



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Efecto de la ingesta crónica de alcohol sobre la actividad locomotriz circadiana y el perfil diario de la manifestación de ansiedad en el ratón C57-BL6”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE:

Bióloga

P R E S E N T A:

DIANA BUZO ZARZOSA



DIRECTOR DE TESIS:
DR. MANUEL MIRANDA ANAYA

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Buzo

Zarzosa

Diana

54 85 64 36

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

303736754

2. Datos del tutor

Dr.

Manuel

Miranda

Anaya

3. Datos del sinodal 1

Dr.

René de Jesús

Cárdenas

Vázquez

4. Datos del sinodal 2

M. en C.

Agustín

Carmona

Castro

5. Datos del sinodal 3

M. en C.

Enrique

Moreno

Sáenz

6. Datos del sinodal 4

Biól.

Vania Patricia

Carmona

Alcocer

7. Datos del trabajo escrito

Efecto de la ingesta crónica de alcohol sobre la actividad locomotriz circadiana y el perfil diario de la manifestación de ansiedad en el ratón C57-BL6

p.40

2010

1. Datos del alumno

Buzo

Zarzosa

Diana

54 85 64 36

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

303736754

2. Datos del asesor

Miranda

Anaya

Manuel

3. Datos de la tesis

Efecto de la ingesta crónica de alcohol sobre la actividad locomotriz circadiana y el perfil diario de la manifestación de ansiedad en el ratón C57-BL6

p. 40

2010

Agradecimientos

A mi tutor el Dr. Manuel Miranda, por haberse cruzado en mi carrera, ya que puedo apostar que ningún otro en toda la UNAM me hubiera aguantado dos años.

A mis sinodales por tomarse el tiempo de leer esta tesis, disfrutando unos ricos chocolates; y enriquecerla con sus comentarios.

A mis amigos por haber desarrollado la capacidad de ignorarme cuando nada me puede callar.

Y a mi familia que por no haberme pasado sus trauma y fijaciones, no sería quien soy hoy.

Y a mi hermana Paula por leer y corregir una tesis de la cual no entendió nada.

PD. los quiero a todos!!!!

Índice

I.	Resumen	3
II.	Introducción	4
	A. <i>Ritmos Biológicos</i>	4
	1. <i>Características generales de los Ritmos Circadianos</i>	5
	1.1 <i>Libre curso, compensación de la temperatura y sincronización</i>	5
	1.2 <i>Sistema Circadiano</i>	7
	B. <i>La importancia de la cronobiología en la salud</i>	9
	C. <i>Alcoholismo, Ansiedad y sus relaciones con los Ritmos Circadianos</i>	10
	1. <i>Alcoholismo</i>	11
	2. <i>Ansiedad</i>	12
	D. <i>Efecto de la administración de alcohol en los ritmos circadianos</i>	12
	A. <i>El ratón C57/BL6 como modelo de estudios biomédicos</i>	13
III.	Antecedentes	15
	A. <i>La cepa C57/BL6 como modelo para el estudio de ansiedad mediante la prueba de enterramiento de canicas “Marble Burying Test” (MBT)</i>	15
	B. <i>Efectos del alcohol sobre los niveles de locomoción en el ratón C57/BL6</i>	15
IV.	Justificación	19
V.	Hipótesis	19
VI.	Objetivos	20
	A. <i>Objetivo General</i>	20
	B. <i>Objetivos Particulares</i>	20
VII.	Materiales y Métodos	21
	A. <i>Ingesta Crónica de Alcohol</i>	21
	B. <i>Registro de actividad (Locomoción)</i>	22

	<i>C. Marble Burying Test (MBT)</i>	22
	<i>D. Análisis de datos</i>	23
VIII.	Resultados	24
	<i>A. Ingesta de EtOH</i>	25
	<i>B. Marble Burying Test (MBT)</i>	25
	<i>C. Registro de Actividad</i>	26
IX.	Discusión	31
X.	Conclusiones	36
XI.	Referencias	37
	<i>A. Bibliografía</i>	37
	<i>B. Sitios Web</i>	40

I. RESUMEN

La ingesta de alcohol induce cambios conductuales; la administración de etanol incrementa la ansiedad en roedores, especialmente en el ratón C57/BL6. Sin embargo, se desconoce cuál es la relación directa de los efectos del etanol sobre la actividad locomotriz y la conducta de ansiedad. El propósito de este trabajo es estudiar si existe un perfil diario de ansiedad en el ratón C57/BL6 y conocer los efectos que producen diferentes dosis de etanol (7% y 15%) sobre el perfil nictemeral de ansiedad y actividad locomotriz. Treinta ratones machos C57/BL6 de 60 días de edad fueron utilizados para este trabajo, siendo cada uno su propio control.

A los animales se les proporcionó una solución de etanol diluida en agua a un 7% durante 6 días; al séptimo día los ratones se sometieron a la prueba MBT. Posteriormente se les administró agua por una semana, y se les dio por 6 días más una solución de agua y alcohol al 15%, finalizando con la prueba MBT. Los ratones fueron sometidos a la prueba de enterramiento de canicas mejor conocida por sus siglas en inglés MBT (Marble Burying Test); dicha prueba se llevó a cabo en dos etapas: primero se realizó una única prueba de enterramiento de canicas entre las 12:00 y 13:00 horas, antes y después del registro de actividad locomotriz en libre curso. Este registro de actividad se realizó durante cada ingesta de etanol y agua por un mínimo de tres días consecutivos. Posteriormente la MBT se evaluó cada 4 horas durante un periodo de 24 horas en un ciclo L:D (12:12). La locomoción se registró por medio de la interrupción de sensores infrarrojos cada 10 minutos; estos datos se recolectaron y analizaron con el programa ActiView (Minimitter). Con ayuda del programa para PC Cosinor se realizó el análisis de los datos obtenidos de las pruebas MBT.

Los resultados indican, en una primera etapa, que los ratones presentan diferentes niveles de ansiedad de acuerdo a la dosis administrada. En una segunda etapa se pudo observar que tras ingerir agua (controles) se presenta un perfil diario de ansiedad con una acrofase durante la noche (4.14 h con un porcentaje de ritmicidad de 48.43). La actividad locomotriz de este grupo se tomó como un 100%. Los animales, tras ser administrados con una solución de etanol y agua al 7%, registraron una actividad del 79.36%, un perfil diario de MBT mostrándose una acrofase de 8h y una ritmicidad de 44.40%, observándose así un retraso en la fase. Finalmente, cuando los ratones fueron administrados con un 15% de etanol en el agua, se observó una actividad del 59.49% y la ritmicidad abolida.

Las conclusiones de este trabajo son: la manifestación de la conducta de ansiedad presenta un perfil diario. La ingesta crónica de alcohol (15%), elimina la ritmicidad del perfil diario de la manifestación de ansiedad y el registro de actividad fue más espontáneo bajo dosis bajas de alcohol, mientras que, a dosis altas, los inicios e inmovilidades presentan mayor duración y se muestran más estabilidad de fase.

II. INTRODUCCIÓN

A. *Ritmos Biológicos*

Todos los organismos vivos perciben el paso del tiempo e incluso son capaces de medirlo; ésta es una respuesta ante los cambios cíclicos que se dan en el medio ambiente (días, noches, estaciones, mareas). Estos fenómenos cíclicos afectan directa o indirectamente variables biológicas, de manera que los seres vivos han desarrollado a lo largo del tiempo procesos periódicos que comprenden funciones biológicas vitales.

La gran mayoría de las variables bioquímicas, fisiológicas y de comportamiento presentan periodicidad o ritmicidad; ésta es una característica que se ha visto en los seres vivos y se le conoce como ritmo biológico.

Los ritmos biológicos son la recurrencia de un fenómeno biológico en intervalos de tiempo regulares (Aschoff,1981); éstos suelen variar en su duración (segundos o minutos), o en longitud (meses o años). Los ritmos biológicos forman parte de una adaptación al entorno del organismo, la cual resulta fundamental para la supervivencia de las especies; permiten predecir aquellos cambios externos (disponibilidad de alimento, depredación, etapas de apareamiento, migración, etc.) y así preparar al organismo para poderse anticipar y aprovechar mejor dichos cambios.

Los ritmos biológicos se pueden clasificar de acuerdo con: *a)* su frecuencia, *b)* el tipo de proceso que genera el ritmo, *c)* la función que lleva a cabo el ritmo y *d)* el sistema biológico en el cual está siendo observado (Aschoff, 1981). Según el origen y su relación con los ritmos geofísicos, los ritmos biológicos se clasifican en ritmos geofísico dependientes y ritmos no geofísicos dependientes. La clasificación más utilizada es de acuerdo con su frecuencia (con referencia a un ciclo de 24 horas):

Circadianos.- Son ritmos relacionados a los ciclos geofísicos cuyo periodo es cercano a 24 horas y su nombre proviene del prefijo ***circa***= cercano y ***dian***= día; como ejemplo tenemos el ciclo de sueño-vigilia el cual está directamente relacionado con el fotoperiodo (día y noche).

Infradianos.- Son aquellos ritmos de menor frecuencia que los circadianos, es decir, cuyo periodo es mayor a 29 horas; en otras palabras, requieren de más de un día para completarse. Los ciclos infradianos están estrechamente relacionados con los ciclos geofísicos estacionales, como ejemplo tenemos la hibernación y la migración, entre otros.

Ultradianos.- Estos ritmos no están asociados con ciclos geofísicos ya que son ciclos que ocurren en un periodo menor a 19 horas y dependen de adaptaciones fisiológicas; suelen estar ligados a fenómenos de la regulación metabólica (a excepción de los circadianos).

Aunque la clasificación anterior es la más utilizada, existen muchas otras clasificaciones de los ritmos biológicos. Por ejemplo, los circalunares (con duraciones cercanas a los ciclos lunares), los circamareales (relacionados a la duración de las mareas) y los circaanuales (aquellos ritmos que se presentan en un periodo cercano a uno o más años), por mencionar algunos.

1. Características Generales de los Ritmos Circadianos

Los ritmos en los seres vivos pueden ser endógenos o exógenos. Si el ritmo se origina a partir de un fenómeno ambiental cíclico, el ritmo se considera exógeno; por otro lado, aquellos ritmos producidos por el organismo son denominados endógenos, por lo que presentan bases genéticas.

1.1 Libre curso, compensación de la temperatura y sincronización

Los ritmos circadianos son los más estudiados debido al valor de su periodo (τ) cercano a 24 horas. Estos ritmos presentan tres características básicas: son endógenos, es decir, permanecen en condiciones constantes de temperatura y luminosidad en libre curso, mantienen un periodo cercano a 24 horas; compensan el periodo ante los cambios de temperatura (manteniendo un valor de $Q_{10}=1$); y además pueden ser sincronizados a diversos factores ambientales "Zeitgeber" (del alemán,

significa dador de tiempo), lo cual da como consecuencia que el periodo del ritmo sea igual al del ciclo ambiental.

Es importante aclarar que no es lo mismo hablar de los ritmos biológicos, que hablar del reloj biológico. Los ritmos biológicos se refieren a la actividad biológica observada en condiciones constantes con un periodo cercano al ciclo ambiental que la sincroniza, mientras que el reloj biológico es la estructura (oscilador marcapasos) que indica el momento en el cuál se debe iniciar uno o varios procesos del organismo (DeCoursey, 2004).

Existen cuatro parámetros principales (figura 1, Gruart, *et al* 2002) para definir y estudiar un ritmo biológico: 1) *periodo o frecuencia* (τ) que es determinado por la duración o número de veces en que ocurre el fenómeno durante un intervalo de tiempo, respectivamente; 2) *amplitud*, definida como la magnitud de la variación y se determina del valor máximo o cresta al valor mínimo o valle del ciclo; 3) *fase* (ϕ), que es el momento en el que ocurre un evento específico dentro del ciclo y al evento que es seleccionado se le conoce como marcador de fase; 4) *mesor*, el promedio de todos los valores observados dentro del ciclo. A la etapa de actividad dentro del ciclo que se localiza por arriba del 50% de la amplitud se le conoce como alpha (α) mientras que a la de reposo; por debajo del 50% de la amplitud, se le denomina rho (ρ).

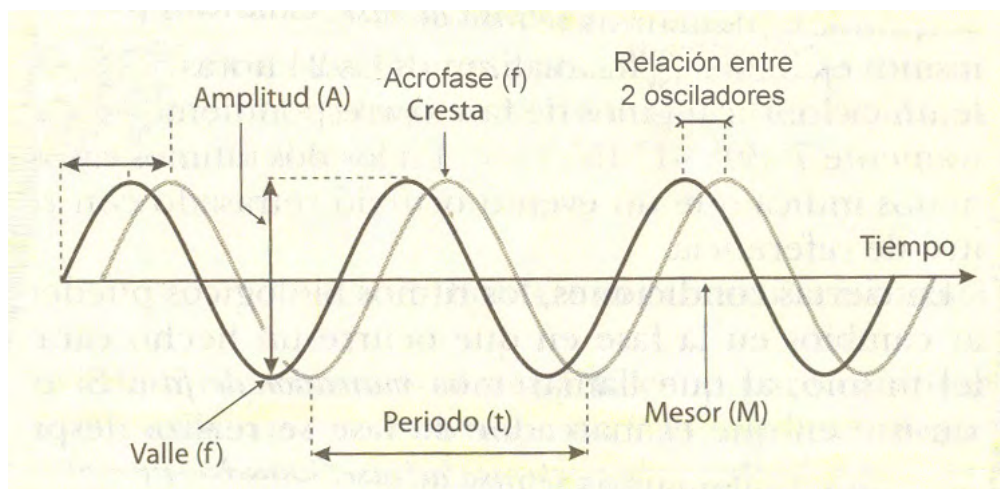


Figura 1. Parámetros principales que se encuentran dentro de un ritmo biológico

1.2 Sistema Circadiano

El reloj circadiano es regulado por un sistema fisiológico presente en todos los organismos. Este sistema se conforma de tres partes fundamentales: los osciladores y marcapasos, cuya característica principal es el poder mantener una ritmicidad en la ausencia de señales ambientales; las vías de entrada, que llevan la información recibida de las señales ambientales (Zeitgeber) hacia el marcapasos; y las vías de salida, que se encargan de llevar las respuestas generadas por las señales al organismo (figura 2, Goldman, 1999).

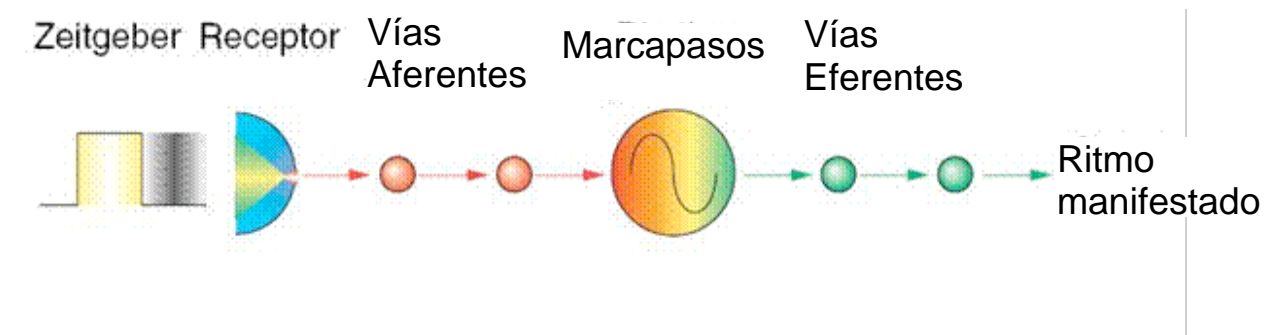


Figura 2. Representación general del funcionamiento del reloj biológico.

En el caso de los mamíferos, el marcapasos central del reloj biológico es el núcleo supraquiasmático (NSQ), el cual recibe su nombre por su ubicación (figura 3, Dunlap, *et al*, 2004; Purves, *etal*, 2008) dentro del cerebro (porción ventral del hipotálamo anterior, ventro lateral al receso óptico del tercer ventrículo y dorsal al quiasma óptico).

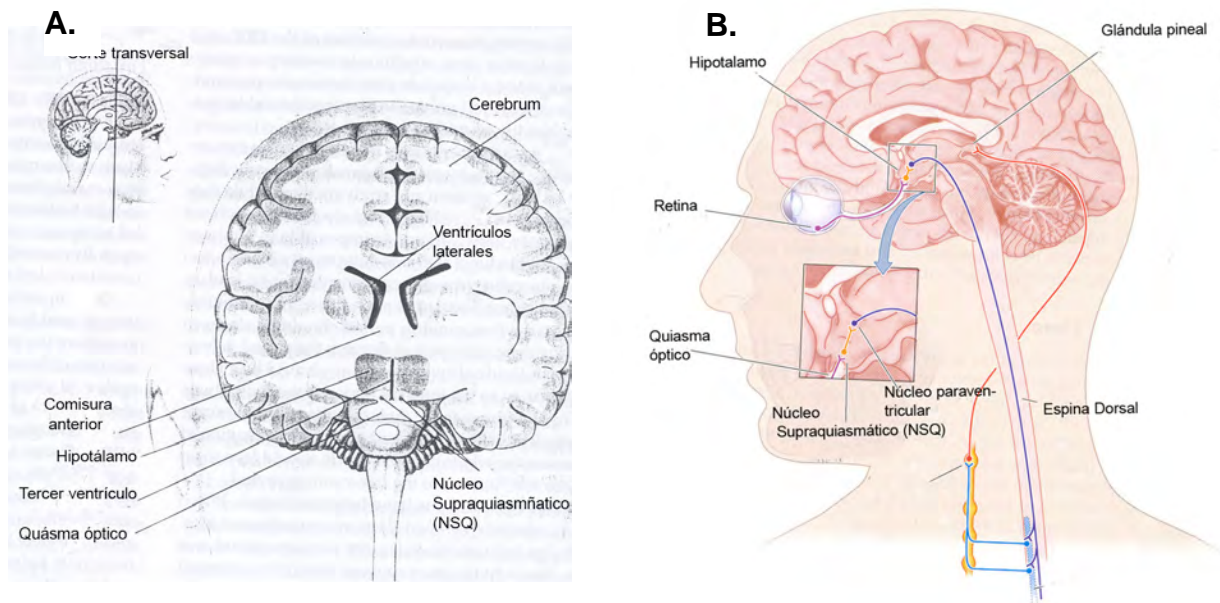


Figura 3. Localización del núcleo supraquiasmático. A. corte transversal. B. corte longitudinal

Este “oscilador maestro” se comunica con una serie de osciladores periféricos en el organismo, para así poder responder a las alteraciones cíclicas del ambiente de una forma organizada y rítmica (Buijs *et al.* 1996).

El NSQ es una estructura pareada de forma ovoide que, en el caso del humano, contiene alrededor de 16,000 pequeñas neuronas de entre 8 y 12 μ m de diámetro. Compactadas y distribuidas en dos poblaciones, estas neuronas expresan diversas sustancias neuroactivas caracterizadas por la presencia de vasopresina y el péptido intestinal vasoactivo (VIP). Además, la mayoría de las neuronas sintetizan ácido gama amino butírico (GABA) (Aguilar Robledo *et al.*, 2004).

La información luminosa que es recibida por la retina, es traducida por las células ganglionares W y enviada al NSQ. Múltiples modalidades median las señales de salida del NSQ, incluyendo eferencia en tractos nerviosos y señales humorales; sus respuestas actúan sobre otros núcleos hipotalámicos así como en la glándula pineal, la formación reticular y la hipófisis (Martini y Nath, 2009; DeCoursey, 2004). Una de las interacciones eferentes más importantes del NSQ es con la glándula pineal, cuya

principal hormona de secreción es la melatonina, encargada de controlar varios ritmos como el del sueño y la reproducción en animales (Hill *et al*, 2004).

B. La importancia de la Cronobiología en la salud

La Cronobiología es la rama de la Biología que se encarga del estudio de los ritmos biológicos, abarcando aspectos moleculares, ecológicos y conductuales. Actualmente, la Cronobiología se ha convertido en una herramienta importante para el estudio y tratamiento de la salud, debido a que los ritmos circadianos modulan diferentes procesos fisiológicos y conductuales (Sansiviens, 1989).

Los seres vivos son sistemas variables; en el caso del ser humano, el momento del día y la duración de la administración de un fármaco tienen gran influencia sobre la absorción, metabolismo, duración del efecto y toxicidad del mismo. A partir de esto, la Cronobiología busca y entiende dichos sistemas para poder brindar a las ciencias de la salud una mejora en la medicina personalizada.

Un estímulo o tratamiento que afecta a cualquiera de los componentes del reloj biológico, puede alterar la expresión de los ritmos circadianos en general. Incluso aquellos estímulos que actúan directamente a nivel fisiológico pueden generar a largo plazo una alteración en el reloj. Sin embargo, la modulación circadiana de los efectos de diferentes fármacos no es aún bien conocida. Se han observado variaciones circadianas en la eficacia de diferentes drogas y sustancias. La Cronobiología se encarga de entender estos procesos, estableciendo ramas dedicadas a áreas específicas como la Cronopatología (enfocada a diferentes patologías, principalmente a nivel de sistema nervioso), Cronofarmacología (estudio de la forma y el tiempo en que los fármacos afectan a los ritmos biológicos), Crononutrición (basada en la alimentación en función de la secreción rítmica de enzimas) y Cronocinética o Cronofarmacocinética (estudia las variaciones predecibles en el tiempo, rítmicas, según su hora de administración, respecto a la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de las drogas) (Ayala, *et al*, 2004; Caeiro, *et al*, 2004, Landoni, 2003).

C. Alcoholismo, Ansiedad y sus relaciones con los Ritmos Circadianos

1. Alcoholismo

El alcohol es la sustancia psicoactiva de mayor abuso por el hombre después de la cafeína; el consumo excesivo de alcohol conlleva a la actividad de un desorden mental conocido como síndrome de dependencia al alcohol o alcoholismo.

El alcoholismo es una enfermedad crónica; un trastorno de la conducta caracterizado por la ingestión repetida de bebidas alcohólicas, hasta el punto que interfiere con la salud y las relaciones interpersonales del paciente (Keller, 1960).

El síndrome de dependencia al alcohol (SDA), connota un cierto número de fenómenos clínicos que se encuentran relacionados con una frecuencia suficiente para incluirlos como rasgos de la enfermedad. Las características de la SDA incluyen distintos tipos de cambios de la conducta, subjetivo y psicobiológicos que se caracterizan principalmente por la falta de control sobre la ingesta de la sustancia. El consumo del alcohol facilita el desarrollo de enfermedades como problemas respiratorios, cardiovasculares y gastrointestinales que favorecen la desnutrición, por mencionar algunos (Madden, 1986).

Varios estudios en pacientes alcohólicos, tanto en abstinencia como bebedores frecuentes, han mostrado anomalías en sus ritmos circadianos (a pesar de llevar un cierto tiempo sin beber) como es el caso de avances de fases, cambios en la regulación de temperatura, cambios en el ciclo sueño-vigilia (regulación de melatonina) y cambios en la producción de cortisol (Kodma *et al.* 1988).

Otros aspectos que se ven afectados por el alcoholismo son la dependencia física y el síndrome de abstinencia. La dependencia física implica una adaptación a nivel tisular, por lo que se requiere de la presencia del alcohol para poder mantener la homeostasis o equilibrio del organismo. Esta dependencia se manifiesta mediante la tolerancia y el síndrome de abstinencia. Se distinguen dos tipos de tolerancia: una metabólica, en la que debido a una oxidación más acelerada del alcohol la concentración de este en la

sangre se ve disminuida en el organismo y por ende sus efectos atenuados; y una segunda funcional, que se caracteriza por la necesidad de aumentar la dosis de alcohol para obtener las mismas respuestas actitudinales y neuropsicológicas. Por otro lado, el síndrome de abstinencia se distingue por una serie de cambios fisiológicos que hacen su aparición al interrumpir súbitamente el consumo, y que en el caso del alcohol pueden ser de dos tipos: I) Convulsivo, similar al que tiene lugar en el caso del consumo de barbitúricos; II) Delirium Tremens, que afecta a los alcohólicos que tras un periodo prolongado de consumo llegan a tolerar farmacológicamente el alcohol. Los síntomas del Delirium Tremens, abarcan alucinaciones visuales, y auditivas así como desorientación y temblores generalizados; estos síntomas se manifiestan al interrumpir o disminuir considerablemente el consumo de alcohol (Madden, 1986; Souza y Machorro, 1988).

2. Ansiedad

La ansiedad se define como el estado o trastorno fisiológico de excitación vegetativa, alerta, vigilancia y tensión motora. Es un estado disfórico semejante al miedo cuando no hay ninguna situación que manifieste peligro. Es una situación de aprehensión, anticipación o temor a un posible peligro. Frecuentemente se acompaña de síntomas fisiológicos que pueden conducir a la fatiga o incluso al agotamiento.

Existen distintos trastornos de ansiedad y es fundamental diferenciarlos para así poder dar un diagnóstico apropiado y brindar un tratamiento eficaz. Hay diversos grados de ansiedad, los cuales van desde inquietudes y angustia hasta el pánico, siendo este último la forma más extrema. El límite entre la ansiedad normal y la patológica no puede ser trazado con precisión, ya que es muy común que la gente confunda un momento de ansiedad espontáneo con algo más grave.

Uno de los principales problemas de este estado es que suele aparecer con otro tipo de trastornos, como en el caso de la depresión; al menos tres cuartas partes de los pacientes depresivos se quejan de sentirse ansiosos. Incluso, la ansiedad extrema puede ocurrir en la depresión agitada. Actualmente se ha localizado que dentro de los

diferentes trastornos de depresión existe una fase ansiosa, es decir, en un paciente depresivo a lo largo del día, uno puede localizar un momento en que esta depresión tiende hacia algún estado de ansiedad (Goldman, 1989).

La ansiedad también se observa durante el síndrome de abstinencia en pacientes alcohólicos que presentan *delirium tremens*; debido a las alucinaciones y desorientación que se manifiestan, uno de los efectos suele ser un constante estado ansioso (Souza y Machorro, 1988).

D. Efecto de la administración de alcohol en los ritmos circadianos

Alteraciones en los ritmos circadianos a nivel fisiológico, endocrino y conductual, pueden ser inducidas por la administración aguda de etanol y drogas antidepresivas. La similitud de los efectos vistos en pacientes alcohólicos y depresivos es consistente con la hipótesis de que el retiro paulatino del etanol produce efectos depresivos afectivos en los pacientes y que la ingesta constante de alcohol inhibe y modifica al sistema circadiano (Rosenwasser, 2005).

En experimentos con animales es fácil registrar la actividad en libre curso del ritmo circadiano de actividad locomotriz, así como la actividad registrada bajo condiciones de ciclos luz-oscuridad 12:12. Actualmente existe evidencia de que el periodo de libre curso generado por el marcapasos se ve afectado por factores ambientales (intensidad de la luz, disponibilidad de alimento y temperatura), así como por variables propias del organismo (endocrino, sueño, actividades conductuales). Aún más relevante es el hecho de que el periodo circadiano en libre curso puede ser modulado por diferentes agentes farmacológicos, incluyendo antidepresivos, drogas psicoactivas y alcohol (Baird *et al.*, 1988; Ehlers *et al.*, 2000; Barr 1988; Kakihana y Moore, 1976).

El alcohol es una droga potencialmente adictiva que se caracteriza por ser depresora del sistema nervioso central; actúa principalmente sobre la corteza cerebral y sus funciones inhibitoras. Entre más alta es la concentración de alcohol en la sangre, mayor será el efecto sobre el funcionamiento del organismo, en particular del cerebro. La dependencia involucra numerosos neurotransmisores que se cree deben de estar

alterados durante o después del consumo, los más implicados son el GABA, la dopamina, los opioides y el glutamato y sus respectivos receptores en las células blanco (Rengifo *etal*, 2005).

Tanto en ratas y ratones de laboratorio como en humanos, la administración de alcohol altera la expresión de los ritmos circadianos tanto conductuales como fisiológicos. Estudios en humanos, bajo condiciones normales de sincronización (día-noche), han demostrado que tanto el alcohol como los antidepresivos afectan la fase, amplitud y patrón de los ritmos circadianos. Por otra parte, se ha visto en roedores que la ingesta de alcohol eleva los niveles de liberación de cortisol durante el ciclo REM del sueño, también se ha observado un decremento en la temperatura corporal. Estos efectos son muy parecidos a los observados en personas alcohólicas y en personas en estado de abstinencia. En otros experimentos, ratas adultas bebieron libremente una solución de agua con alcohol al 10%; la consecuencia observada fue un acortamiento en el periodo de su ritmo de actividad (Dwyer and Rosenwasser, 1998).

Estudios en animales y humanos están sujetos a las mismas limitaciones, debido a la dificultad de distinguir a qué nivel del marcapasos u osciladores están ocurriendo los efectos del alcohol y otras drogas. A pesar de esto, varios investigadores han tomado ventaja en los resultados que arrojan los experimentos controlados para examinar los efectos del alcohol, antidepresivos y ansiolíticos; para extrapolarlos al ser humano. Estos estudios han logrado identificar una serie de trastornos a nivel de marcapasos que sugieren que los efectos que se observan bajo condiciones normales de sincronización, son parcialmente resultado de alteraciones a nivel del reloj biológico (Rosenwasser, 2005).

1. El ratón C57/BL6 como modelo de estudios biomédicos

Un modelo muy utilizado en el estudio de los efectos de diferentes drogas es el ratón C57/BL6. Este es catalogado como una cepa endogámica, es decir, que se produce a partir de la cruce consanguínea de hermanos durante 20 generaciones consecutivas, lo que permite que la descendencia muestre homogeneidad tanto fenotípica como

genotípica. Este animal, por sus características y diversidad de usos, es una excelente herramienta en investigación, siendo una de las doce cepas más empleadas entre más de 300 cepas consanguíneas registradas (Festing, 1998); es utilizada como modelo en el estudio de diferentes enfermedades y para el desarrollo de nuevas cepas mutantes.

Las características principales que encontramos en el modelo C57/BL6 son:

- preferencia por alcohol, morfina y otros opioides.
- baja incidencia en la formación de tumores mamarios.
- resistencia a ataques o convulsiones audiogénicas.
- alta susceptibilidad a aterosclerosis inducida.
- alta incidencia de microftalmia.
- susceptibilidad al desarrollo de úlceras dérmicas crónicas.
- resistencia a la irradiación.
- resistencia a shocks anafilácticos.
- pérdida de la audición al rededor de los 12 a 18 meses de edad.

III. ANTECEDENTES

A. La cepa C57/BL6 como modelo para el estudio de ansiedad mediante la prueba de enterramiento de canicas “Marble Burying Test” (MBT)

Existe una amplia variedad de modelos animales que son utilizados para los estudios sobre ansiedad; las ratas, los ratones y los primates han demostrado ser aptos para las pruebas de ansiedad debido a la exhibición natural de conducta exploratoria, la cual parece estar relacionada con algunos componentes vinculados al estado ansioso (Crawley, 1985).

Se ha visto que, tanto en la naturaleza como en condiciones de laboratorio, los roedores (ratas y ratones primordialmente) suelen utilizar el material encontrado en el medio que los rodea para enterrar espontáneamente aquellas cosas ajenas y desagradables en su hábitat (Archer *et al.*, 1987). En los roedores el comportamiento de enterramiento de objetos consiste en remover el sustrato y colocarlo sobre el objeto invasor para evitar y protegerse de la “amenaza” (Poling *et al.* 1981); esta conducta ha sido definida como una conducta de defensa que refleja un estado de alerta del animal (Nicholas, *et al* 2006).

Con base en estas observaciones, desde hace varios años se ha utilizado una prueba conductual conocida como prueba de enterramiento de canicas o *Marble Burying Test* (MBT, por sus siglas en inglés) como un indicador de ansiedad para el estudio de la actividad de diversas sustancias o medicamentos como ansiolíticos. En esta prueba los objetos invasores se representan con canicas y el sustrato suele ser aserrín fino (Archer *et al.*, 1987; Gyertyan, 1995). Dicha prueba ha mostrado una mayor eficacia cuando se utiliza como modelo al ratón C57/BL6, ya que esta cepa por naturaleza, suele ser más impaciente que otras de su especie.

B. Efectos del alcohol sobre los niveles de locomoción en el ratón C57/BL6

Los efectos del alcohol en el comportamiento de los animales varían de acuerdo con la dosis y el tiempo de administración (Pohorecky, 1977).

Se ha reportado que, bajo condiciones constantes de luz (LO), la ingesta de alcohol por los ratones C57/BL6 altera la fase, entorpece la amplitud e incluso llega a suprimir la expresión total de los ritmos circadianos en una gran variedad de funciones fisiológicas y conductuales; incluyendo la temperatura corporal, la actividad locomotriz (Baird et al. 1998), el ciclo de sueño (Ehlers y Slawecki 2000), la ingesta de alimento (Barr 1988; Goldstein y Kakihana 1977) y la secreción de corticosterona (Kakihana y Moore 1976).

De acuerdo con distintas observaciones, los roedores suelen aumentar su locomoción espontánea ante dosis bajas de alcohol (1-2 g/kg; <10%), mientras que cuando se les administra una dosis alta (>4 g/kg; >10%) su locomoción tiende a disminuir, llegando a registrar indicios de depresión (Matchett y Erickson, 1977; Smoothy y Berry 1984; Frye y Breese 1981). El aumento de actividad en dosis bajas de alcohol suele estar acompañado de un incremento en el periodo de inmovilidad, así como de otras conductas, como la de excavar o enterrar (Smoothy y Berry 1984, 1985).

Actualmente se ha probado que en los ratones C57/BL6 existe una relación directa entre la dosis de alcohol y la presencia de ciertos cambios conductuales, ya sea que aumente su presencia o se inhiban; por ejemplo en el exceso de actividad locomotriz, o en la inhibición del proceso de exploración, por mencionar algunas. Estas alteraciones de la conducta en el modelo animal, producidas por el etanol, han sido clasificadas como una manifestación o incremento en el estado de ansiedad (Duncan y Lister 1988). Incluso se ha visto que dosis de drogas ansiolíticas como el alcohol (0.75 g/kg- 1.5 g/kg) y el diazepam (0.5 mg/kg) reducen la ansiedad y aumentan la conducta exploratoria de los animales (Kalueff, *et al*, 2007).

Los ritmos circadianos modulan diferentes respuestas fisiológicas y conductuales al alcohol; se ha visto que diferentes especies, tanto humanos como otros animales, tienden a tomar alcohol en mayores cantidades en ciertos momentos del día o la noche, presentándose ritmos diarios de consumo de alcohol (Danel y Touitou, 2004); por lo que la propensión de la ingesta voluntaria de alcohol puede ser modulada por el marcapasos central y afectar directamente al reloj circadiano (Rosenwasser *et al*, 2005). Además de los factores endógenos, existen también algunos factores

ambientales como es el caso de la luminosidad o el alimento, que pueden afectar el consumo de etanol y por ende contribuir al ritmo diario de su ingesta (Wasielewski y Holloway, 2008).

Se ha observado que en ratas y ratones existe un ritmo diario en la ingesta voluntaria de etanol, siendo su consumo más alto durante la noche (durante su fase activa) mientras que su consumo más bajo se observa durante el día. Esto se debe a que el patrón de ingesta de alcohol se ajusta a sus patrones normales de ingesta de alimentación y agua. De hecho, en los seres humanos que padecen alcoholismo, se ha evidenciado un patrón similar, pues presentan un ritmo diario en el deseo por el primer trago del día a horas tempranas de su fase activa (Trujillo *et al*, 2009).

El GABA es uno de los neurotransmisores asociados directamente con el núcleo supraquiasmático (NSQ), considerado el marcapasos “maestro” en los mamíferos. Existen evidencias de que el etanol actúa directamente en los receptores gabaérgicos para modular el reinicio de fases fóticas y no fóticas (Mcelroy, B. *et al*, 2009). Además de actuar sobre los receptores del GABA, el etanol también modula alteraciones durante y después del consumo a una variedad de neurotransmisores y sus respectivos receptores en las células blanco como el glutamato o la acetilcolina 5-HT, encargados de la regulación y funcionamiento del NSQ (Vengeliene *et al*, 2008). Es así que se puede hablar de un ritmo circadiano en los efectos biológicos del etanol (Deimling y Schnell 1980, Rengifo *etal*, 2005).

La mayoría de los estudios realizados en humanos y animales sobre los efectos de etanol se han realizado bajo condiciones crónicas, ya sea bajo administración excesiva o abstinencia después de un periodo largo de alcoholismo. En contraste, muy poco se sabe sobre los efectos que esta droga produce en personas no alcohólicas o los conocidos como bebedores sociales. En un estudio realizado en sujetos no alcohólicos, la ingesta de alcohol por las mañanas mostró un incremento en la temperatura corporal nocturna y un cambio de fase de la temperatura corporal mínima nocturna en la mañana temprana, indicando un avance de fase (Mullin *et al.*, 1933). Por otro lado, la ingesta de alcohol durante la noche también eleva la temperatura corporal nocturna,

pero produce una compleja variedad de cambios en el patrón circadiano, incluyendo un aparente cambio de fase en el ritmo circadiano de temperatura a un periodo tardío, es decir, un retraso en la fase en los ritmos de actividad de la persona (Eastman *et al.*, 1994).

IV. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que la ingesta crónica de etanol modifica el periodo del ritmo circadiano de actividad locomotriz (Durcan y Lister, 1988) y que el consumo de alcohol evita los cambios de fase producidos por receptores GABA (McElroy *et al*, 2009). Lo anterior, es un antecedente directo del impacto que tiene el consumo de EtOH sobre el marcapasos circadiano. Por otra parte, el consumo de alcohol regula la expresión de la conducta de ansiedad, así como la intensidad de la actividad locomotriz (Ehlers y Slawecki 2000, Matchett y Erickson, 1977; Smoothy y Berry 1984). A pesar de que la intensidad de la actividad no puede ser considerada en si misma como un estado de ansiedad, sí brinda un apoyo para el diagnóstico de esta conducta, ya que se ha visto que existe una relación entre ambas. El propósito de este trabajo es conocer cómo y a qué nivel se alteran la conducta de la ansiedad, y la actividad locomotriz bajo diferentes dosis de etanol y encontrar cómo la relación entre éstas se ve afectada.

V. HIPÓTESIS

El efecto de la ingesta crónica de alcohol tiene un impacto en la manifestación circadiana de la ansiedad y de la actividad locomotriz tanto de manera física como circadiana. Si la ingesta crónica de alcohol a bajas dosis (7%) inhibe los niveles de ansiedad, se espera un aumento en la actividad locomotriz; mientras que a dosis más altas (15%) tiene un efecto contrario, por lo tanto, disminuirá la locomoción.

Asimismo, si el alcohol tiene impacto sobre la fisiología circadiana, se espera que tanto el control diario de la ansiedad como del ritmo de actividad locomotriz sean negativamente afectados por el consumo crónico de EtOH a distintas dosis.

VI. OBJETIVOS

A. *Objetivo General*

- Conocer los efectos de la administración crónica de etanol sobre el promedio diario de actividad locomotriz y del perfil diario de ansiedad (MBT) en el ratón C57/BL6

B. *Objetivos Particulares*

- Estudiar la tendencia de cambio en la locomoción espontánea del ratón C57/BL6, producido por la ingesta *ad libitum* de etanol en diferentes dosis (7% y 15%) por lo menos tres días consecutivos.

- Estudiar el perfil diario en la conducta de ansiedad a través de la prueba MBT en animales intactos y bajo las dosis de etanol anteriormente mencionadas.

- Aportar mayor conocimiento sobre el efecto de la ingesta crónica de etanol a diferentes dosis y sus efectos sobre la locomoción y la regulación diaria de la manifestación de ansiedad en el ratón C57/BL6.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Para conocer los efectos del etanol tanto en la conducta de ansiedad del ratón C57/BL6, como en su locomoción, se recurrió a dos tipos de prueba: I) el registro de actividad, que permite cuantificar los niveles de locomoción en oscuridad constante y II) la prueba de enterramiento de canicas, también conocida como “*Marble Burying Test*” (MBT), que se utilizó para determinar si el etanol modifica el comportamiento del modelo.

Para estudiar cuál es el efecto de la ingesta crónica del etanol en el perfil circadiano de ansiedad, se realizó la prueba de enterramiento de canicas (MBT) cada 4 horas, durante un periodo de 24 horas en un ciclo luz-oscuridad (LO 12:12).

En este proyecto se utilizaron 30 ratones machos adultos C57/BL6 de aproximadamente dos meses de edad. Debido a que cada individuo es su propio control, los animales se colocaron individualmente en cajas de vidrio para evitar cualquier tipo de agresión entre ellos, así como para facilitar el registro de la información de cada uno. Cada ratón contaba con agua y alimento (Chow, PURINA) *ad libitum*; en una habitación con ventilación continua, una temperatura entre 22°C y 26°C y un fotoperiodo de LO 12:12.

A) Ingesta Crónica de Alcohol

Los ratones se mantuvieron individualmente durante todas las observaciones y registros en cajas rectangulares de vidrio de 10 cm X 10 cm X 30 cm en un sustrato de aserrín fino, el cual era el mismo que se usó durante la prueba de ansiedad; cada caja estaba provista de bebederos graduados de 45ml. Las dosis de EtOH que les fueron administradas a los animales fueron de 7% y 15% en agua *ad libitum*. Entre ambas dosis de EtOH se les realizó un lavado o limpieza con agua durante 7 días. Diariamente se registraba la diferencia de volumen de ingesta (en ml) con respecto al día anterior y se estimaba cantidad de alcohol y agua ingerido por cada ratón.

B) Registro de Actividad (Locomoción)

En los costados de cada caja de vidrio donde se encontraba cada ratón, se implementó un sistema de registro integrado por dos barras con sensores infrarrojos, colocadas a nivel del piso. Estas barras detectaban el movimiento del animal a través de la interrupción de la señal de los sensores. Por medio de una interfase, la interrupción de las señales infrarrojas se registró corriendo el programa Ralm15 en versión PC, lo que permite registrar el número de interrupciones a los sensores infrarrojos cada 10 minutos durante 4 a 6 días continuos; los datos fueron almacenados hasta su posterior análisis.

C) Marble Burying Test (MBT)

De acuerdo con Nicolas, Kolb y Prinssen (2006), la prueba de enterramiento de canicas (MBT) ha utilizado como prueba modelo para el estudio y detección de ansiolíticos. La prueba consiste en la colocación de 12 canicas de colores opacos en una caja con las mismas dimensiones de las cajas en las que habitan los ratones ($10\text{ cm} \times 10\text{ cm} \times 30\text{ cm}$). Las canicas se colocan en presencia del animal, con la misma distancia de separación en 4 hileras de tres canicas cada una sobre una cama de aserrín fino de aproximadamente 3 cm de profundidad (figura 4).

Se dejarn transcurrir 15 minutos (tiempo estándar) a una intensidad de luz de alrededor de 10-15 Luxos. Al finalizar los 15 minutos, se registra el número total de canicas enterradas (frecuencias de enterramiento).

El tiempo estándar es de 15 minutos debido a que, después de pruebas preliminares, se demostró que ese es el tiempo en el que el ratón llega al número máximo de canicas que es capaz de enterrar (número de saturación).

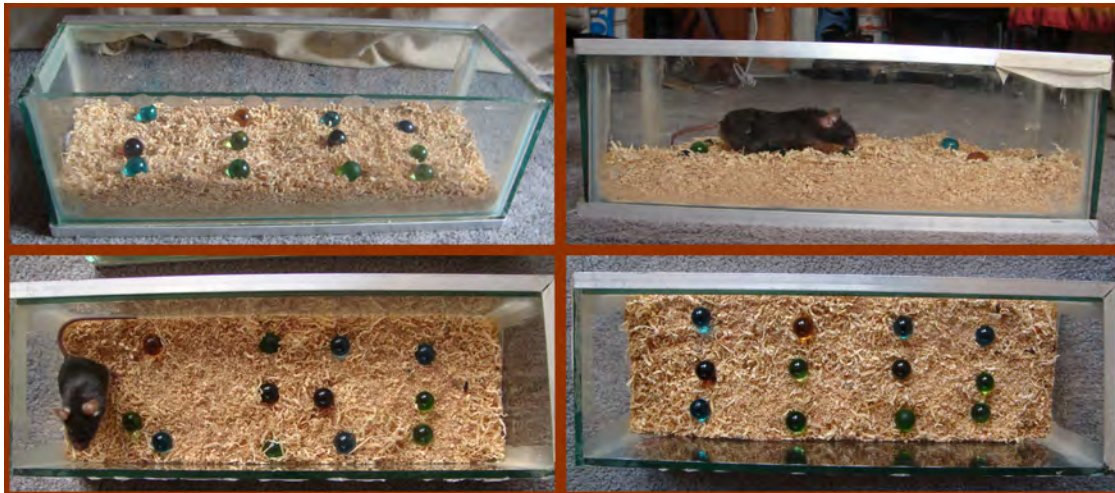


Figura 4. Prueba de enterramiento de canicas “*Marble Burying Test*” (MBT): doce canicas son colocadas en cuatro hileras, el ratón permanece 15 minutos dentro de la jaula y al finalizar se registra el número total de canicas enterradas. Las fotos presentadas en la figura ilustran tanto la colocación de las canicas como al animal explorando y enterrándolas.

D) Análisis de datos

Los datos obtenidos de las pruebas MBT fueron analizadas con el programa para PC COSINOR (Grupo Multidisciplinar de Desenvolvimento e Ritmos Circadianos, de la Universidad de Sao Paulo, Brasil), el cual permite analizar series de datos recolectados a las mismas horas y en un periodo de 24 horas, para obtener los valores de la curva ajustada, así como los valores de la media, el porcentaje de ritmicidad, la acrofase, etc.

Los datos obtenidos a través del registro de actividad locomotriz en libre curso fueron analizados con el programa ActiView (Minimitter) para generar los parámetros del periodo (τ), así como promedios individuales de la actividad locomotriz y los actogramas analizados.

Para los cálculos estadísticos se utilizó el programa estadístico Stawin Pam de Windows XP, con el que se realizaron pruebas t de Student independientes.

VIII. Resultados

A. Ingesta de EtOH

En la tabla 1 se muestra el consumo diario y semanal de etanol de los ratones usados en este estudio, en cada una de las condiciones de ingesta y lavado de alcohol. La cantidad de líquido consumido no es estadísticamente diferente; sin embargo, existe una ligera tendencia al aumento en el consumo de agua durante el lavado, así como en el 15% de ingesta de etanol.

Condición	Consumo Semanal (ml)	Consumo diario (ml)
7% EtOH	23.92 ± (4.10)	3.41 ± (4.10)
Lavado	51.22 ± (16.68)	7.31 ± (16.68)
15% EtOH	33.78 ± (5.14)	4.82 ± (5.14)

Tabla 1. En esta tabla se muestran los promedios (\pm EE) ,del consumo semanal y diario de etanol de todos los ratones.

B. “Marble Buring Test” (MBT)

En la figura 5A se muestra el promedio (\pm EE) y el ajuste por Cosinor del perfil diario de la manifestación de ansiedad en ratones control (a), que no han ingerido EtOH; después de haber ingerido 7% de EtOH durante una semana (b), el valor máximo en la acrofase se desplaza de las 4.14 horas a las 8 horas. Es decir, que se presenta un retraso en la fase y el ratón muestra el punto máximo en el comportamiento de enterramiento de canicas durante las primeras horas de su día subjetivo, en lugar de hacerlo durante su noche o su fase activa.

Tras una semana de la ingesta de un 15% de etanol (c), se pierde la ritmicidad del perfil diario que se aprecia en condiciones normales. El valor de la acrofase en esta condición no es significativo, ya que al perderse la ritmicidad no se puede hablar de un momento donde se presente un claro aumento en la conducta de enterramiento.

En la gráfica de la figura 5B se comparan las tres curvas ajustadas. Los picos de la curva obtenida tras la ingesta de 7% EtOH se recorren en comparación a la obtenida en condiciones normales. Al comparar la curva en condiciones normales contra la curva registrada tras la ingesta del 15% EtOH se observa una clara abolición de la ritmicidad de la conducta de enterramiento.

En el caso de las amplitudes de las diferentes dosis, éstas presentan una tendencia a disminuir conforme la dosis aumenta; en el caso del 15% EtOH, la amplitud de toda la curva varía poco.

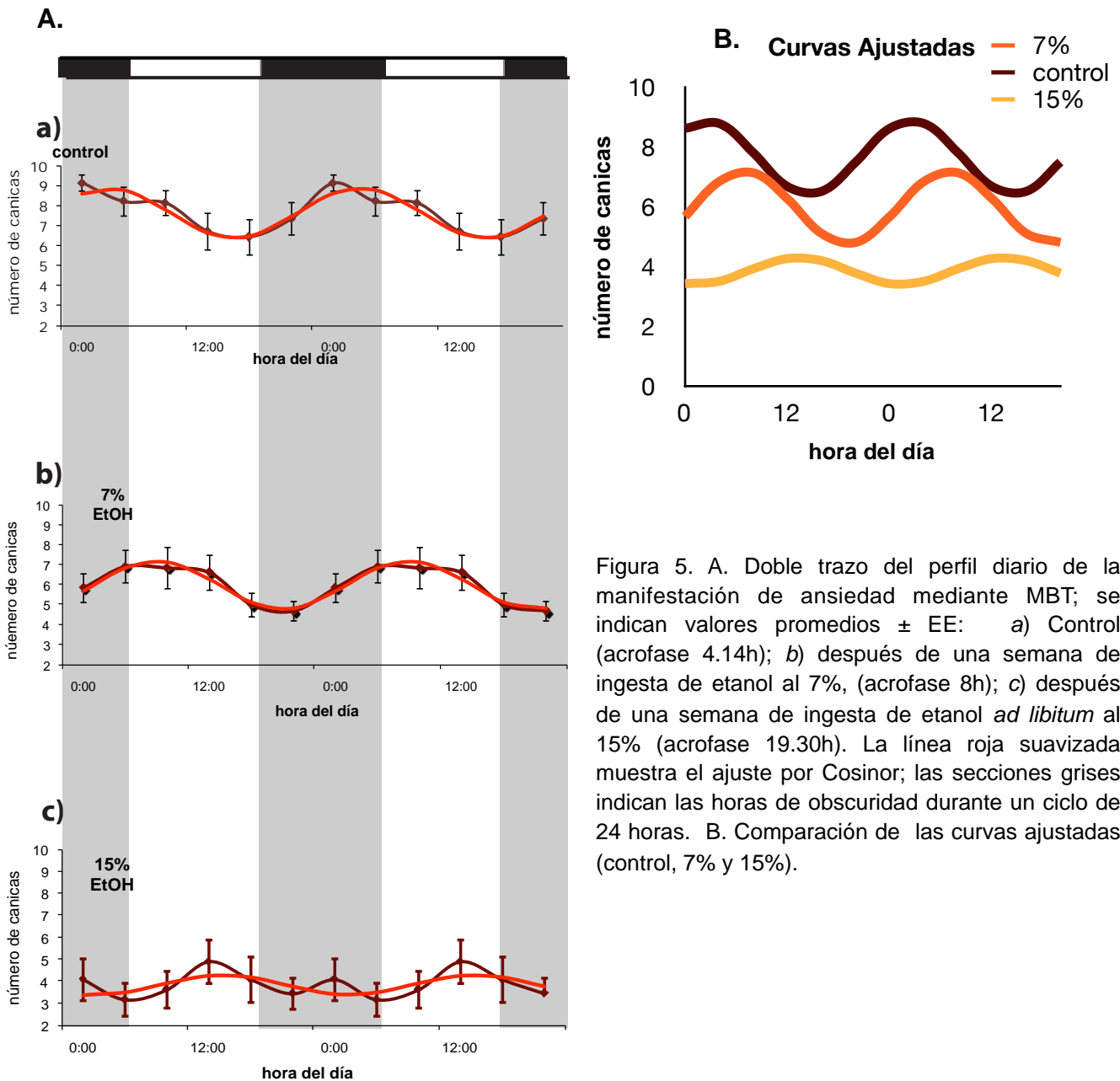


Figura 5. A. Doble trazo del perfil diario de la manifestación de ansiedad mediante MBT; se indican valores promedios \pm EE: a) Control (acrofase 4.14h); b) después de una semana de ingesta de etanol al 7%, (acrofase 8h); c) después de una semana de ingesta de etanol *ad libitum* al 15% (acrofase 19.30h). La línea roja suavizada muestra el ajuste por Cosinor; las secciones grises indican las horas de oscuridad durante un ciclo de 24 horas. B. Comparación de las curvas ajustadas (control, 7% y 15%).

En la figura 6 se muestran los valores promedio obtenidos del programa Cosana. En la gráfica A (mesor) existe disminución significativa de la media entre el control vs 7%, control vs el 15% y entre ambas dosis (t-Student $p=0.015$, $p=0.000001$ y $p=0.000592$). En la gráfica

B se muestra el porcentaje de ritmicidad, el cual muestra una tendencia a disminuir durante la ingesta del 15 % de EtOH en comparación con el control y 7% de EtOH donde aún se puede observar la presencia de una ritmicidad. Tanto la disminución en el porcentaje de ritmicidad, como el de la media, muestra concordancia con los datos observados en la figura 5A.

En la gráfica C se muestran los valores promedios (\pm EE) de la acrofase en las tres condiciones (control, 7% y 15% EtOH). Se puede ver claramente, cómo la ingesta del 7% presenta una tendencia a retrasar la acrofase, mientras que con el 15%, el valor de la acrofase es cercano al control.

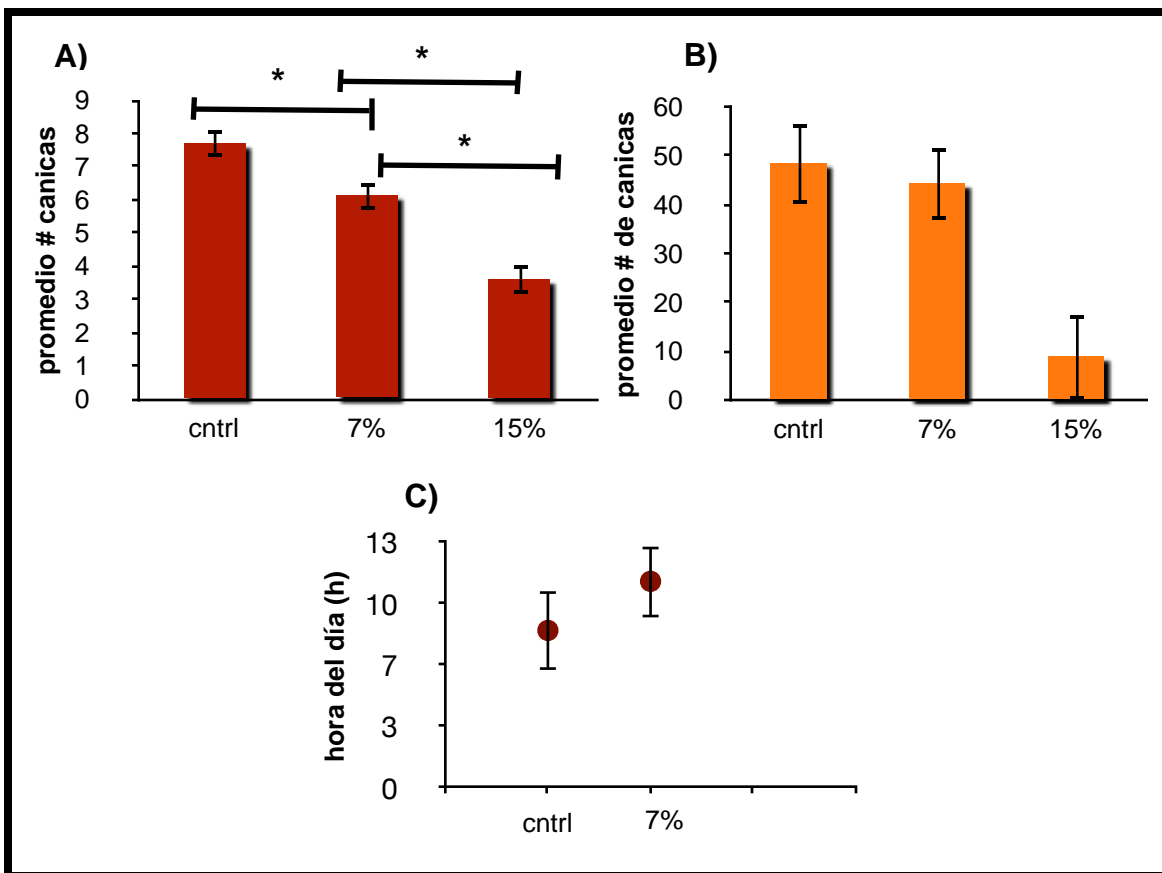


Figura 6. Promedios (\pm EE) del programa Cosana; A) mesor del periodo, B) porcentaje de ritmicidad C) acrofases de cada condición, D) porcentaje de animales que presentaron un valor de P menores a 0.05.

En la figura 7 se muestra que la ingesta de EtOH en diferentes dosis modifica la manifestación de la conducta de ansiedad durante una hora específica (12-13 horas). En términos generales, se puede hablar de un incremento significativo (t-Student $p=0.044$) en la

conducta de enterramiento bajo dosis de 7% EtOH, mientras que no se aprecia un cambio significativo al compararlo con el 15% EtOH. Cabe mencionar que, durante la semana de limpieza, los individuos tienden a regresar prácticamente al valor observado en condiciones normales. Es importante recalcar que esta prueba se realizaba durante su día subjetivo, es decir, que a los individuos se les privaba del descanso y se les sometía a realizar la prueba.

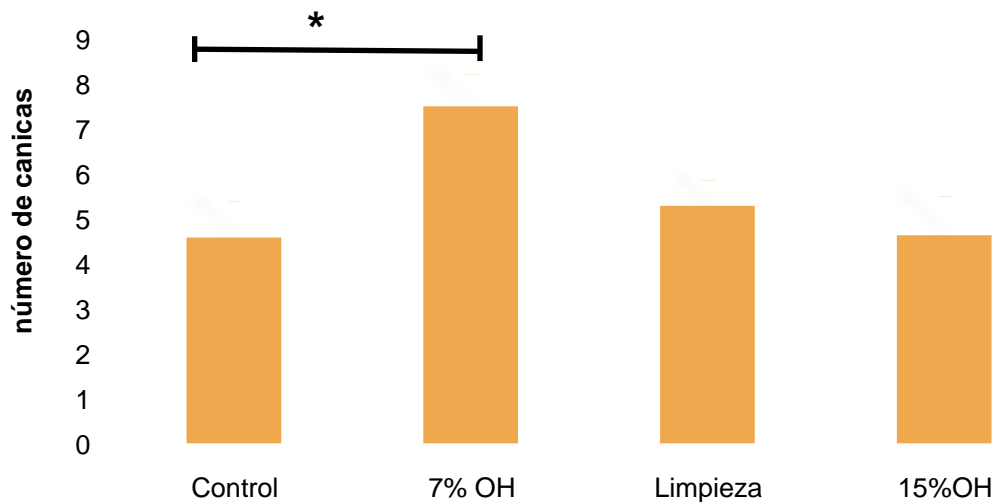


Figura 7. Prueba MBT realizada entre las 12:00 y 13:00 antes y después de permanecer en registro de actividad entre 3-6 días (periodo durante el cual se les administraban las diferentes dosis de etanol). Se observa una diferencia significativa (t-Student $p= 0.044$) entre el número de canicas enterradas después de la ingesta de 7% EtOH y el control.

C. Registro de Actividad

En la figura 8 se muestra el promedio de la actividad locomotriz, donde se observa que, bajo condiciones normales, los ratones tienden a presentar un incremento en la locomoción durante el segundo día del registro, regresando a un promedio basal para el tercer día. Este aumento en la locomoción del animal se ve modificado tras la ingesta de EtOH, tanto al 7% como el 15%; se extiende para el tercer día y posteriormente decae a un promedio basal. A pesar de que el aumento de actividad durante la ingesta de 7% EtOH es mayor al incremento en la actividad presentada con el 15%, estas diferencias no son significativas.

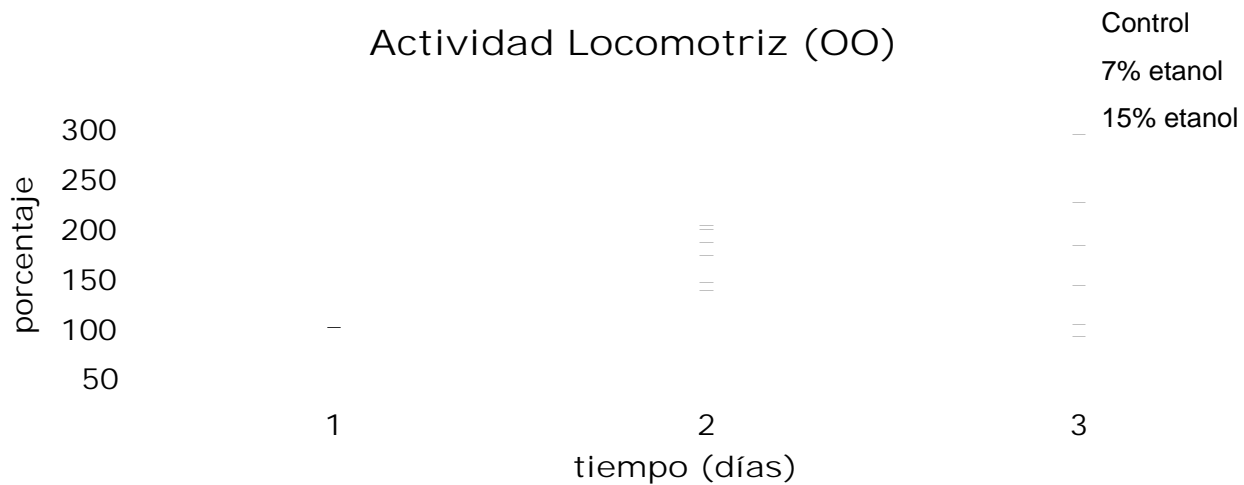


Figura 8. Comparación de los promedios porcentualizados de actividad locomotriz promedio (\pm EE) por día entre las condiciones experimentales control, 7% y 15% EtOH; en condiciones constantes de obscuridad (OO) por un periodo de 3 días.

En la figura 9 se muestran los promedios porcentualizados de cada condición (control, 7% EtOH, lavado, 15% EtOH); el control equivale al 100%, a partir de este dato, se obtuvieron los demás. Ambas dosis de EtOH presentan diferencias significativas si se contrastan con la actividad promedio bajo condiciones normales (t -Student $p=0.0081$; $p=0.0213$).

Se ha hecho referencia a que el tratamiento de retiro de alcohol produce una variedad de efectos en la expresión de los ritmos circadianos (actividad locomotriz principalmente), Si se considera al periodo de lavado como un tratamiento de retiro de alcohol, se puede observar en la figura 10 que los individuos recuperan su locomoción "normal". A pesar de que la actividad sí se ve afectada por la ingesta de alcohol, no se puede hablar de alguna tendencia o cambio significativo en la expresión del ritmo circadiano.

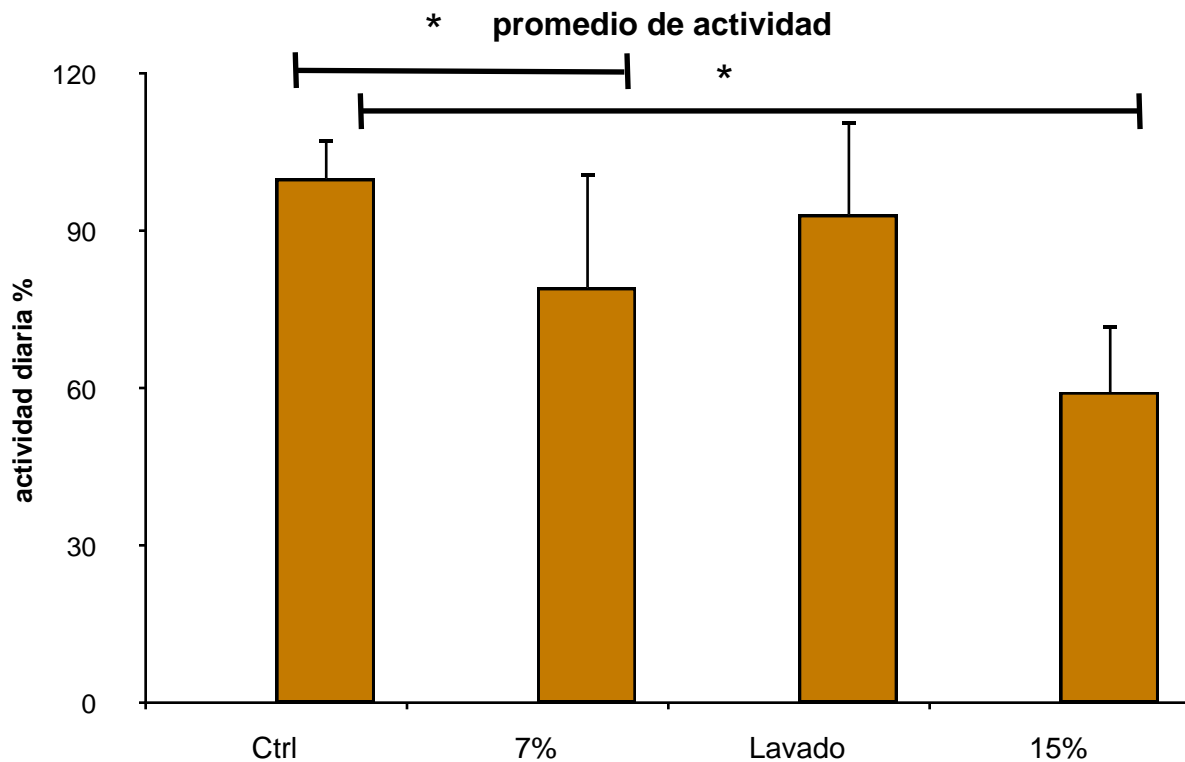


Figura 9. Porcentualización de actividad bajo las diferentes condiciones obtenidas del registro de locomoción en libre curso, en un periodo de 3-6 días. Los datos control vs la ingesta de 7% de etanol presentan una $p=0.0081$, lo que representa un valor significativo. También mostró un valor significativo es el del control vs 15% de ingesta de etanol $p=0.0213$.

En la gráfica A de la figura 10 se pueden observar los periodogramas de todos los ratones a los que se registró su locomoción en condiciones constantes de obscuridad. Existe una tendencia al cambio del valor del periodo; esta tendencia varía dependiendo del individuo, ya que se encontraron ratones en que aumenta (23.45h a 25h), mientras que en otros disminuye a lo largo de las diferentes condiciones de administración de alcohol (25.5h a 23.55h). La gráfica B de la figura compara los actogramas tanto de 7% y 15% EtOH de un ratón.

En el actograma del 7% se ve un incremento en la locomoción espontánea, que se encuentra acompañada de inmovilidades entre cada inicio de actividad. En el actograma del 15% se observa que, aunque en general la locomoción diaria tiende a disminuir, los inicios de actividad diarios presentan una estabilidad en el inicio de fase (línea roja suavizada), en

contraste con el actograma del 7%, donde el inicio de actividad presenta un retraso conforme pasan los días (línea roja suavizada).

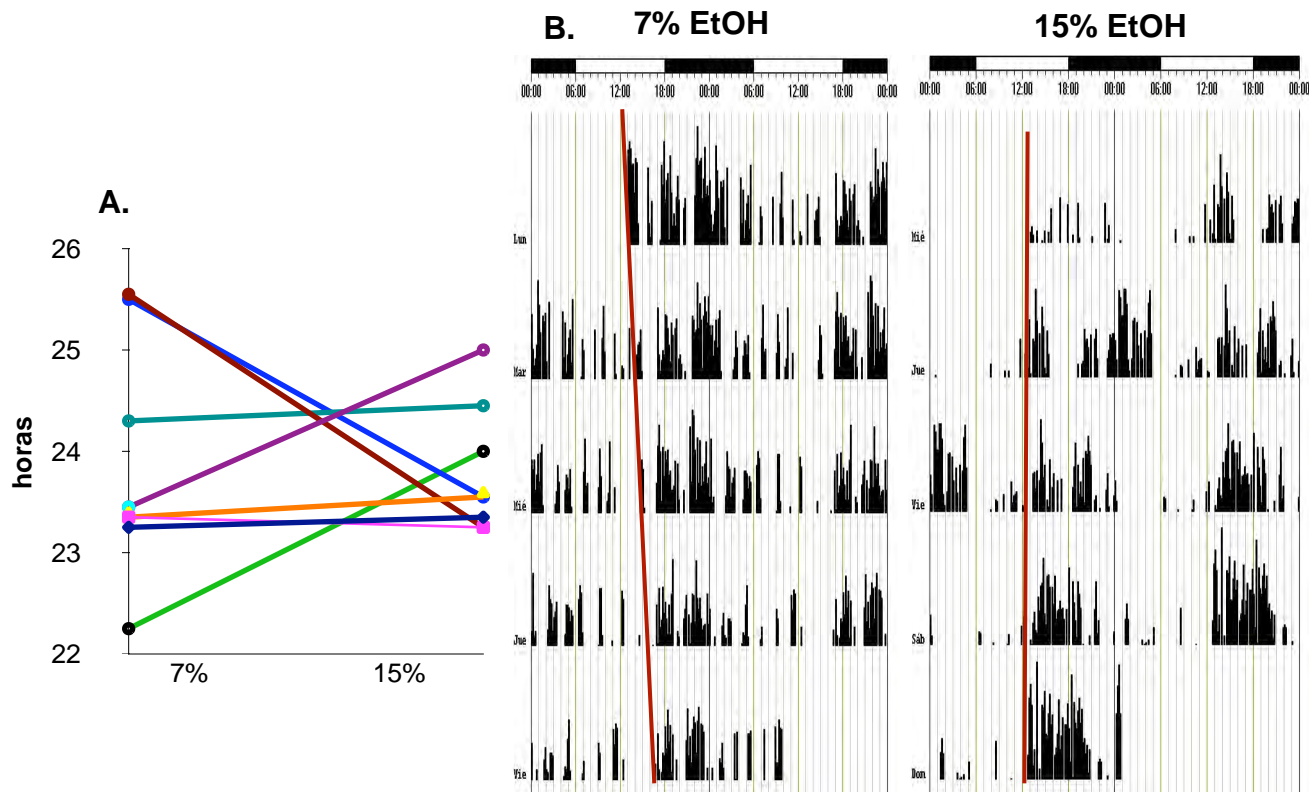


Figura 10. A. Gráfica de los valores de periodo obtenidos mediante periodogramas (datos obtenidos con el programa de análisis ActiView) durante la ingesta de etanol al 7% y 15%, se observan tendencias tanto en aumento como en disminución de los valores dependiendo del individuo que se evaluó. Cada línea de color corresponde a un ratón diferente B. Comparación de actogramas 7% y 15% de EtOH de un mismo animal; la línea roja suavizada muestra la estimación del inicio de actividad locomotriz diaria durante el registro en libre curso.

IX. Discusión

En lo que confiere a la ingesta de EtOH en la tabla 1, los ratones tendieron a consumir entre 4-7 ml diarios; no existen diferencias significativas entre las diferentes condiciones experimentales. Esto es consistente con otros estudios donde se ha documentado que la mayoría de los roedores presentan un patrón de ingesta de alcohol, que se ajusta a sus patrones normales de ingesta de alimentación y agua (Rosenwasser *et al*, 2005).

La prueba de enterramiento de canicas (MBT) se llevo a cabo de dos formas distintas: primero se realizó una única prueba antes y después de iniciar alguno de los tratamientos, ya fuera el control, la ingesta de alcohol (7% y 15%), o el lavado. Como se observa en la gráfica de la figura 7, si se realiza la prueba de enterramiento de canicas antes y después de siete días de la ingesta de EtOH solamente a una hora determinada (12-13 hrs), se puede observar que, en efecto, la manifestación de la ansiedad ante dosis bajas de alcohol (7%) se inhibe significativamente. Mientras que al aumentar la dosis de EtOH, la conducta ansiosa de los roedores tiende a aumentar, lo que se refleja en una menor cantidad de canicas enterradas. En dicha gráfica también se puede apreciar cómo siete días de “lavado” (ingesta de agua) fueron suficientes para retomar un valor similar al observado en el control; lo que muestra que los individuos se encontraban en un estado semejante al iniciar la ingesta crónica de EtOH *ad libitum* al 15%.

Actualmente se ha probado que en ratones C57/BL6, existe una relación directa entre la dosis de alcohol y la presencia de ciertos cambios conductuales, ya sea que aumenten o se inhiban. Se ha visto que ante dosis bajas de EtOH (<10%), se reduce la ansiedad, lo que se proyecta en una mayor exploración del medio y por ende, a una mayor actividad, ocurriendo lo contrario ante dosis altas (Duncan *et al* 1988); en referencia a este punto, en la figura 7 se observa claramente este aumento, así como disminución de la conducta considerada como ansiedad, lo que es consistente con otros estudios (Matchett y Erickson, 1977; Smoothy y Berry 1984, 1985).

Posteriormente se efectuó la prueba de enterramiento durante un periodo de 24 horas (cada 4 horas se sometía a los individuos a la prueba MBT), para ver si se observaba la presencia de un perfil diario en la manifestación de ansiedad. En la gráfica A de la figura 5 se puede observar que, en efecto, la conducta de ansiedad presenta un perfil diario en animales

control. En esta gráfica, lo que se está midiendo es únicamente la conducta de MBT relacionada con la ansiedad. En primera instancia la acrofase de la gráfica *a* se encuentra a las 4.14 horas, en la gráfica *b* podemos observar cómo esta acrofase se desplaza (retraso). Si observamos las amplitudes de las tres gráficas (*a,b,c*) se aprecia cómo la ritmicidad del perfil, se pierde tras la ingesta de EtOH al 15%.

Se ha reportado que en los ratones C57/BL6 bajo, condiciones constantes de luz, la ingesta de alcohol altera la fase, modifica la amplitud e incluso llega a suprimir la expresión total de los ritmos circadianos en una gran variedad de funciones fisiológicas y conductuales, incluyendo la temperatura corporal y la actividad locomotriz (Baird *et al*, 1998). La importancia de la figura 5 es que estas alteraciones que se han observado en el registro de actividad también son evidentes en la manifestación de una conducta (ansiedad en este caso) alterada por el EtOH, lo que indica que actúa sobre el reloj y que a la vez, esta conducta se ve afectada y controlada por el reloj circadiano.

En la gráfica B de la figura 5 se comparan los valores las curvas ajustadas; esta gráfica permite observar con mayor detalle lo ya mencionado: el desplazamiento o retraso de la fase y la pérdida de la ritmicidad conforme aumenta la ingesta de alcohol. De igual forma, observando las gráficas de la figura 6, hay consistencia con lo mencionado en la figura 5. Existen diferencias significativas en los valores de la media (gráfica 6A) de cada condición contra el control. También se observa una tendencia de disminución en la ritmicidad (gráfica 6B) de los perfiles bajo las diferentes dosis; en la ingesta del 7% se presenta un porcentaje de ritmicidad de 44.40%, mientras que el porcentaje de ritmicidad del 15% es de 8.91%; en comparación con el valor control (48.43%). Los datos promedio de acrofase en la gráfica 6C (4.14 horas para el 7% y 8 hora para el 15%) se desplazan conforme la ingesta de EtOH aumenta.

De acuerdo a la literatura, los roedores suelen aumentar su locomoción espontánea ante dosis bajas de alcohol mientras, que cuando se les administra una dosis alta, su locomoción tiende a disminuir (Matchett y Erickson, 1977; Smoothy y Berry 1984; Frye y Breese 1981). En la figura 9 se ejemplifican los valores obtenidos del registro de actividad durante los primeros tres días, a pesar de que ante ambas dosis de alcohol se aprecia una tendencia en

el aumento de actividad (sobre todo durante el día dos) la tendencia al 7% es mayor que la del 15%.

En los antecedentes se hace referencia a que tanto la ingesta de alcohol como el tratamiento de retiro de alcohol produce una variedad de efectos en la expresión de los ritmos circadianos, tanto en humanos como en otros animales (Eastman *et al.*, 1994). En la gráfica de la figura 10 se observan los valores promediados del registro de actividad a lo largo de 6 días. Si consideramos al lavado como un tratamiento ligero de retiro de alcohol (abstinencia), no se pueden observar cambios significativos en la expresión del ritmo, sino por el contrario, se observa una tendencia a retomar el estado “normal” observado en el control.

El aumento de actividad en dosis bajas de alcohol suele estar acompañado de un aumento en el periodo de inmovilidad, así como la presencia o incremento de otras conductas, como la de excavar o enterrar (Smoothy y Berry 1984, 1985). En este trabajo se puede apreciar que, en efecto, en dosis bajas de alcohol, 7% la actividad locomotriz es mayor y por ende, la conducta de ansiedad se inhibe; lo que se comprueba con el aumento significativo de enterramiento de canicas.

En la gráfica A de la figura 11 podemos observar que existen cambios en el periodograma de cada individuo, ya que dependiendo del individuo, el periodo aumenta o disminuye. Los valores entre los que oscilan todos los periodos, son de 23 a 25 horas. En los actogramas de la gráfica B de la figura 11 se ve que los periodos de inmovilidad y de actividad con dosis bajas son más espontáneos. En contraste, durante la ingesta de EtOH al 15% los periodos de inmovilidad tienen una mayor duración y la actividad presenta un patrón más claro de inicio. Se ha visto que en los roedores, cuando se les administra una dosis alta de EtOH (>10%), la locomoción tiende a disminuir e incluso se ha llegado a registrar indicios de depresión (Matchett y Erickson, 1977; Smoothy y Berry 1984; Frye y Breese 1981). De hecho, el aumento de actividad en dosis bajas de alcohol suele estar acompañado de un aumento en el periodo de inmovilidad (Smoothy y Berry 1984). En el caso de estos actogramas se puede observar una ligera modificación en el ritmo (sobre todo en el inicio y en los momentos de inmovilidad) entre la ingesta del 7% y el 15% ya que en el caso del primer actograma (7%) el inicio de la actividad se va retrasando conforme avanzan los días, mientras que en el del 15% el inicio se presenta constante durante la semana de ingesta.

La administración aguda de EtOH produce alteraciones en los ritmos circadianos a nivel fisiológico (sueño-vigilia, alimentación, etc.), endocrino y conductual (exploración y relaciones sociales) (Baird et al. 1998, Ehlers y Slawecki 2000 Barr 1988; Goldstein y Kakihana 1977, Kakihana y Moore 1976). La evidencia que existe un perfil diario de la conducta de ansiedad, permite estudiar con otro enfoque las consecuencias de una ingesta crónica de alcohol, ya que esta conducta está estrechamente asociada con el EtOH tanto en humanos como en roedores.

En relación con la actividad locomotriz, a pesar de que el aumento en ésta no puede ser utilizado como una característica de ansiedad, sí nos permite establecer una relación directa con dicha conducta, pues la locomoción espontánea se ve directamente afectada por un incremento (o decremento) en la ansiedad. Es decir, si consideramos que la ansiedad es un estado de excitación vegetativa semejante al miedo, es de esperarse que la actividad locomotriz sea menor conforme más ansioso este el individuo; por ende, la conducta exploratoria así disminuye y las inmobilizaciones aumentan. De esta manera se puede decir que, en efecto, el alcohol tiene repercusiones directas en los relojes circadianos y en consecuencia, la expresión de estos mismos (en este caso a través de la conducta ansiedad).

A pesar de que algunas de las consecuencias del alcohol se relacionan con la interrupción del tiempo fisiológico normal, la mayoría de los estudios realizados en los efectos cronobiológicos del alcohol se han realizado bajo condiciones normales, donde los estímulos del ambiente afectan directa o indirectamente a los ritmos circadianos. Esto no permite separar efectivamente los efectos que produce el alcohol sobre el reloj circadiano (marcapasos central) de aquéllos que afectan al reloj en sus vías eferentes (psicológicas y sistemas de control).

Gracias a los estudios que se han realizado en animales, se han podido aislar un poco y estudiar al reloj de forma más cercana. Los resultados obtenidos muestran que, en efecto, el alcohol actúa sobre el reloj biológico de diferentes especies como ratones, ratas y humanos, de tal forma que a la larga se podrá entender de forma más clara, cómo es que el alcoholismo afecta a los seres humanos.

X. Conclusiones

Del siguiente trabajo podemos concluir que:

- La manifestación de la conducta de ansiedad presenta un perfil diario.
- Tras la ingesta *ad libitum* de alcohol (7%), se observa un cambio (retraso) en la fase de enterramiento de canicas.
- En el perfil diario de la manifestación de ansiedad la ritmicidad se ve abolida tras una ingesta crónica de alcohol al 15%.
- La actividad locomotriz es más dispersa con dosis bajas de alcohol, mientras que ante dosis altas, los inicios e inmovilidades presentan mayor duración y presentan mayor estabilidad de fase.

XI. Referencias

A. Bibliografía

Aguilar Roblero, R., Mercado C., Guadarrama, P. y Chavez, J.L. (2004) Aspectos Celulares y Moleculares del Núcleo Supraquiasmático. *Fisiología Celular y Molecular Principios y Conceptos*. Universidad Veracruzana. México. pp 181-192.

Archer T., Fredriksson A., Lewander T., *et al* (1987) Marble Burying and spontaneous motor activity in mice: interactions over days and the effect of diazepam. *Psychology* 28: 242-249.

Aschoff, J. (1981) Biological Rhythms. *Handbook of Behavioral Neurobiology*. Vol 4. Plenum Press. New York, NY. pp 553.

Ayala, D.E; Barbera, J.M. Calvo, C. *et al* (2004) Cronobiología, cronofarmacología, cronopatología. Ediciones Mayo. ISBN: 84-96122-66-2.

Baird, T.J. Briscoe, R.J. Vallet, M., (1988) Phase-response curve for ethanol: Alterations in circadian rhythms of temperature and activity in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 61: 303-315.

Barr, S.I. (1988) Influence of increasing concentrations of ethanol on food and water intake, body weight, and wheel running of male Sprague-Dawley rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 29: 667-673.

Boerngen-Lacerda, R.,Souza-Formigoni M.L. (2000) Does the increase in locomotion induced by ethanol indicate its stimulant or anxiolytic properties? *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 67: 225-232.

Breadlove, S.M. Rosenzweig, M.R, Watson N.V. (2007) Biological Psychology: An Introduction to Behavioral, Cognitive and Clinical Neuroscience. ED. Sianuer Associates, Inc.Publishers, USA. pp 610.

Buijjs, R.M., Kalsbeek, A., Romijn, H.J., Pennartz, C.M.A., Mirmiran, M., Eds.(1996) Hypothalamic Integration of Circadian Rhythms. Elsevier, Amsterdam.

Caeiro, M.; Mijon, A.; Calderón, A. *et al* (2004) Cronobiología y cáncer. *Oncología*, 27 (5): 279-288.

- Crawley, J.N. (2005) Exploratory Behavior Models of Anxiety in Mice. *Neuroscience and Biobehavioral Review* 9: 37-44.
- Danel, T., Touitou, Y. (2004) Chronobiology of alcohol: from chronokinetics to alcohol-related alterations of the circadian system. *Chronobiology International* 20: 1093-1102.
- DeCoursey, P. (2004) Functional organization of circadian systems in multicellular animals. *Chronobiology: biological time keeping*. Dunlap, J.C., Loros, J.J. and DeCoursey, P. Sinauer Associates, USA.
- Deimling J.M., Schnell C.R. (1980) Circadian rhythms in the biological response and disposition of ethanol in the mouse. *Pharmacology. Exp. Ther.* 213: 1-8.
- Duncan D.M., Lister R. G. (1988) Time course of ethanol's effects on locomotor activity, exploration and anxiety in mice. *Psychopharmacology* 96: 67-72.
- Dunlap, J.C, Loros, J.J, DeCoursey P.J., Eds (2004) *Chronobiology: Biological Timekeeping*. Ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. USA. pp 402.
- Dwyer, S.M., Rosenwasser, A.M. (1998) Neonatal clomipramine treatment, alcohol intake and circadian rhythms in rats. *Psychopharmacology* 138: 176-183.
- Eastman, C.I., Stewart, K.T., Weed, M.R. (1994) Evening alcohol consumption alters the circadian rhythm of body temperature. *Chronobiology International* 11: 141-142.
- Ehlers, C.L., Slaweki, C.J. (2000) Effects of chronic ethanol exposure on sleep in rats. *Alcohol* 20: 173-179.
- Frye G.D., Breese G.R. (1981) An evaluation of the locomotor stimulating action of ethanol in rats and mice. *Psychopharmacology* 75: 372-379.
- Goldman, B. D. (1999) The circadian timing system and reproduction in mammals. *Steroids*. 64: 679-685.
- Goldstein, D.B., Kakihana, R. (1977) Circadian rhythms of ethanol consumption by mice: A simple computer analysis for chronopharmacology. *Psycho-pharmacology* 52: 41-45.
- Goldman, B.D. (1999) The circadian timing system and reproduction in mammals. *Steroids* 64: 679-685.

Goldman, H.H (1989) *Psiquiatría General*. Ed. El Manual Moderno S.A de C.V. México. 736 pp.

Gruart A, Delgado, J.M, Escobar C., Aguilar Roblero, R. (2002) *Los Relojes que Gobiernan la Vida*. Colección Ciencia para todos no.188. Fondo de Cultura Económica. México. 197 pp.

Gyertyan I. (1995) Analysis of the marble burying response: marbles serve to measure digging rather than evoke burying behavior in mice. *Pharmacology* 68: 65-70.

Hill, R.W., Wyse, G.A., Anderson, M. (2004) *Animal Physiology*. ED. Sianuer Associates, Inc.Publishers, USA. 770 pp.

Kakihana, R., Moore, E., J.A. (1976) Circadian rhythm of corticosterone in mice: Effect of chronic consumption of alcohol. *Psychopharmacology* 46: 301- 305.

Kalueff, A.V, Keisala, T., Minasyan, A., Tuohimaa, P. (2007) Pharmacological modulation of anxiety-related behaviors in the murine Suok test. *Brain Research Bulletin*. 74: 45-50.

Keller, M. (1960) Definition of alcoholism. *Q.J.Stud.Alcohol* 21: 125-134.

Kodma, H., Nakazawa, Y., Kitorii, T., *et al* (1988) Biorhythm of core temperature in depressive and non-depressive alcoholics. *Drug and Alcohol Dependence* 21: 1-6.

Madden, J.S. (1986) *Alcoholismo y Farmacodependencia*. Ed. EL Manual Moderno S.A. de C.V. México. 351 pp.

Martini, F.H., Nath, J.L. (2009) *Fundamentals of Anatomy and Physiology*. ED. Pearson Education, USA. 1123 pp.

Matchett J.A., Erickson C.K. (1977) Alteration of ethanol- induced changes in locomotor activity. *Psychopharmacology* 52: 201-206.

Mcelroy,B., Zakaria, A., Glass, J.D., Prosser, R.A. (2009) Ethanol Modulates Mammalian Circadian Clock Phase Resetting Through Extrasynaptic GABA Receptor Activation. *Neuroscience*164: 842-848.

Mullin, F.J., Kleitman, N., Cooperman, N.R. (1933) Studies on the physiology of sleep: The effect of alcohol and caffeine on motility and body temperature during sleep. *American Journal of Physiology* 106: 478-487.

Nicolas L.B, Kolb Y., Prinssen E.P.M (2006) A combined marble burying- locomotor activity test in mice: a practical screening test with sensitivity to different classes of anxiolytics and antidepressants. *European Journal of Pharmacology* 547: 106-115.

Pohorecky L. (1977) Biphasic action of ethanol. *Biobehavioral Review* 1: 231-240.

Poling, A., Clearly, J., Monaghan, M. (1981). Burying by rats in response to aversive and nonaversive stimuli. *J.Exp. Anual Behavior*. 35: 31-44.

Procuraduría General de la República y Centro mexicano de Estudios en Farmacodependencia (1976) Fármacos de Abuso. Prevención, Información farmacológica y Manejo de Intoxicaciones. Ed. CEMEF. México. 239 pp.

Rebuelto M. (2003) Cronofarmacología. *Boletín de AAFAVET Asociación Argentina de Farmacología y Terapéutica Veterinaria* 3 (1): 1-7

Rengifo A., Tapiero C., Spinel C. (2005) Receptores GABA (γ -aminobutírico) y su relación con la dependencia al alcohol. *Ingeniería y Ciencia ISSN* 1 (1): 77-96.

Rosenwasser A. M, Logan, R.W., Fecteau, M.E. (2005) Chronic ethanol intake alters circadian period-responses to brief light pulses in rats. *Chronobiology International*. 22: 227-236.

Smoothy R., Berry M.S. (1984) Alcohol increase both locomotion and immobility in mice: an ethological analysis of spontaneous motor activity. *Psychopharmacology* 83: 272-276.

Smoothy R., Berry M.S. (1985) Time course of the locomotor stimulant and depressant effects of a single low dose of ethanol in mice. *Psychopharmacology* 85: 57-61.

Sanvisens, A.H. (1989) Ritmos y relojes biológicos: Introducción a la cronobiología. Vol 1. Ed. Promociones y Publicaciones Universitarias. Barcelona, España.

Souza y Machorro M. (1988) Alcoholismo: conceptos básicos. Ed. El Manual Moderno. México. 212 pp.

Trujillo, J.L, Roberts, A.J., Gormán, M.R. (2009) Circadian Timing of Ethanol Exposure Exerts on Subsequent Ad Libitum Consumption in C57/BL6/BL6 Mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 33 (7): 1286-1293.

Vengeliene, V., Bilbao, A., Molander, A., Spangel, R. (2008) Neuropharmacology of alcohol addiction. *Br J Pharmacol*, 154: 299-315.

B. Sitios web.

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata www.fcv.unlp.edu.ar/info-general/archivos_servicios/cepas%20endo%20y%20exo%20rata-raton.doc

Festing, M.F. Inbred strains of mice: C56BL. Mouse Genome Informatics database. Contributing Projects: Mouse Genome Database (MGD), Gene Expression Database (GXD), Mouse Tumor Biology (MTB), Gene Ontology (GO), MouseCyc. <http://www.informatics.jax.org>

From News-Medical.Net- Latest Mediaco News and Research from Arounf the World <http://www.news-medical.net/news/2009/03/20/47119.aspx>

National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) artículo: WASIELEWSK, J.A., Holloway, F.A. (2008) Alcohol's Interactions With Circadian Rhythms: A Focus on Body Temperature. <http://pubs.niaaa.nih.gov/publications>

National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism (NIAAA) artículo: Rosenwasser A. M. (2005) Alcohol, Antidepressants, and Circadian Rhythms. Human and Animal Models. Alcohol Research & Health. <http://pubs.niaaa.nih.gov/publications>

Portal de Medicina Estética - Revista de Medicina Estética y especialidades afines

<http://www.med-estetica.com/>

The Jackson Laboratory <http://jaxmice.jax.org/strain/000664.html>

Universidad Centrooccidental Lisandro Alvarado, Decanato de Ciencias Veterinarias, España <http://www.ucla.edu.ve/dveterin/bioterio/alopecia.htm>