclo luz–oscuridad, mostrando mayor actividad durante la fase oscura. Estos resultados se oponen a los obtenidos por Salgado-Delgado *et al.*, 2008, que reporta una disminución progresiva de la actividad nocturna y una igualación de los porcentajes de actividad diurna y nocturna en un grupo trabajador.

Las diferencias observadas entre ambos trabajos podrían deberse al tiempo de exposición a la rueda, ya que, en este estudio, el promedio de actividad previo al consumo de alcohol se obtuvo a partir del segundo y tercer fin de semana de exposición, momento en el que Salgado-Delgado y col. Reportan que aún se presenta un ritmo de actividad nocturna. Sin embargo, el promedio de actividad con consumo de alcohol se obtuvo a partir del quinto y sexto fin de semana de exposición a la rueda, en este momento ya no debería presentarse ritmo según Salgado-Delgado y col quienes reportan que bajo este modelo se pierde el ritmo de actividad partir del cuarto fin de semana.

De acuerdo a lo anterior una diferencia importante entre ambos estudios fue la exposición a alcohol. Para imitar las condiciones de trabajo humano, en donde regularmente se tiene prohibido el consumo de alcohol, este se colocó durante 16 horas y no *ad libitum* entre semana, esto pudo haber causado que las ratas recibieran una señal temporal al recibir el alcohol y cuando este era retirado, que evitó el desarrollo de desincronización a nivel conductual.

En contraste, para las ratas del grupo de luz constante se corroboró el desarrollo de un patrón de actividad arrítmico caracterizado por tener intervalos de actividad y reposo a lo largo del día, como ya había sido reportado por Tapia *et.al.* 2013. Se

observó que se desarrollan periodos ultradianos de actividad a lo largo de las 24 horas; además de observarse una disminución de actividad en comparación con los grupos control y trabajador que presentan un número mayor de cuentas normalizadas en el perfil de actividad.

La disrupción circadiana ocasiona una pérdida del ritmo día-noche de PER1

El estado de sincronización de los controles se confirmó con la medición de la proteína PER1 que mostró diferencias entre día y noche en todas las estructuras, como se había descrito previamente por Ángeles-Castellanos *et al.*, 2007

En el grupo de trabajo nocturno la corteza infralímbica, la ínsula y el NSQ mostraron diferencias día-noche en PER1, pero las dos regiones del accumbens perdieron este patrón. Abe *et al.*, 2002 reporta la pérdida de ritmo en el núcleo accumbens *in vitro* tras la exposición a un ciclo 18:6; Sin embargo, en estudios *in vivo* se observan patrones de activación rítmica en ésta área (Baltazar *et al.*, 2013) aún con modificaciones circadianas, como la restricción de alimento a la fase de reposo (Ángeles- Castellanos *et al.*, 2007). Esto indica que la ritmicidad de PER1 en el núcleo accumbens es dependiente de la actividad del núcleo supraquiasmático, por lo que lo observado para este modelo podría apuntar a que existen alteraciones o anomalías en la señal de salida del núcleo supraquiasmático hacia el núcleo accumbens, ocasionando así, la pérdida de ritmo de PER1 para ésta área, sugiriendo el desarrollo de desincronización circadiana interna.

Es relevante mencionar que el núcleo accumbens es un área clave en la integración de respuestas de recompensa, debido a ello los resultados de este trabajo podrían ser de importancia, ya que sugieren la existencia de una relación entre la expresión circadiana de genes reloj con procesos de recompensa, lo cual lleva a la posibilidad de que una disrupción circadiana incremente el riesgo de desarrollar dependencia a alcohol y otras drogas (Logan *et al.*, 2014).

Con respecto al NSQ, se ha documentado, que su actividad permanece acoplada al ciclo luz oscuridad, aun al modificar señales como la hora de llegada de la comida, el acceso restringido a una rueda de ejercicio o la administración de metanfetaminas (Ijima *et al.*, 2002; Dallmann & Mrosovsky, 2006; Castillo *et al.*, 2011; Mukherji *et al.*, 2015). A su vez, Salgado *et al.*, 2010 sugieren que existen

ciertas regiones cerebrales que se desacoplan más fácilmente de las señales del núcleo supraquiasmático tras una perturbación debido a su naturaleza o a su función, mientras que otras se encuentran más fuertemente vinculadas con el ciclo de luz oscuridad, como se observó en la corteza infralímbica y en la corteza insular en donde se mantuvo el ritmo día-noche de PER1, lo que sugiere que el ritmo de estas áreas se sincroniza principalmente por el ciclo luz-oscuridad acoplándose a la actividad del NSQ.

Contrastando con los dos grupos anteriores en el grupo de luz constante se observó una pérdida de ritmo de PER1 en la corteza infralímbica, la corteza insular, el núcleo accumbens *core* y el núcleo supraquiasmático, lo cual es consistente con la pérdida de ritmicidad observada en el registro conductual. Se sabe que el NSQ es sincronizado principalmente por el ciclo luz-oscuridad; y se ha reportado que al modificarse las condiciones de este ciclo se modifica también la ritmicidad del reloj maestro, alterando así, las señales que emite hacia el resto del cerebro para regular diversos patrones de actividad y metabólicos (Chiesa *et al.*, 2010; Grone *et al.*, 2011; Tapia-Osorio *et al.*, 2013).

Los datos reunidos en conjunto con la literatura citada indican que se dio un proceso de disrupción circadiana previa al consumo de alcohol estableciéndose una desincronización interna para el grupo trabajador y arritmicidad circadiana para el grupo de luz constante, mientras que el grupo control mantuvo un ritmo circadiano normal.

Consumo de alcohol

Una vez establecida la desincronización o arritmicidad circadiana se administró y evaluó el consumo de alcohol al 10% para los tres grupos.

En estudios previos se ha reportado un periodo mayor a tres semanas de administración de alcohol incluyendo un adiestramiento para inducir su consumo (Macenski & Shelton, 2001; Simms *et al.*, 2008; Carnicella *et al.*, 2014). Sin embargo, en este estudio se demostró que el tiempo de acceso a alcohol (12 días) fue suficiente para encontrar diferencias significativas en el consumo de ratas expuestas a trabajo forzado ya que consumieron cantidades mayores de alcohol en comparación con las ratas en condiciones control durante la administración repetida.

Por otro lado, no hubieron diferencias en el consumo entre el grupo de luz constante y el control, lo que corresponde con lo observado por estudios previos en ratas y hámsteres (Goodwin *et al.*, 1999; Hammer *et al.*, 2010) en los cuales se reporta que la exposición a luz constante no incrementa e incluso disminuye el consumo de alcohol con respecto a un grupo control durante una administración crónica.

En poblaciones humanas se ha reportado que el trabajo nocturno no incrementa el consumo diario de alcohol (Dorrian & Skinner, 2012; Dorrian *et al.*, 2015). Sin embargo, se reporta que los trabajadores nocturnos incrementan el consumo de en periodos cortos de tiempo en forma de atracón, además de incrementar la frecuencia de esta forma de consumo con el objeto de poder dormir (Morikawa *et al.*, 2012). En contraste con lo anterior, los resultados de este estudio indican que sí se incrementa el consumo repetido de alcohol en el modelo de trabajador nocturno utilizado, las diferencias podrían deberse principalmente a que los datos obtenidos son experimentales, mientras que en poblaciones humanas los datos son clínicos, sobre lo cual afecta, entre otras cosas, el contexto regional y cultural al modificar el consumo de alcohol.

En el presente trabajo se evaluó también el consumo de alcohol durante una prueba de atracón mediante un paradigma de libre elección entre agua y alcohol al 10%, durante la cual tanto el grupo de trabajo nocturno como el de luz constante consumieron una cantidad significativamente mayor de alcohol que el grupo control.

Se ha reportado en ratas que el consumo de 1.12 +/- 0.25 g/kg lleva a niveles de alcohol en sangre de 0.015g/dL; mientras que 1.7 +/- 0.5 g/kg alcanza niveles de alcohol en sangre de 0.1g/dL (Smith *et al.*, 2008; Gilpin *et al.*, 2012). El consumo de atracón (*binge*) es definido por el National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) como un patrón de consumo en el que se alcanza una concentración de alcohol en la sangre de 0.08g/dL durante dos horas o menos (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, 2004).

Ya que el consumo del grupo trabajador y el de luz constante durante esta prueba se encuentra dentro del rango reportado por los estudios mencionados, se deduce que se presentó un consumo de atracón en estos animales.

Resulta interesante para el grupo de luz constante, que haya consumido cantidades similares de alcohol que el grupo control durante la administración repetida; y en cambio, una cantidad mayor durante la prueba de atracón. Esto indica que el periodo de abstinencia jugo un papel importante en el incremento de consumo de alcohol para éste grupo y también para el grupo trabajador. Con respecto a esto, el efecto de la abstinencia ha sido previamente estudiado y, se sugiere que provoca recaídas con un consumo exacerbado (Bell *et al.*, 2008; Vanderlinden *et al.*, 2014; Vengeliene *et al.*, 2014); además de modificaciones estructurales a nivel cerebral en áreas involucradas en el consumo de alcohol, las cuales contribuyen al desarrollo de dependencia al mismo (Lebedev *et al.*, 2008; Meinhardt *et al.*, 2013; Uys *et al.*, 2016).

Durante la prueba, se registró también el consumo de agua, en el que no se encontraron diferencias; sin embargo, el grupo control presentó la tendencia a un mayor consumo, lo cual es consistente con su bajo consumo de alcohol, ocurriendo lo contrario en los grupos que presentaron desincronización o arritmicidad circadiana.

De esta manera, los resultados que se reportan para los grupos de trabajo nocturno y de luz constante podrían indicar la presencia de una conducta compulsiva al consumo de alcohol tras un periodo de abstinencia, la cual se relaciona con el desarrollo de dependencia a este. Esto concuerda con lo reportado por otros autores que describen que el consumo tipo atracón suele presentarse como un factor de riesgo en el desarrollo de la dependencia al alcohol (Smith, J. E., *et al.*, 2008; Crabbe *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2015).

Respuesta neuronal al consumo de alcohol

Posterior al consumo de alcohol, se evaluó la respuesta neuronal mediante dos marcadores de actividad, c-Fos y Δ fosB para observar el efecto del consumo en diferentes áreas cerebrales de cada uno de los tres grupos. Se comparó también la respuesta antes vs después del consumo de alcohol.

La respuesta de c-Fos a una administración aguda de alcohol varía de acuerdo al área y a la condición circadiana

Después de la ingesta de alcohol durante la prueba de atracón el grupo control presentó un aumento de células positivas a c-Fos en la corteza infralímbica y en el

núcleo supraquiasmático, mientras que, en la corteza insular, núcleo accumbens *core* y *shell* no se observaron diferencias. De manera similar, en el grupo trabajador no se obtuvieron diferencias; sin embargo, para este grupo no las hubo en ninguna de las áreas estudiadas; además, el número de células positivas a c-Fos después el consumo de alcohol fue menor con respecto al grupo control en la corteza infralímbica, corteza insular, núcleo accumbens *shell* y núcleo supraquiasmático.

En contraste con los grupos ya mencionados, en el grupo de luz constante, se obtuvieron diferencias significativas en todas las áreas, a excepción del núcleo supraquiasmático, estos animales presentaron un aumento en el número de células positivas a c-Fos con respecto a antes del consumo; además, también presentaron un número mayor de células positivas con respecto al grupo control posterior al consumo de alcohol.

Es preciso mencionar que el núcleo supraquiasmático no se vio afectado por el consumo de alcohol en el grupo de trabajo nocturno ni en el de luz constante; pero sí, en el grupo control. Puesto que en este grupo se registró un consumo de alcohol bajo en comparación con los demás grupos (no considerado como atracón según lo ya mencionado) el efecto observado podría deberse a la actividad del núcleo a partir del ciclo luz-oscuridad y posiblemente no haya una respuesta clara al alcohol.

Los resultados mencionados parecen relacionar de manera inversa a las condiciones de iluminación con el efecto a nivel cerebral de la ingesta aguda de alcohol; ya que para ambos grupos en los que se mantuvo un ciclo 12:12 (C y T) la ingesta aguda de alcohol no ocasionó un efecto para la mayoría o para ninguna de las áreas respectivamente, aún con el desarrollo de desincronización circadiana interna por parte del grupo trabajador, mientras que, de manera contraria, en el grupo expuesto a luz constante se observaron diferencias para cuatro de cinco áreas.

Aunado a lo anterior, lo observado para los grupos control y trabajador podría deberse a que la respuesta de c-Fos es transitoria y se ha descrito que tras una administración aguda de alcohol, es inducido una hora después y se mantiene alrededor de cuatro; sin embargo, esta respuesta varía en duración e intensidad para diferentes áreas; además, es dosis dependiente, por lo que diferentes

patrones de consumo resultan en diferentes patrones de activación (Chang *et al.*, 1995; Bachtell *et al.*, 1999; Crankshaw *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2016).

El consumo de alcohol modula la acumulación de Δ fosB sugiriendo la aproximación a un proceso de plasticidad neuronal

La acumulación de esta proteína se considera un factor de plasticidad neuronal y su presencia se ha asociado a cambios de aprendizaje y/o cambios plásticos que ocurren en un área ocasionados por alcohol y otras drogas. Por ello se decidió identificar posibles cambios en la presencia de esta proteína dada por el consumo de alcohol.

En la corteza infralímbica, en el grupo control y el grupo de luz constante se observó un incremento en el número de células positivas después el consumo de alcohol, mientras que en el grupo de trabajo nocturno los niveles permanecieron bajos. En estudios previos se ha relacionado a la corteza infralímbica con un control inhibitorio sobre la búsqueda de alcohol, función que se reduce al desarrollar dependencia al mismo, especialmente luego de periodos de abstinencia y recaída (Meinhardt *et al.*, 2013; Meinhardt *et al.*, 2015; Pfarr *et al.*, 2015).

En ese sentido, ya que el grupo control consumió menos alcohol durante el protocolo de administración, la activación observada podría indicar que en este grupo la corteza infralímbica está ejerciendo este papel inhibitorio en la búsqueda de alcohol. Por otro lado, los datos del grupo trabajador podrían indicar una alteración en la función protectora de esta área ante el alcohol.

Para el grupo de luz constante, a pesar de presentarse un incremento en la activación después del consumo, el nivel de respuesta de este marcador fue menor que la del grupo control, lo que se relaciona con los datos de consumo ya que se observó una conducta compulsiva a éste durante la prueba de atracón. En conjunto estos resultados sugieren un proceso de alteración en la función protectora de esta área.

La corteza insular al recibir proyecciones de la corteza prefrontal medial y codificar señales interoceptivas que pueden promover un comportamiento aversivo se relaciona también con un control ante la búsqueda de drogas incluido el alcohol (Naqvi & Bechara, 2010; Seif *et al.*, 2013; Droutman *et al.*, 2015). Esto indica que

para esta área podría ocurrir algo similar a lo observado en la corteza infralímbica, y ejercer un papel inhibitorio a la búsqueda de alcohol en el grupo control ya que fue el único con un incremento en la cantidad de Δ fosB posterior al tratamiento indicado.

El núcleo accumbens es una región crucial implicada en la integración de respuestas de recompensa y se ha reportado previamente un incremento de Δ fosB en este núcleo ante drogas incluido el alcohol (McDaid *et al.*, 2006; Perrotti *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010). En este estudio se encontró un efecto similar al reportado en la literatura, en el que después de un consumo repetido de alcohol se mostraron niveles altos de este marcador.

En el núcleo accumbens *core*, asociado con respuestas anticipatorias y el componente “desear querer” de la motivación (Di Chiara, 2002) se observó un incremento significativo en la activación ante el consumo de alcohol en todos los grupos. Esto indica que los tres grupos presentaron una respuesta motivacional por el consumo de alcohol; además, de sugerir que podría presentarse un proceso de plasticidad neuronal. Sin embargo, la activación fue mayor para el grupo trabajador, lo cual coincide con el mayor consumo durante el protocolo de administración repetida y durante la prueba de atracón. Los resultados sugieren que los efectos de recompensa fueron mayores para este grupo.

En contraste con lo anterior, en el núcleo accumbens *shell*, relacionado con la respuesta rápidas a un estímulo y el componente “gustar” o hedónico (Di Chiara, 2002; Peciña, 2008) se reportaron diferencias significativas como respuesta al consumo para el grupo trabajador y de luz constante, y no para el grupo control. Esto se contrapone con lo observado en esta área para c-Fos ya que no se modificó la respuesta ni en el grupo control ni en el grupo trabajador, pero sí en el de luz constante.

Respecto a esta subregión del núcleo, ya que Δ fosB se relaciona más con una acumulación durante periodos de administración repetida y c-Fos con respuestas agudas ante un estímulo, además de que la actividad *shell* se relaciona con respuestas rápidas a un estímulo dado, los resultados de c-Fos podrían ser más adecuados para determinar una respuesta hedónica; por lo que se infiere que solo el grupo de luz constante obtuvo una respuesta hedónica ante el consumo de

alcohol debido a que fue el único que presentó una diferencia en el número de células positivas a c-Fos antes vs después del consumo.

Los datos para ambas subregiones del núcleo accumbens sugieren que para los grupos con una disrupción circadiana la ingesta de alcohol generó una recompensa motivacional ante el consumo, mientras que para el grupo control se desarrolló la respuesta motivacional, aunque menor que el del grupo trabajador, y no una respuesta hedónica.

Para el núcleo supraquiasmático los resultados corresponden a lo observado para c-Fos ya que solo el control presento diferencias como respuesta al consumo de alcohol. El que no haya diferencias en la activación de Δ fosB en los grupos trabajador y luz constante podría deberse al estado de disrupción, más que al efecto del alcohol sobre esta región. Por otro lado, se conoce poco de cuál pudiera ser la función que cubra el Δ fosB en el NSQ.

Con respecto a lo anterior y para resumir la respuesta neuronal tras el consumo de alcohol, las diferencias reportadas en el presente trabajo entre ambos marcadores, se puede deber a que lo observado con c-Fos corresponde a un efecto agudo de la prueba de atracción, pero ya que su respuesta es área y dosis dependiente, la n utilizada debería ampliarse para la obtención de resultados más robustos. Por otro lado, para la relación inversa sugerida entre la iluminación y el efecto del consumo agudo, será importante el realizar pruebas con otras técnicas con las que se ha reportado una respuesta al consumo agudo de alcohol, como las utilizadas por (Leriche & Méndez, 2017), para poder establecerla de manera más concreta.

En cuando a la estabilidad de Δ fosB, lo que se observa corresponde a una acumulación de este marcador durante la administración repetida, la abstinencia y la posterior prueba de atracción. Ha sido bien establecido que Δ fosB incrementa su activación ante este tipo de administraciones, relacionándose así con procesos de plasticidad neuronal, la cual está asociada al desarrollo de dependencia a drogas (Perrotti *et al.*, 2008 Li *et al.*, 2010; Ozburn *et al.*, 2012; Brenhouse, & Stellar, 2006). Del mismo modo que para c-Fos, será de importancia estudiar lo que ocurre con otras técnicas (Stragier *et al.*, 2015; Uys *et al.*, 2016) que permitan observar la aproximación a procesos de plasticidad neuronal dada por consumo de alcohol.

CONCLUSIONES

En este estudio se muestra que la desincronización circadiana interna por un modelo de trabajo nocturno aumenta el consumo de alcohol tanto de manera voluntaria durante una administración repetida, como en una prueba de atracón. Por otro lado, la arritmicidad circadiana por luz constante solo incrementa el consumo de alcohol en una prueba de atracón después de un periodo de abstinencia.

El consumo agudo de alcohol tuvo un efecto diferencial entre áreas y grupos en la respuesta de c-Fos.

La conducta del consumo de alcohol se correlacionó con la acumulación de Δ fosB en las diferentes áreas de estudio de acuerdo a lo que se ha reportado previamente ante el consumo de alcohol, sugiriendo una aproximación a un proceso de plasticidad neuronal.

Se puede concluir que un proceso de desincronización interna o de arritmicidad circadiana potencializan diferencialmente los efectos obtenidos a partir del consumo de alcohol (ej. recompensa), facilitando con ello, un proceso de plasticidad neuronal, la cual puede contribuir al desarrollo de dependencia al mismo.

El hallazgo más importante de este trabajo, es que los resultados sugieren que las personas que trabajan de noche o que están expuestas a luz constante, podrían ser propensas a consumir alcohol y desarrollar una conducta compulsiva a al consumo (atracción); el cual, al presentarse de manera cotidiana contribuye al desarrollo de dependencia. Es necesario concientizar a la población sobre los riesgos que provocan las alteraciones en el sistema circadiano sobre el desarrollo de dependencia al alcohol y otras drogas.

REFERENCIAS

- Adinoff, B. (2004). Neurobiologic processes in drug reward and addiction. *Harvard Review of Psychiatry*, 12(6), 305–20. <https://doi.org/10.1080/10673220490910844>
- Ángeles-Castellanos, M., Mendoza, J., & Escobar, C. (2007). Restricted feeding schedules phase shift daily rhythms of c-Fos and protein Per1 immunoreactivity in corticolimbic regions in rats. *Neuroscience*, 144(1), 344–355. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.08.064>
- Ángeles-Castellanos, M., Salgado-Delgado, R. C., & Escobar, C. (2007). Anatomía de un reloj (anatomía del sistema circadiano) *Arch Mex Anat Nueva Epoca* 2(1) 15-10.
- Arias-Carrión, O., Stamelou, M., Murillo-Rodríguez, E., Menéndez-González, M., & Pöppel, E. (2010). Dopaminergic reward system: a short integrative review. *International Archives of Medicine*, 3, 24. <https://doi.org/10.1186/1755-7682-3-24>
- Asher, G., & Schibler, U. (2011). Crosstalk between components of circadian and metabolic cycles in mammals. *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.01.006>
- Bachtell, R. K., Wang, Y. M., Freeman, P., Risinger, F. O., & Ryabinin, A. E. (1999). Alcohol drinking produces brain region-selective changes in expression of inducible transcription factors. *Brain Research*, 847(2), 157–165. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02019-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02019-3)
- Baltazar, R. M., Coolen, L. M., & Webb, I. C. (2013). Diurnal rhythms in neural activation in the mesolimbic reward system: Critical role of the medial prefrontal cortex. *European Journal of Neuroscience*, 38(2), 2319–2327. <https://doi.org/10.1111/ejn.12224>
- Bayard, M., McIntyre, J., Hill, K. R., & Woodside, J. (2004). Alcohol Withdrawal Syndrome. *American Family Physician*. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agr020>
- Bell-Pedersen, D., Cassone, V. M., Earnest, D. J., Golden, S. S., Hardin, P. E., Thomas, T. L., & Zoran, M. J. (2005). Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nature Reviews. Genetics*, 6(7), 544–56. <https://doi.org/10.1038/nrg1633>
- Bell, R. L., Rodd, Z. A., Schultz, J. A., Peper, C. L., Lumeng, L., Murphy, J. M., & McBride, W. J. (2008). Effects of short deprivation and re-exposure intervals on the ethanol drinking behavior of selectively bred high alcohol-consuming rats. *Alcohol*, 42(5), 407–416. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2008.03.130>

- Buttgereit, F., Smolen, J. S., Coogan, A. N., & Cajochen, C. (2015). Clocking in: chronobiology in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*, *advance on*.
- Carnicella, S., Ron, D., & Barak, S. (2014). Intermittent ethanol access schedule in rats as a preclinical model of alcohol abuse. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, *48*(3), 243–252. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.01.006>
- Castillo, C., Molyneux, P., Carlson, R., & Harrington, M. E. (2011). Restricted wheel access following a light cycle inversion slows re-entrainment without internal desynchrony as measured in Per2 Luc mice. *Neuroscience*, *182*, 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.02.003>
- Chang, S. L., Patel, N. A., & Romero, A. A. (1995). Activation and desensitization of Fos immunoreactivity in the rat brain following ethanol administration. *Brain Research*, *679*(1), 89–98. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00210-H](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00210-H)
- Chiesa, J. J., Cambras, T., Carpentieri, A. R., & Díez-Noguera, A. (2010). Arrhythmic rats after SCN lesions and constant light differ in short time scale regulation of locomotor activity. *Journal of Biological Rhythms*, *25*(1), 37–46. <https://doi.org/10.1177/0748730409352843>
- Clapp, P., Bhave, S. V., & Hoffman, P. L. (2008). How adaptation of the brain to alcohol leads to dependence: a pharmacological perspective. *Alcohol Research & Health : The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, *31*(4), 310–39. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20729980> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2923844>
- Clark, J. W., Fixaris, M. C., Belanger, G. V., & Rosenwasser, A. M. (2007). Repeated light-dark phase shifts modulate voluntary ethanol intake in male and female high alcohol-drinking (HAD1) rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *31*(10), 1699–1706. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2007.00476.x>
- Crabbe, J. C., Harris, R. A., & Koob, G. F. (2011). Preclinical studies of alcohol binge drinking. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1216*(1), 24–40. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05895.x>
- Crankshaw, D. L., Briggs, J. E., Olszewski, P. K., Shi, Q., Grace, M. K., Billington, C. J., & Levine, A. S. (2003). Effects of intracerebroventricular ethanol on ingestive behavior and induction of c-Fos immunoreactivity in selected brain regions. In *Physiology and Behavior* (Vol. 79, pp. 113–120). [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(03\)00111-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(03)00111-2)
- Dallmann, R., & Mrosovsky, N. (2006). Scheduled wheel access during daytime: A method for studying conflicting zeitgebers. *Physiology and Behavior*, *88*(4–5), 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.04.022>

- Di Chiara, G. (2002). Nucleus accumbens shell and core dopamine: Differential role in behavior and addiction. *Behavioural Brain Research*, 137(1–2), 75–114. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00286-3](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00286-3)
- Dorrian, J., Heath, G., Sargent, C., Banks, S., & Coates, A. (2015). Alcohol use in shiftworkers. *Accident Analysis and Prevention*. <https://doi.org/10.1016/j.aap.2015.11.011>
- Dorrian, J., & Skinner, N. (2012). Alcohol consumption patterns of shiftworkers compared with dayworkers. *Chronobiol Int*, 29(5), 610–8. <https://doi.org/10.3109/07420528.2012.675848>
- Droutman, V., Read, S. J., & Bechara, A. (2015). Revisiting the role of the insula in addiction. *Trends in Cognitive Sciences*, 19(7), 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2015.05.005>
- Falcón, E., & McClung, C. A. (2009). A role for the circadian genes in drug addiction. *Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.06.054>
- Filipski, E., Subramanian, P., Carrière, J., Guettier, C., Barbason, H., & Lévi, F. (2009). Circadian disruption accelerates liver carcinogenesis in mice. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 680(1–2), 95–105. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.10.002>
- Fonken, L. K., Finy, M. S., Walton, J. C., Weil, Z. M., Workman, J. L., Ross, J., & Nelson, R. J. (2009). Influence of light at night on murine anxiety- and depressive-like responses. *Behavioural Brain Research*, 205(2), 349–354. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.07.001>
- Fonken, L. K., & Nelson, R. J. (2014). The effects of light at night on circadian clocks and metabolism. *Endocrine Reviews*. <https://doi.org/10.1210/er.2013-1051>
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(43), 18664–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1008734107>
- Gamsby, J. J., & Gulick, D. (2015). Chronic shifts in the length and phase of the light cycle increase intermittent alcohol drinking in C57BL/6J mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9, 9. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00009>
- Gamsby, J. J., Templeton, E. L., Bonvini, L. A., Wang, W., Loros, J. J., Dunlap, J. C., Gulick, D. (2013). The circadian *Per1* and *Per2* genes influence alcohol intake, reinforcement, and blood alcohol levels. *Behavioural Brain Research*,

249, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.04.016>

- Gilpin, N. W., Karanikas, C. A., & Richardson, H. N. (2012). Adolescent binge drinking leads to changes in alcohol drinking, anxiety, and amygdalar corticotropin releasing factor cells in adulthood in male rats. *PLoS ONE*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031466>
- Gilpin, N. W., & Koob, G. F. (2008). Neurobiology of alcohol dependence: focus on motivational mechanisms. *Alcohol Research & Health: The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, 31(3), 185–95. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>. Secreted
- Golombek, D. A., Bussi, I. L., & Agostino, P. V. (2014). Minutes, days and years: molecular interactions among different scales of biological timing. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1637), 20120465. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0465>
- Goodwin, F. L. W., Amir, S., & Amit, Z. (1999). Environmental lighting has a selective influence on ethanol intake in rats. *Physiology and Behavior*, 66(2), 323–328. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(98\)00302-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(98)00302-3)
- Grone, B., Chang, D., Bourgin, P., Cao, V., Fernald, R., Heller, H., & Ruby, N. (2011). Acute light exposure suppresses circadian rhythms in clock gene expression. *Journal of Biological Rhythms*, 26(1), 78–81. <https://doi.org/10.1177/0748730410388404>
- Grueter, B. A., Robison, A. J., Neve, R. L., Nestler, E. J., & Malenka, R. C. (2013). Δ FosB differentially modulates nucleus accumbens direct and indirect pathway function. *Pnas*, 110(5), 1923–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221742110>
- Guerrero-Vargas, N. N., Guzmán-Ruiz, M., Fuentes, R., García, J., Salgado-Delgado, R., Basualdo, M. del C., ... Buijs, R. M. (2015). Shift Work in Rats Results in Increased Inflammatory Response after Lipopolysaccharide Administration: A Role for Food Consumption. *Journal of Biological Rhythms*, 30(4), 318–30. <https://doi.org/10.1177/0748730415586482>
- Hammer, S. B., Ruby, C. L., Brager, A. J., Prosser, R. A., & Glass, J. D. (2010). Environmental modulation of alcohol intake in hamsters: Effects of wheel running and constant light exposure. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 34(9), 1651–1658. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2010.01251.x>
- Hoffman, P.L. (2003) NMDA receptors in alcoholism. *International Review of Neurobiology* 56:35–82, . PMID: 14696310

- Hurtado, A. U., León, M. L., Gonzales, L., León, A., De Armas, J., & Rodriguez, G. (2014). Bases neurobiológicas de la adicción al alcohol Neurobiological Basis of Alcohol Addiction. *Revista Finlay*, 4, 40–53.
- Iijima, M., Nikaido, T., Akiyama, M., Moriya, T., & Shibata, S. (2002). Methamphetamine-induced, suprachiasmatic nucleus-independent circadian rhythms of activity and *mPer* gene expression in the striatum of the mouse. *European Journal of Neuroscience*, 16(5), 921–929. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02140.x>
- Lebedev, A. A., Droblenkov, A. V., & Shabanov, P. D. (2008). Structural Changes in Mesocorticolimbic Dopaminergic System of the Brain during Long-Term Alcoholization in Rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 146(6), 816–819. <https://doi.org/10.1007/s10517-009-0414-5>
- Lee, K.-W., Kim, Y., Kim, A. M., Helmin, K., Nairn, A. C., & Greengard, P. (2006). Cocaine-induced dendritic spine formation in D1 and D2 dopamine receptor-containing medium spiny neurons in nucleus accumbens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(9), 3399–404. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511244103>
- Lee, K. M., Coehlo, M., McGregor, H. A., Waltermire, R. S., & Szumlinski, K. K. (2015). Binge alcohol drinking elicits persistent negative affect in mice. *Behavioural Brain Research*, 291, 385–398. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.05.055>
- Leriché, M., & Méndez, M. (2017). Ethanol exposure selectively alters μ -endorphin content but not [3 H]-DAMGO binding in discrete regions of the rat brain. *Neuropeptides*, 44(1), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2009.11.009>
- Li, J., Cheng, Y., Bian, W., Liu, X., Zhang, C., & Ye, J. H. (2010). Region-specific induction of FosB by voluntary alcohol intake: Effects of naltrexone. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 34(10), 1742–1750. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2010.01261.x>
- Logan, R. W., Williams, W. P., & McClung, C. A. (2014). Circadian rhythms and addiction: Mechanistic insights and future directions. *Behavioral Neuroscience*, 128(3), 387–412. <https://doi.org/10.1037/a0036268>
- Macenski, M. J., & Shelton, K. L. (2001). Self-administered ethanol as a discriminative stimulus in rats. *Drug and Alcohol Dependence*, 64(2), 243–247. [https://doi.org/10.1016/S0376-8716\(00\)00238-6](https://doi.org/10.1016/S0376-8716(00)00238-6)
- McClung, C. A. (2007). Circadian rhythms, the mesolimbic dopaminergic circuit, and drug addiction. *The Scientific World Journal*, 7(S2), 194–202. <https://doi.org/10.1100/tsw.2007.213>

- McDaid, J., Graham, M. P., & Napier, T. C. (2006). Methamphetamine-induced sensitization differentially alters pCREB and DeltaFosB throughout the limbic circuit of the mammalian brain. *Molecular Pharmacology*, 70(6), 2064–74. <https://doi.org/10.1124/mol.106.023051>
- Meinhardt, M. W., Hansson, A. C., Perreau-Lenz, S., Bauder-Wenz, C., Stahlin, O., Heilig, M., ... Sommer, W. H. (2013). Rescue of infralimbic mGluR2 deficit restores control over drug-seeking behavior in alcohol dependence. *J Neurosci*, 33(7), 2794–2806. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4062-12.2013>
- Meinhardt, M. W., Sévin, D. C., Klee, M. L., Dieter, S., Sauer, U., & Sommer, W. H. (2015). The neurometabolic fingerprint of excessive alcohol drinking. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 40(5), 1259–68. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.312>
- Monk, T. H. (2010). Enhancing Circadian Zeitgebers. *Sleep*, 33(4), 421–422.
- Mukherji, A., Kobiita, A., Damara, M., Misra, N., Meziane, H., Champy, M.-F., & Chambon, P. (2015). Shifting eating to the circadian rest phase misaligns the peripheral clocks with the master SCN clock and leads to a metabolic syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(48), E6691–E6698. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519807112>
- Naqvi, N. H., & Bechara, A. (2010). The insula and drug addiction: an interoceptive view of pleasure, urges, and decision-making. *Brain Structure and Function*, pp. 1–16. <https://doi.org/10.1007/s00429-010-0268-7>
- National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. (2004). NIAAA Council Approves Definition of Binge Drinking. *NIAAA Newsletter*, 3:3.
- Navara, K. J., & Nelson, R. J. (2007). The dark side of light at night: Physiological, epidemiological, and ecological consequences. *Journal of Pineal Research*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2007.00473.x>
- Ozburn, A. R., Mayfield, R. D., Ponomarev, I., Jones, T. A., Blednov, Y. A., & Harris, R. A. (2012). Chronic self-administration of alcohol results in elevated Δ FosB: comparison of hybrid mice with distinct drinking patterns. *BMC Neuroscience*, 13(1), 130. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-13-130>
- Panda, S., Hogenesch, J. B., & Kay, S. A. (2002). Circadian rhythms from flies to human. *Nature*, 417(6886), 329–335. <https://doi.org/10.1038/417329a>
- Peciña, S. (2008). Opioid reward “liking” and “wanting” in the nucleus accumbens. *Physiology and Behavior*, 94(5), 675–680. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.04.006>

- Penev, P. D., Kolker, D. E., Zee, P. C., & Turek, F. W. (1998). Chronic circadian desynchronization decreases the survival of animals with cardiomyopathic heart disease. *The American Journal of Physiology*, *275*(6 Pt 2), H2334-7. <https://doi.org/10.1017/S0016756897007061>
- Perrotti, L. I., Bolaños, C. A., Choi, K. H., Russo, S. J., Edwards, S., Ulery, P. G., ... Barrot, M. (2005). DeltaFosB accumulates in a GABAergic cell population in the posterior tail of the ventral tegmental area after psychostimulant treatment. *Eur J Neurosci*, *21*. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04110.x>
- Perrotti, L. I., Weaver, R. R., Robison, B., Renthal, W., Maze, I., Yazdani, S., ... Nestler, E. J. (2008). Distinct patterns of FosB induction in brain by drugs of abuse. *Synapse*, *62*(5), 358–369. <https://doi.org/10.1002/syn.20500>
- Pfarr, S., Meinhardt, M. W., Klee, M. L., Hansson, A. C., Vengeliene, V., Schonig, K., ... Sommer, W. H. (2015). Losing Control: Excessive Alcohol Seeking after Selective Inactivation of Cue-Responsive Neurons in the Infralimbic Cortex. *J Neurosci*, *35*(30), 10750–10761. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0684-15.2015>
- Planeta, C. S. (2013). Animal models of alcohol and drug dependence. *Revista Brasileira de Psiquiatria (S. o Paulo, Brazil : 1999)*, *35 Suppl 2*(SUPPL.2), S140-6. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1149>
- Popovich, I. G., Zabezhinski, M. A., Panchenko, A. V, Piskunova, T. S., Semenchenko, A. V, Tyndyk, M. L., ... Anisimov, V. N. (2013). Exposure to light at night accelerates aging and spontaneous uterine carcinogenesis in female 129/Sv mice. *Cell Cycle*, *12*(11), 1785–1790. <https://doi.org/10.4161/cc.24879>
- Rosenwasser, A. M. (2015). Chronobiology of ethanol: Animal models. *Alcohol*, *49*(4), 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2015.04.001>
- Ruffle, J. K. (2014). Molecular neurobiology of addiction: what's all the (Δ)FosB about? *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse*, *40*(6), 428–437. <https://doi.org/10.3109/00952990.2014.933840>
- Sabino, V., Kwak, J., Rice, K. C., & Cottone, P. (2013). Pharmacological Characterization of the 20% Alcohol Intermittent Access Model in Sardinian Alcohol-Preferring Rats: A Model of Binge-Like Drinking. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *37*(4), 635–643. <https://doi.org/10.1111/acer.12008>
- Salgado-Delgado, R., Ángeles-Castellanos, M., Buijs, M. R., & Escobar, C. (2008). Internal desynchronization in a model of night-work by forced activity in rats. *Neuroscience*, *154*(3), 922–931. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.03.066>

- Salgado- Delgado, R. C., Pardo, B. F., & Briones, C. E. (2009). La desincronización interna como promotora de enfermedad y problemas de conducta. *Salud Mental*, 32(1), 69–76.
- Salgado-Delgado, R., Angeles-Castellanos, M., Saderi, N., Buijs, R. M., & Escobar, C. (2010). Food intake during the normal activity phase prevents obesity and circadian desynchrony in a rat model of night work. *Endocrinology*, 151(3), 1019–1029. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0864>
- Salgado-Delgado, R., Nadia, S., Angeles-Castellanos, M., Buijs, R. M., & Escobar, C. (2010). In a rat model of night work, activity during the normal resting phase produces desynchrony in the hypothalamus. *Journal of Biological Rhythms*, 25(6), 421–431. <https://doi.org/10.1177/0748730410383403>
- Salgado-Delgado, R. C., Saderi, N., Basualdo, M. del C., Guerrero-Vargas, N. N., Escobar, C., & Buijs, R. M. (2013). Shift Work or Food Intake during the Rest Phase Promotes Metabolic Disruption and Desynchrony of Liver Genes in Male Rats. *PLoS ONE*, 8(4), e60052. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060052>
- Seif, T., Chang, S.-J., Simms, J. A., Gibb, S. L., Dadgar, J., Chen, B. T., ... Hopf, F. W. (2013). Cortical activation of accumbens hyperpolarization-active NMDARs mediates aversion-resistant alcohol intake. *Nature Neuroscience*, 16(8), 1094–1100. <https://doi.org/10.1038/nn.3445>
- Sharma, V. K., & Chandrashekar, M. K. (2005). Zeitgebers (time cues) for biological clocks. *Current Science*.
- Simms, J. A., Steensland, P., Medina, B., Abernathy, K. E., Chandler, L. J., Wise, R., & Bartlett, S. E. (2008). Intermittent access to 20% ethanol induces high ethanol consumption in Long-Evans and Wistar rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 32(10), 1816–1823. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00753.x>
- Smith, J. E., Co, C., McIntosh, S., & Cunningham, C. C. (2008). Chronic binge-like moderate ethanol drinking in rats results in widespread decreases in brain serotonin, dopamine, and norepinephrine turnover rates reversed by ethanol intake. *Journal of Neurochemistry*, 105(6), 2134–2155. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05296.x>
- Smith, M. L., Li, J., Cote, D. M., & Ryabinin, A. E. (2016). Effects of isoflurane and ethanol administration on c-Fos immunoreactivity in mice. *Neuroscience*, 316, 337–343. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.12.047>

- Spanagel, R., Pendyala, G., Abarca, C., Zghoul, T., Sanchis-Segura, C., Magnone, M. C., ... Albrecht, U. (2005). The clock gene *Per2* influences the glutamatergic system and modulates alcohol consumption. *Nature Medicine*, *11*(1), 35–42. <https://doi.org/10.1038/nm1163>
- Stragier, E., Martin, V., Davenas, E., Poilbout, C., Mongeau, R., Corradetti, R., & Lanfumey, L. (2015). Brain plasticity and cognitive functions after ethanol consumption in C57BL/6J mice. *Translational Psychiatry*, *5*(12), e696. <https://doi.org/10.1038/tp.2015.183>
- Tapia-Osorio, A., Salgado-Delgado, R., Angeles-Castellanos, M., & Escobar, C. (2013). Disruption of circadian rhythms due to chronic constant light leads to depressive and anxiety-like behaviors in the rat. *Behavioural Brain Research*, *252*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.05.028>
- Uys, J. D., McGuier, N. S., Gass, J. T., Griffin, W. C., Ball, L. E., & Mulholland, P. J. (2016). Chronic intermittent ethanol exposure and withdrawal leads to adaptations in nucleus accumbens core postsynaptic density proteome and dendritic spines. *Addiction Biology*, *21*(3), 560–574. <https://doi.org/10.1111/adb.12238>
- Vanderlinden, L. A., Saba, L. M., Printz, M. P., Flodman, P., Koob, G., Richardson, H. N., ... Tabakoff, B. (2014). Is the Alcohol Deprivation Effect Genetically Mediated? Studies with HXB/BXH Recombinant Inbred Rat Strains. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *38*(7), 2148–2157. <https://doi.org/10.1111/acer.12471>
- Vengeliene, V., Bilbao, A., & Spanagel, R. (2014). The alcohol deprivation effect model for studying relapse behavior: A comparison between rats and mice. *Alcohol*. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.03.002>
- Voigt, R. M., Forsyth, C. B., & Keshavarzian, A. (2013). Circadian Disruption: Potential Implications in Inflammatory and Metabolic Diseases Associated With Alcohol. *Alcohol Research : Current Reviews*, *35*(1), 87–96.
- World Health Organisation. (2014). Global status report on alcohol and health 2014. *Global Status Report on Alcohol*, 1–392. https://doi.org/entity/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/index.html
- Xiang, S., Dauchy, R. T., Hauch, A., Mao, L., Yuan, L., Wren, M. A., Hill, S. M. (2015). Doxorubicin Resistance in Breast Cancer is Driven by Light at Night Induced Disruption of the Circadian Melatonin Signal. *Journal of Pineal Research*, *59*(1), 60–69. <https://doi.org/10.1111/jpi.12239>