



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

Universidad Nacional Autónoma de México

---

---

Facultad de Psicología  
División de estudios profesionales

**Conductas tipo depresivas en un modelo animal  
de trabajo nocturno**

TESIS

Que para obtener el título de

**Licenciada en Psicología**

**PRESENTA**

Zarate Mozo María del Carmen

**Directora de tesis**

Dra. Natalí Nadia Guerrero Vargas



Facultad  
de Psicología

Ciudad Universitaria, CD. MX. noviembre 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	2
ANTECEDENTES.....	3
<i>Ritmos circadianos y sincronización</i> .....	3
<i>Desincronización circadiana</i> .....	6
<i>Modelos de alteraciones circadianas</i> .....	8
<i>Desincronización circadiana y trabajo nocturno o por turnos</i> .....	9
<i>Modelos de trabajo nocturno</i> .....	11
<i>Depresión y alteración de ritmos circadianos</i> .....	13
<i>Modelos de alteraciones circadianas que inducen conductas tipo depresivas</i> .....	15
<i>Circuito emocional de la depresión</i> .....	16
<i>Neuroinflamación asociada a la depresión</i> .....	19
<i>Modelos experimentales de depresión y pruebas conductuales</i> .....	22
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	27
OBJETIVOS .....	28
HIPÓTESIS.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
<i>Sujetos y condiciones generales</i> .....	29
<i>Diseño experimental</i> .....	29
<i>Protocolo de actividad forzada (trabajo nocturno)</i> .....	30
<i>Restricción de alimento</i> .....	30
<i>Peso corporal e ingesta de alimento</i> .....	31
<i>Actividad general</i> .....	31
<i>Pruebas conductuales</i> .....	31
<i>Evaluación de los niveles de la hormona corticosterona</i> .....	34
<i>Inmunohistoquímica para GFAP e IBA-1</i> .....	34
<i>Análisis de tejido</i> .....	35
<i>Análisis estadístico</i> .....	36
RESULTADOS .....	37
<i>Actividad general</i> .....	37
<i>Peso corporal e ingesta de alimento</i> .....	41
<i>Análisis conductual</i> .....	43
<i>Concentración de corticosterona en sangre</i> .....	47
<i>Marcadores de neuroinflamación</i> .....	48
DISCUSIÓN .....	53
CONCLUSIONES .....	62
REFERENCIAS .....	63

## **Dedicatoria**

A mi madre, por apoyarme siempre sin importar las circunstancias, agradezco tu comprensión en los momentos difíciles, por creer en mí y por el esfuerzo que has realizado para que no deje mis sueños. No bastarían las palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí. Te amo.

## **Agradecimientos**

Le agradezco a mi tutora Dra. Natalí Nadia Guerrero Vargas por el apoyo, la paciencia y enseñanza a lo largo de este trabajo y por brindarme las herramientas necesarias en mi formación académica.

Gracias a la Dra. Carolina Escobar Briones por aceptarme en su equipo de trabajo, por la confianza, el apoyo, los consejos y enseñanza que me ha brindado desde el inicio de este proyecto.

A mis hermanas, gracias por los consejos, el apoyo y risas que hemos compartido, gracias por creer en mí y ser las personas que más amo.

A mis amigos les agradezco todos los momentos divertidos que compartimos y los que aún nos faltan, sobre todo por los comentarios constructivos que me han brindado.

A los integrantes del Laboratorio de Ritmos Biológicos y Metabolismo, por su amistad, así como las ideas, comentarios y críticas a este trabajo.

Esta tesis fue financiada por CONACYT 239403 y PAPIIT IG200417 e IA208818.

## **ACRÓNIMOS**

*Ad libitum*: A placer, a voluntad.

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

BLA: Amígdala basolateral

DI: Índice de discriminación

DLPFc: Corteza prefrontal dorsolateral

DSM-V: Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales V

fMRI: Resonancia magnética funcional

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial, específica de astrocitos

HPA: Eje hipotalámico-hipofisario-adrenal

IBA-1: Molécula adaptadora de unión a calcio ionizada 1, específica de microglía

ICSD: Clasificación Internacional de los Trastornos del Sueño

LB: Línea base

LD: Ciclo luz-oscuridad

LL: Luz constante

MOR: Movimientos oculares rápidos

MPFc: Corteza prefrontal medial

NSQ: Núcleo Supraquiasmático

SAD: Trastorno afectivo estacional

SNC: Sistema nervioso central

PFC: Corteza prefrontal

## RESUMEN

En humanos, las alteraciones de los ritmos circadianos inducidas por el trabajo nocturno y la exposición a luz por la noche pueden inducir depresión y ansiedad. En roedores expuestos a un modelo de “trabajo nocturno” que se caracteriza por actividad forzada durante su fase de reposo, se presentan alteraciones circadianas, en donde la alimentación y las funciones metabólicas se desacoplan del mensaje del reloj biológico, el núcleo supraquiasmático.

En este estudio se exploraron conductas tipo depresivas en un modelo de trabajo nocturno caracterizado por desincronización circadiana, estas conductas se evaluaron mediante una serie de pruebas conductuales como campo abierto, reconocimiento de objetos novedosos, interacción social y prueba del consumo de agua con azúcar. También se determinó el estado de neuroinflamación de áreas asociadas a la depresión y se probaron horarios fijos de alimentación como una estrategia para evitar la desincronización circadiana y con ello la depresión. Los resultados obtenidos demuestran que el protocolo de trabajo nocturno induce comportamiento de ansiedad y tipo depresivo, además de un aumento en el número de células positivas a la proteína GFAP e IBA-1 en las áreas asociadas a la regulación emocional en específico en la amígdala basolateral y corteza prefrontal. De forma importante, los efectos del trabajo nocturno son revertidos cuando las ratas son alimentadas en su fase adecuada, demostrando al alimento como sincronizador del sistema circadiano. Nuestros resultados demuestran que el modelo de trabajo nocturno es un buen modelo para estudiar los mecanismos que desatan las conductas tipo depresivas en situaciones de desincronización circadiana. Cada vez más personas se enfrentan a horarios nocturnos de trabajo y apenas comenzamos a entender las consecuencias para el estado de salud y psicológico de este esquema de trabajo, sin embargo, es indispensable generar estrategias para evitar o aminorar sus consecuencias sobre la salud del individuo.

## INTRODUCCIÓN

Los ritmos circadianos son patrones de oscilación en la conducta y procesos fisiológicos, cuya característica principal es que presentan un periodo de 24 h y permiten a los organismos sincronizar sus actividades con las fluctuaciones periódicas del medio externo. En mamíferos, el núcleo supraquiasmático (NSQ) es considerado el reloj biológico el cual se sincroniza principalmente al ciclo luz-oscuridad (Fukuhara & Tosini, 2003).

La sincronización de los ritmos circadianos debe someterse a un reajuste cuando las personas se adhieren a un nuevo horario de actividad, como en el caso de las personas que trabajan de noche y duermen durante el día. La pérdida de la congruencia entre el sistema circadiano y el ciclo luz-oscuridad conduce a alteraciones en los ritmos circadianos y estas a su vez impactan sobre la homeostasis física y mental de los individuos (Waterhouse, Edwards, Atkinson, & Reilly, 2006).

En este sentido, se ha demostrado que los trabajadores nocturnos presentan alteraciones en los ritmos circadianos y tienen un mayor riesgo de presentar enfermedades cardiovasculares, gastrointestinales, cáncer y trastornos mentales, entre ellos la depresión (Boivin & Boudreau, 2014).

La depresión es el resultado de interacciones complejas entre factores, psicosociales y biológicos, es una enfermedad frecuente en todo el mundo, y se calcula que afecta a más de 300 millones de personas. La depresión puede convertirse en un problema de salud serio, especialmente cuando es de larga duración y de intensidad moderada a grave, lo que puede alterar las actividades laborales, escolares y familiares del individuo (WHO, 2017).

Se ha observado que los pacientes con este trastorno presentan alteraciones en los ritmos circadianos de temperatura corporal, secreción hormonal y ciclo sueño-vigilia, por otro lado, la disrupción del sistema circadiano también se ha relacionado con la depresión, como se ha demostrado en ratones transgénicos

para genes reloj y en condiciones donde se altera el ciclo luz-oscuridad (Marco, Velarde, Llorente & Laviola, 2016).

Los estudios con humanos y animales han establecido que la depresión surge de alteraciones en regiones corticales y subcorticales, principalmente la corteza prefrontal, hipocampo, hipotálamo y amígdala (Anacker et al., 2016). Se han estudiado los procesos inflamatorios en el cerebro tales como la producción de citocinas proinflamatorias y la activación de las células gliales, asociados con la depresión (Woelfer, Kasties, Kahlfuss & Walter, 2018).

En la literatura se ha estudiado la desincronización circadiana y el efecto que tiene para promover depresión y ansiedad empleando diversos modelos experimentales, en esta investigación se utilizó un modelo de trabajo nocturno para explorar los mecanismos del sistema nervioso que asocian la desincronización circadiana con estados de depresión y neuroinflamación.

## **ANTECEDENTES**

### **1. Ritmos circadianos y sincronización**

Todos los mamíferos tienen la capacidad de adaptarse a su entorno anticipando cambios periódicos en el ambiente tales como la alternancia del ciclo luz-oscuridad. Esto es posible debido a la existencia de un sistema circadiano endógeno que funciona como un reloj que se sincroniza por señales ambientales, y establece un ritmo en diversas funciones fisiológicas que se repite cada 24 h. A estos cambios fisiológicos que siguen un ciclo diario, se les denominan *ritmos circadianos* (Blask et al., 2009). El sistema circadiano regula la temporalidad de todas las funciones fisiológicas, incluyendo la presión arterial, temperatura, hambre, estado de ánimo, funciones cognitivas y perfiles hormonales de cortisol y melatonina entre otras hormonas (Reid & Abbott, 2015).

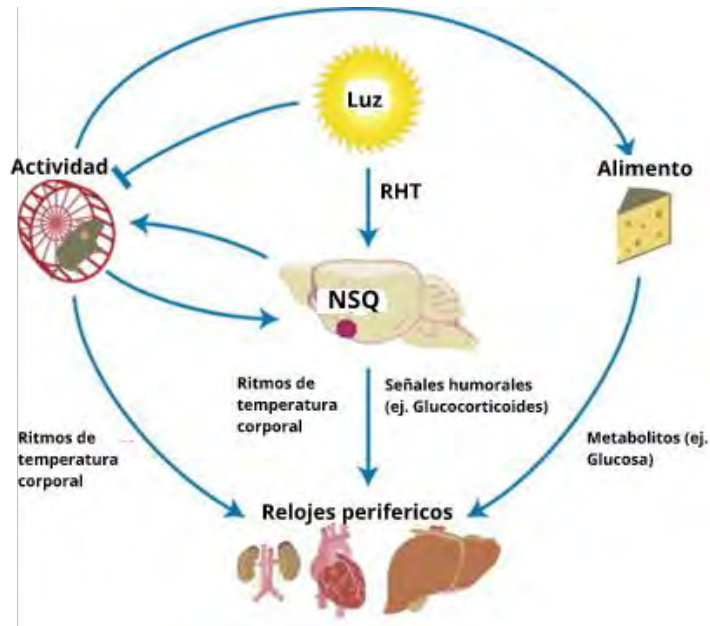
En mamíferos, los ritmos circadianos son generados por un reloj interno o marcapasos localizado en el hipotálamo, denominado núcleo supraquiasmático (NSQ). El NSQ se sincroniza principalmente al ciclo externo de luz-oscuridad por la acción de la luz ambiental transmitida desde la retina a través del tracto



retinohipotalámico hasta el NSQ. El NSQ se encarga de enviar la información de la luz al resto del cuerpo para mantener al sistema circadiano sincronizado (Fukuhara & Tosini, 2003). A los estímulos ambientales capaces de sincronizar o reajustar al NSQ se les llama sincronizadores o *zeitgeber* (palabra en alemán que significa indicador de tiempo) (Gruart, Delgado, Escobar & Roblero, 2002). Existen otros estímulos además del ciclo luz-oscuridad que pueden sincronizar al NSQ como los no fóticos por ejemplo la alimentación, interacciones sociales, privación del sueño y el ejercicio (Buijs, Salgado, Sabath & Escobar, 2013).

El sistema circadiano de los mamíferos está conformado por varios componentes: 1) un marcapasos o reloj biológico, componente endógeno de generación de la ritmicidad, 2) osciladores periféricos que son todos los sistemas y tejidos capaces de mostrar oscilaciones diarias; 3) vías de entrada de información fótica, 4) vías de entrada de información no fótica, 5) vías de salida desde el NSQ hacia los tejidos para mantener la sincronización interna (Cambras, 2006).

Las señales del oscilador central en el NSQ se transmiten a los osciladores periféricos en el cerebro y en tejidos como hígado, riñón, corazón, piel y retina (ver figura 1) a través de señales neurales (sistema nervioso autónomo) y señales humorales (melatonina, corticosterona). De esta forma, los relojes periféricos se sincronizan con la señal del NSQ y así se alinea todo el sistema circadiano con el ciclo externo de luz-oscuridad (Stratmann & Schibler, 2006). Por ejemplo, El NSQ aumenta o disminuye la temperatura corporal dependiendo de la hora del día a través del sistema nervioso autónomo y prepara a los músculos para el periodo de actividad (Buijs et al., 2006).

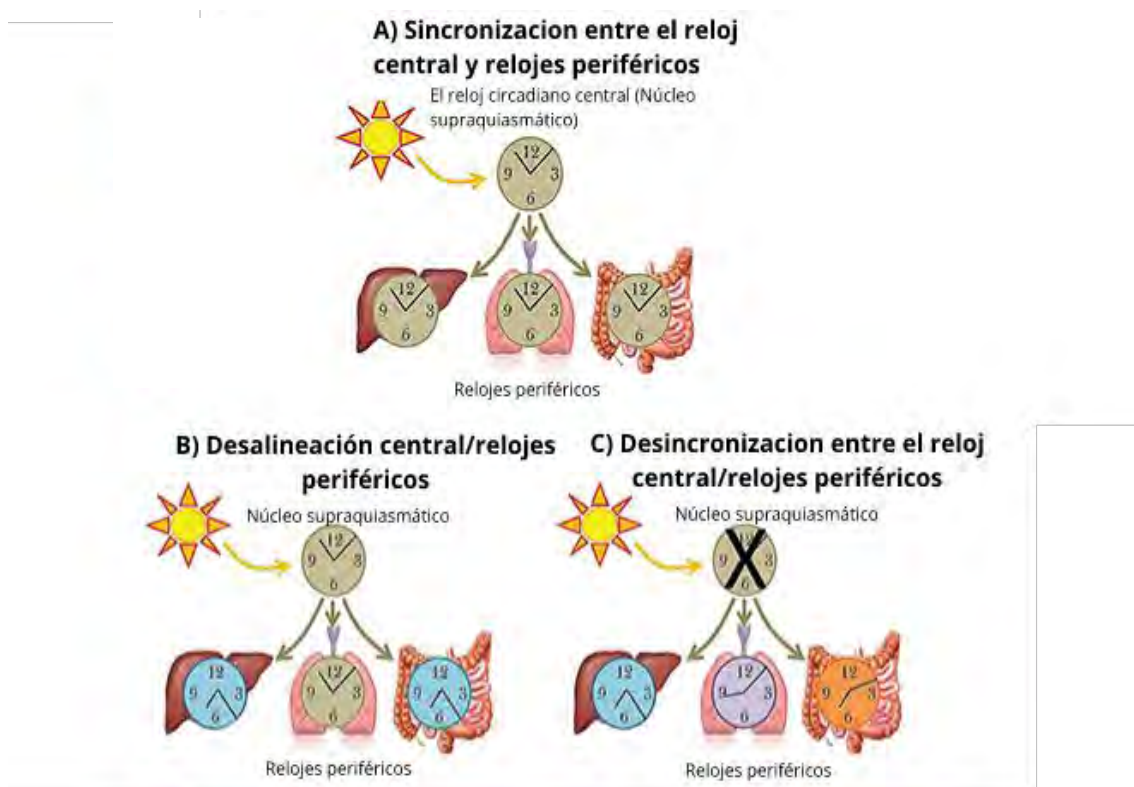


**Figura 1.** Ejemplo del sistema circadiano en roedores. Las neuronas del núcleo supraquiasmático reciben información de luz directamente de las células de la retina a través del tracto retinohipotalámico (RHT). El NSQ sincroniza los relojes periféricos en órganos como el hígado, corazón, riñón, etc. Hay sincronizadores no fóticos como la actividad y el alimento, que pueden estar sincronizando otros ritmos como la temperatura corporal. **Tomado y traducido de Schibler & Sassone (2002).**

El mecanismo por el cual, el NSQ genera los ritmos circadianos se denomina reloj molecular, éste funciona mediante asas de retroalimentación de transcripción-traducción de genes y proteínas. En mamíferos la ritmicidad circadiana es generada por un grupo de genes, llamados *genes reloj*, los cuales pueden generar sus propias oscilaciones y completar un ciclo de 24 hrs. Los genes reloj esenciales para el correcto funcionamiento del reloj biológicos son Clock y Bmal-1 y los genes relacionados con los ritmos circadianos son Per (1, 2,3) y Cry (1, 2,3) (Mazzoccoli, Paziienza & Vinciguerra, 2012). La luz causa la expresión de genes PER en el núcleo supraquiasmático, en osciladores periféricos y en células periféricas (por ejemplo, como hepatocitos, fibroblastos, leucocitos) expresándose rítmicamente y sus oscilaciones pueden seguir operando independientemente del NSQ (Albrecht, 2010).

## 2. Desincronización circadiana

La sincronización es importante para la supervivencia y adaptación de los organismos porque permite emitir respuestas con la intensidad adecuada a la hora del día. Por otro lado, cuando hay una pérdida de la coherencia entre las fluctuaciones generadas por el reloj y el medio externo (señales ambientales, los ciclos de alimentación y actividad), el sistema circadiano experimenta una desalineación llamada disrupción o desincronización (ver figura 2) (Ángeles-Castellanos, Rodríguez, Salgado, Escobar, 2007).



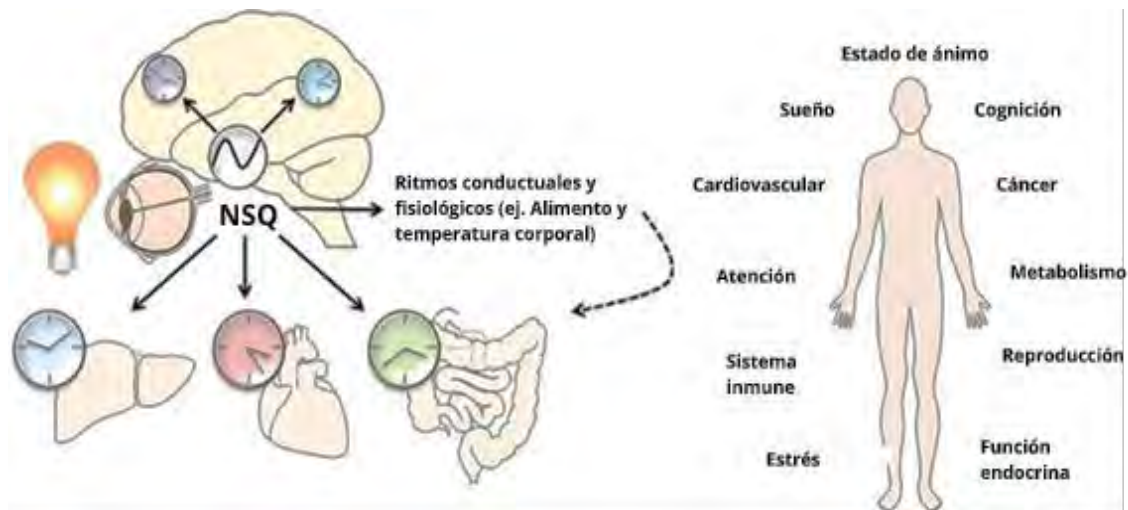
**Figura 2.** (A) En condiciones normales, el reloj circadiano central, el núcleo supraquiasmático que es arrastrado por la luz, regula los relojes circadianos periféricos. (B) La ingesta de alimento en tiempo equivocado puede causar desalineación entre el reloj circadiano central (arrastrado por la luz) y los relojes circadianos periféricos como el intestino y el hígado. (C) Cuando el reloj circadiano central se interrumpe, los relojes circadianos periféricos continuarán su ritmo, pero gradualmente se desalinearán entre sí. **Tomado y traducido de Voigt, Forsyth & Keshavarzian (2013).**

Los ejemplos más conocidos de desincronización circadiana son el *jet lag* y el trabajo nocturno o por turnos. En estos casos, las personas se ven obligadas a adherirse a un nuevo horario de actividad lo cual afecta su sincronización con el medio ambiente (Touitou, Reinberg & Touitou, 2017).

El *jet lag* o desfase de horario por viajes transmeridionales, se caracteriza por cambios del ciclo luz-oscuridad que inducen que los ritmos internos de un organismo se desfasen transitoriamente con el medio externo y entre sí. Las personas que experimentan jet lag, están expuestas a cambios constantes de luz en momentos en los que su reloj interno indica que debe ser de noche o viceversa. Lo anterior altera sus ritmos circadianos (Mahoney, 2010), forzando al reloj biológico a resincronizarse al nuevo horario de forma abrupta. Esta desincronización circadiana puede persistir durante días y con frecuencia se acompaña de alteraciones de salud como problemas gastrointestinales, síntomas de insomnio, fatiga y somnolencia durante el día (Golombek et al., 2013).

Los trabajadores nocturnos, por su parte, también se exponen a luz por la noche y modifican sus horarios de actividad. Se ha demostrado que la luz artificial por la noche causa supresión de la producción de la hormona melatonina (producida por la glándula pineal), deterioro en la calidad del sueño y una mayor propensión a desarrollar algunos tipos de cáncer. Estos efectos aumentan con la intensidad de la luz y la duración de la exposición (Cho et al., 2015).

Para los trabajadores nocturnos, el constante cambio del ciclo sueño-vigilia y el estar despierto por la noche y dormir durante el día no solo altera el ciclo de luz-oscuridad en relación con el reloj biológico, sino que también altera los patrones de alimentación. El desajuste entre el reloj endógeno y el ambiente externo tiene consecuencias negativas para la salud como enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico, riesgo de desarrollar cáncer, obesidad y trastornos psicológicos (Serra, 2013) (ver figura 3).



**Figura 3.** Consecuencias para la salud ante la exposición a la luz artificial por la noche. La exposición a la luz por la noche altera la sincronización del marcapasos central (NSQ) con los relojes periféricos en todo el cuerpo y cerebro. La desincronización circadiana se asocia con una serie de efectos negativos para la salud, incluidos los efectos en el estado de ánimo, el metabolismo, el riesgo de cáncer y alteraciones en el sistema inmune. **Tomado y traducido de Bedrosian & Nelson (2017).**

### *Modelos animales de desincronización circadiana*

Existen diversos modelos animales para estudiar la desincronización circadiana y sus efectos en el organismo, algunos de ellos son: condiciones constantes de luz, luz tenue por la noche, *jet-lag*, y actividad forzada en la fase de descanso que puede ser considerada como un modelo de trabajo nocturno en humanos.

### Luz artificial por la noche

La ausencia crónica de ciclos de luz-oscuridad (LD) es una condición anormal para la mayoría de los organismos, por lo que la exposición a condiciones constantes de luz (LL) es una estrategia muy utilizada para inducir la pérdida de los ritmos circadianos en roedores nocturnos, algunas de las alteraciones que se presentan ante este paradigma son: pérdida del ritmo en la actividad general, en la alimentación, el desacoplamiento de osciladores neuronales y la pérdida del ritmo en la expresión de los genes reloj (Wideman & Murphy, 2009).

### Luz tenue por la noche

Diversos estudios han evaluado la exposición a luz tenue por la noche (*dim light at night*) en roedores, por ejemplo, la exposición por 3 semanas a luz tenue por la noche (20 lux) en ratones disminuye la amplitud de PER1 en NSQ (Shuboni &

Yan, 2010). En ratones hembra expuestas a este paradigma (5 lux por la noche) durante 6 semanas, aumentaron su masa corporal comparado con ratones hembra mantenidas en un ciclo luz-oscuridad (LD), a pesar de que este último grupo consumió más alimento durante las dos últimas semanas del protocolo (Aubrecht, Jenkins & Nelson, 2015).

#### Jet lag y protocolos de desplazamiento del ciclo luz/oscuridad

Los protocolos de desplazamiento del ciclo luz-oscuridad han demostrado ser una condición disruptiva que genera desincronización del sistema circadiano, los ratones expuestos a avances crónicos de 6 horas de los ciclos LD cada 2 días presentan aumento de peso, mayor acumulación de grasa corporal y un aumento en los niveles de triglicéridos (Plano et al., 2017). En un paradigma de jet lag crónico en ratas, consistió en someterlos a adelantos semanales del ciclo LD de 6 horas durante 4 semanas, mostrando una disminución de la amplitud del ritmo PER1 en el NSQ (Yan, 2011).

#### Trabajo nocturno (shift work)

En el laboratorio de Ritmos Biológicos y Metabolismo de la Facultad de Medicina se ha desarrollado un modelo animal de trabajo nocturno que consiste en mantener a las ratas en un régimen de actividad forzada durante su fase de sueño. Después de 4 semanas en el régimen de actividad forzada, las ratas presentan desincronización circadiana que se caracteriza por esquemas de alimentación invertido y alteraciones metabólicas tales como pérdida de ritmicidad de glucosa y triglicéridos en circulación (Salgado Delgado et al., 2008).

### **3. Desincronización circadiana y trabajo nocturno o por turnos**

La luz eléctrica ha facilitado la actividad 24 horas/7días. Cada vez es más común que las personas estén expuestas a la luz eléctrica por la noche mediante el uso de dispositivos electrónicos, a la contaminación lumínica en zonas urbanas y a un horario de trabajo durante la noche o turnos rotatorios el cual requiere de iluminación eléctrica. En la actualidad aproximadamente el 20% de la población en los países industrializados se dedican al trabajo nocturno o por turnos (Haus & Smolensky, 2006).

No hay una definición clara del trabajo por turnos, pero en términos amplios, se le considera como todo sistema de empleo que se salga del tradicional horario 9:00 a 17:00 (aproximadamente), lo que incluye horarios vespertinos y nocturnos, turnos rotativos, turnos divididos, turnos de 24 horas, horarios irregulares. Algunos ejemplos de trabajadores que cursan por este tipo de esquemas son: personal de vuelo, personal de salud (enfermeras y médicos), personal de transporte, policías y vigilantes (Serra, 2013).

Diversos estudios epidemiológicos han sugerido que los trabajadores nocturnos son más propensos a padecer diversas enfermedades como algunos tipos de cáncer, obesidad, problemas cardiovasculares, hipertensión (Guo et al., 2013) y diabetes (Bannai et al., 2016). Se ha demostrado que los trabajadores nocturnos consumen más alimentos altos en grasa y azúcares comparado con los trabajadores de día (Yoshizaki et al., 2016). En los trabajadores nocturnos se han encontrado elevados niveles de marcadores inflamatorios en circulación como la interleucina (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Zielinski & Krueger, 2013). Además, los trabajadores nocturnos son más propensos a accidentes vehiculares, teniendo una mayor tasa de lesiones, de accidentes en el trabajo y errores de control de calidad (Suzuki et al., 2004).

Este sistema de trabajo promueve la disrupción de los ritmos circadianos. En los trabajadores nocturnos, el ciclo sueño-vigilia se ve afectado negativamente cuando su día externo ya no está sincronizado con un mayor alertamiento, en estos casos, los trabajadores nocturnos pueden presentar fatiga, menor rendimiento cognitivo (memoria de trabajo) (Ozdemir et al., 2013) y desarrollar estrés y depresión (Waterhouse, Edwards, Atkinson & Reilly, 2006). En un estudio por Lee y colaboradores (2016), se demostró que las enfermeras en esquema de trabajo por turnos son más propensas a padecer síntomas de depresión y un nivel más alto de ansiedad por factores estresantes en comparación con enfermeras sin trabajo por turnos, (Tsaras et al., 2018). De forma importante, muchas de estas personas sufren del trastorno de trabajo por turnos, el cual se caracteriza por alteraciones en el ciclo de sueño que pueden

resultar en síntomas de insomnio y somnolencia diurna (Drake, Roehrs, Richardson, Walsh & Roth, 2004).

#### *Trastorno de trabajo por turnos (Shift Worker Disorder-SWD).*

La Clasificación Internacional de los Trastornos del Sueño: Manual de Diagnóstico y Codificación (ICSD) lo definió como un trastorno del sueño del ritmo circadiano en 2005, este trastorno afecta aproximadamente al 10-30% de la población de los trabajadores por turnos (Thorpy, 2012).

El trastorno de trabajo por turnos es caracterizado por síntomas de insomnio y/o somnolencia excesiva que se asocia con el horario de trabajo, las personas que sufren de este trastorno tienen una duración de sueño y latencia de sueño más corta (tiempo transcurrido en el que se van a dormir y tienen su primer sueño MOR). Otros síntomas son la hiperreactividad a nuevos estímulos y una respuesta cerebral reducida a estímulos auditivos. La somnolencia excesiva, el insomnio y las alteraciones de los ritmos circadianos se asocian con una mayor morbilidad (accidentes y ausentismo) en los trabajadores nocturnos (Reid & Abbott, 2015b) por ello es importante diagnosticar a tiempo este trastorno para emplear técnicas que promuevan el sueño antes y después de los turnos de trabajo y evitar la somnolencia en horas de trabajo, así como promover la vigilia a través de siestas antes de un turno de trabajo para aumentar el estado de alerta y evitar accidentes de trabajo (Wright, Bogan, Wyatt, 2013).

#### *Modelos animales de trabajo nocturno*

El trabajo nocturno ha adquirido importancia ya que aún no se conocen todos los mecanismos y factores que pudieran estar relacionados con los problemas de salud que ocasiona. En diversos laboratorios se han desarrollado modelos de trabajo nocturno para simular las condiciones de este esquema de trabajo en roedores y de esta forma estudiar sus efectos en la salud. (Murphy et al., 2003; Gronli et al., 2017; Marti et al., 2016; Salgado et al., 2008)., a continuación, se describen cada uno de estos modelos:



1. En un modelo animal de trabajo nocturno desarrollado por Murphy y colaboradores en 2003, se demostró que las ratas que solo tenían acceso a alimento y a ruedas de actividad durante la fase de reposo (día) durante 22 días, presentaron mayor actividad en ingesta de alimento en esta fase, lo cual demuestra que este modelo ocasiona alteraciones similares a las observadas en los trabajadores nocturnos.
2. Marti y colaboradores en 2016 desarrollaron un protocolo de trabajo nocturno en donde las ratas fueron sometidas a 8 h de actividad forzada en ruedas giratorias durante su fase de reposo por 4 días con agua y alimento ad libitum. Las ratas que fueron forzadas a la actividad forzada durante la fase de reposo cambiaron su ingesta de alimento a las horas de trabajo, además se observó una pérdida de peso (Marti et al., 2016).
3. En un estudio por Gronli y colaboradores en 2017, se sometieron a las ratas a actividad forzada por 8 horas durante 4 días en ruedas giratorias. Un grupo de ratas eran forzadas a estar activas en las ruedas durante su fase de reposo (día) y el resto de las ratas se mantuvieron activas durante su fase regular (noche). Se demostró que las ratas que “trabajaron” durante su fase de reposo aumentaron el tiempo diario de vigilia y redujeron el tiempo de sueño en comparación con las ratas que trabajaron en su fase de actividad.
4. En nuestro laboratorio, hemos desarrollado un modelo animal para simular el trabajo nocturno y evaluar sus efectos en el organismo. Nuestro modelo consiste en someter a ratas a un régimen de actividad forzada (en ruedas giratorias) durante su fase de sueño (8hrs). Después de cuatro semanas de este protocolo, las ratas presentan desincronización circadiana, es decir, invierten su ingesta de alimento hacia el día, modifican su actividad general y se observa pérdida de ritmicidad de la glucosa y triglicéridos en circulación (Salgado Delgado et al., 2008b). De forma importante, se ha demostrado que los efectos de la actividad forzada durante la fase de descanso pueden prevenirse si el alimento sólo se encuentra disponible en su fase activa.

Como se ha descrito, los modelos de trabajo nocturno en general someten a las ratas en ruedas giratorias para generar actividad forzada y evitar que los animales duerman durante su fase de reposo, el tiempo de duración de los protocolos depende de cada laboratorio. En los modelos previamente mencionados se evalúan principalmente la actividad y algunas variables metabólicas, sin embargo, en ningún modelo de trabajo nocturno se ha explorado el comportamiento tipo depresivo, lo anterior es relevante debido a se ha demostrado que las personas que trabajan por turnos nocturnos padecen síntomas de depresión (Kalmbach, Pillai, Cheng, Arnedt & Drake, 2015).

#### **4. Depresión y alteración de ritmos circadianos**

Las alteraciones de los ritmos circadianos han estado fuertemente asociadas con los trastornos del estado de ánimo, especialmente la depresión (Bechtel, 2015). Se ha demostrado que las personas que viajan a través de distintas zonas horarias tienen una mayor probabilidad de desarrollar depresión en comparación con personas sin antecedentes de viajes recientes. Varios estudios en poblaciones de trabajadores nocturnos o por turnos han asociado estos esquemas de trabajo con afecto negativo y en específico, con una alta prevalencia de trastorno depresivo mayor, siendo esto más frecuente entre las mujeres que en los hombres (Bedrosian & Nelson, 2013).

De acuerdo al Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales V (DSM-V), para el diagnóstico del Trastorno Depresivo Mayor se deben presentar al menos 5 síntomas de los criterios de diagnóstico durante un periodo de dos semanas: 1) Estado de ánimo deprimido, 2) Disminución del interés o placer, 3) Pérdida o aumento de peso, 4) Insomnio o hipersomnia, 5) Agitación o retraso psicomotor, 6) Fatiga o pérdida de energía, 7) Sentimiento de inutilidad o culpabilidad, 8) Disminución de la capacidad de pensar o concentrarse, 9) Pensamientos recurrentes de muerte o ideas suicidas.

La depresión se manifiesta con un amplio espectro de síntomas, con diferentes características temporales y de gravedad, atribuyéndose alternativamente a

factores internos biológicos/genéticos y ambientales externos. La variación genética explica una porción significativa de la varianza en la depresión, sin embargo, este trastorno depende en gran medida de la influencia ambiental. Sus síntomas pueden representar subtipos de la enfermedad e investigarse por separado, por ejemplo, los rasgos psicológicos y temperamentos están asociados con muchas enfermedades, los síntomas cognitivos son característicos de otros trastornos graves y los grupos de síntomas no representan necesariamente un verdadero fondo biológico (Gonda et al., 2018).

Los pacientes deprimidos por su parte también exhiben alteraciones en sus ritmos circadianos y el ciclo sueño-vigilia. En sujetos sanos la melatonina es secretada en la noche por la glándula pineal el cual permite la regulación del ciclo-vigilia para promover el sueño, los pacientes con depresión tienen un retraso en la liberación de melatonina, además su temperatura corporal se encuentra elevada por la noche y sufren de alteraciones del sueño, por ejemplo, algunos no logran conciliar el sueño o se despiertan temprano por la mañana (Bunney & Potkin, 2008).

Algunas características clínicas de la depresión como anomalías del sueño, cambios del estado de ánimo diurno y alteraciones en la secreción hormonal, sugieren la participación del sistema circadiano. Un ejemplo de ello es la desregulación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA). El cortisol (hormona producida por la glándula adrenal) debe tener un nivel basal durante el día para mantenernos despiertos y activos, lo normal es que sus niveles se reduzcan gradualmente a medida que transcurre el día, alcanzando niveles mínimos cuando llega la hora de conciliar el sueño. En algunos estudios se han reportado niveles más bajos de cortisol matutino y niveles más altos por la noche en pacientes deprimidos (Keller et al., 2006).

Como se ha descrito, en las personas que están expuestas a luz por la noche se afecta el sistema circadiano y también su estado de ánimo, en el extremo opuesto, la depresión a menudo se considera en el contexto de individuos que experimentan muy poca iluminación (durante el día) como en el caso del trastorno afectivo estacional (Fonken & Nelson, 2011). El trastorno afectivo

estacional (SAD, por sus siglas en inglés) también conocido como depresión de invierno, es un trastorno en el que las personas tienen una salud mental normal durante la mayor parte del año, pero experimentan síntomas depresivos en invierno o con menor frecuencia en otras estaciones cada año. Esto se debe por un periodo de luz diaria más corto durante la temporada de invierno y se hipotetiza que los ritmos circadianos están desalineados y que la secreción de melatonina continúa por la mañana (Albrecht, 2010).

Para evaluar los efectos de la desincronización circadiana en las conductas tipo depresivas, se han desarrollado diversos modelos que se describen a continuación.

### *Modelos de alteraciones circadianas que inducen conductas tipo depresivas*

#### Luz constante

Se ha demostrado que la exposición a luz constante durante 7 semanas en ratas altera los ritmos circadianos, ocasiona un consumo reducido de agua con azúcar, incrementa el acicalamiento y los bolos fecales en la prueba de campo abierto (Tapia-Osorio, Salgado-Delgado, Ángeles-Castellanos, Escobar, 2013). La exposición a luz por la noche también afecta la memoria espacial (Wen-Pei et al., 2007). Lo anterior sugiere que la exposición a la luz constante induce conductas tipo depresiva y mayor ansiedad.

#### Luz tenue por la noche

La exposición de ratas diurnas a luz tenue por la noche (5 lux) durante 3 semanas, aumenta las conductas tipo depresivas tales como disminución de la preferencia de agua con azúcar y aumento en la latencia de inmovilidad en la prueba de nado forzado (las ratas sanas tienen más tiempo de nado y menor tiempo de inmovilidad), además afecta el aprendizaje, la memoria y se altera la morfología neuronal del hipocampo (Fonken, Kitsmiller & Smale, 2012). Con este modelo se ha demostrado que los ratones presentan conductas tipo depresivas tales como reducción del consumo de agua con azúcar y disminución de la expresión de BDNF en el hipocampo (Fonken & Nelson, 2013).

### Ciclos de luz-oscuridad menor a 24 horas.

Las manipulaciones en la duración de los ciclos de luz-oscuridad también han sido utilizados para inducir conductas tipo depresivas (Le Gates et al., 2012). Los ratones expuestos a un ciclo LD de 7 hrs (luz 3:5-3:5 oscuridad) presentaron un incremento en el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado y una disminución en niveles de expresión de los genes reloj Per1 y Per2 en la amígdala e hipocampo (Moriya, Sasaki, Ishigooka & Shibata, 2015).

En los modelos previamente descritos se manipula la luz o la duración del ciclo luz oscuridad como una estrategia para producir alteraciones circadianas y evaluar las conductas tipo depresivas, sin embargo, no existen estudios en donde se evalúen dichas conductas utilizando un modelo experimental de trabajo nocturno. Lo anterior es relevante ya que se ha descrito que los trabajadores nocturnos presentan síntomas asociados a depresión (Hall, Franche & Koehoorn, 2018). El estudio de las conductas tipo depresivas en modelos animales de trabajo nocturno es de suma importancia ya que nos permitirá evaluar los posibles mecanismos que promueven el desarrollo de trastornos afectivos ante procesos de desincronización, así como su posible tratamiento.

## **5. Circuito emocional en la depresión**

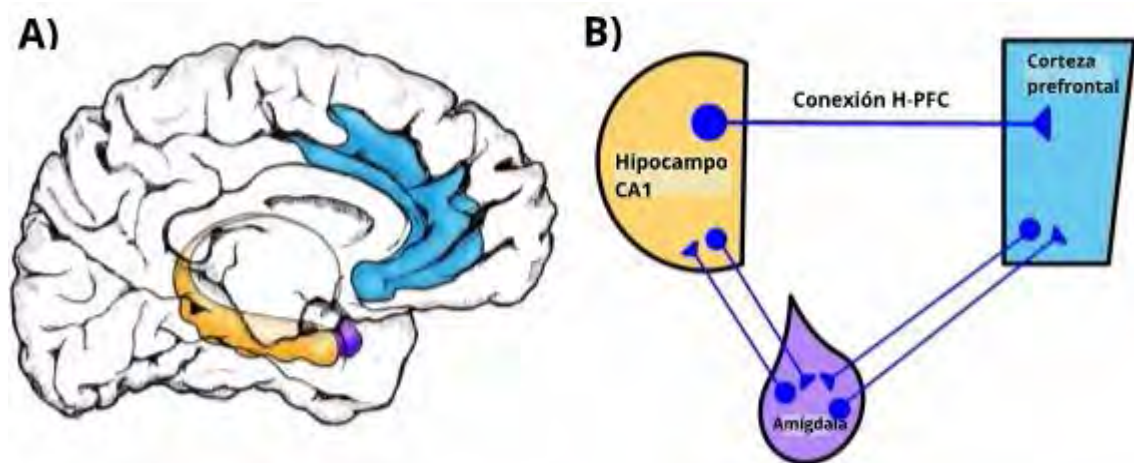
El trastorno depresivo mayor se caracteriza por afecto negativo y un procesamiento emocional negativo e implica anormalidades en el sistema neural que procesa los estímulos emocionales. Las principales estructuras que participan en este sistema son la corteza prefrontal (PFC), el hipocampo y la amígdala (Kong et al., 2013) (ver figura 3). Las regiones frontales de la corteza y el hipocampo pueden mediar los aspectos cognitivos de la depresión y los sentimientos de desesperanza, culpa y tendencias suicidas. El cuerpo estriado y la amígdala son importantes para las respuestas aversivas y gratificantes a los estímulos emocionales que podrían mediar la anhedonia, ansiedad y motivación reducida que presentan muchos pacientes con depresión (Berton & Nestler, 2006).

*El hipocampo* es la región del cerebro más comúnmente estudiada en la depresión, forma parte del sistema límbico y tiene conexiones con las regiones cerebrales relacionados con la depresión, como lo son la corteza prefrontal y amígdala. Además, el hipocampo contiene altos niveles de receptores para glucocorticoides y glutamato y regula al eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) lo que lo hace más susceptible al estrés y a la depresión (Li-Juan et al., 2014). Las conexiones entre el hipocampo y la PFC parecen ser disfuncionales en la depresión (Duman & Aghajanian, 2012). El hipocampo también tiene proyecciones glutamatérgicas hacia el núcleo accumbens y la amígdala que parecen tener un papel en la formación de recuerdos emocionales. En estudios de imagen se ha encontrado que el volumen del hipocampo se reduce en pacientes deprimidos (Liu et al., 2017).

*La corteza prefrontal (PFC)* es un importante centro básico de pensamiento y regulación del comportamiento y también está asociada con la depresión. Esta se divide en tres secciones principales 1) dorsolateral, 2) orbital y medial, 3) corteza cingulada anterior. La corteza medial (MPFc) y la dorsolateral (DLPFc) se conectan entre ellas a través de la circunvolución cingulada y el hipocampo. La MPFc es necesaria para la generación normal de emociones sociales, agresión y conductas sexuales y alimentarias, la corteza orbital tiene un papel en las correcciones de respuestas conductuales o emocionales (generadas por la amígdala). La DLPFc está implicada en el control cognitivo, resolviendo tareas complejas, y memoria de trabajo. En pacientes con depresión se sugiere una hiperactividad en la corteza prefrontal medial (MPFc) que se asocia con una mayor sensibilidad al dolor, ansiedad y tensión, mientras que la hipoactividad de la corteza prefrontal dorsolateral (DLPFc) puede producir apatía, déficits de atención y memoria de trabajo (Maletic et al., 2007).

*La amígdala* tiene como función la modulación afectiva y la codificación de la memoria (Heller, 2016). La amígdala también tiene una función en la consolidación de la memoria, especialmente el núcleo basolateral (BLA) que se ha visto implicado en el estrés y tiene proyecciones hacia otras regiones del cerebro como el núcleo caudado y el hipocampo los cuales están involucradas con el aprendizaje (Roozendaal, McEwen & Chattarji, 2009). En la depresión hay

una desregulación emocional que involucra al sistema que se encarga del procesamiento emocional, incluidos la PFC y la amígdala. Los estudios con resonancia magnética funcional (fMRI) han demostrado una activación en la amígdala y disminución de actividad en la PFC en pacientes deprimidos (Tang et al., 2013).



**Figura 4. A)** Imagen del cerebro humano donde se sitúan la amígdala (morado), corteza prefrontal (azul) e hipocampo (amarillo). **B)** Esquema que muestra la conectividad general del hipocampo, amígdala y corteza prefrontal en la rata, con la vía H-PFC que se proyecta desde la región ventral de CA1 del hipocampo hasta la corteza prefrontal (PFC). Las conexiones neuronales son unidireccionales y glutamatérgicas. El hipocampo ventral también tiene conexiones bidireccionales con la amígdala, y la amígdala tiene conexiones bidireccionales con la corteza prefrontal. **Tomado y traducido de Leuner & Shors (2013).**

Los estudios con animales han encontrado que las neuronas en el hipocampo, PFC y amígdala, son sensibles al estrés y a estímulos inductores de ansiedad y conductas similares a la depresión. El estrés crónico en ratas causa una reducción en la ramificación dendrítica en hipocampo y la PFC. La amígdala que está vinculada al miedo y ansiedad, en contraste con el hipocampo y la PFC, exhibe hipertrofia después del estrés y se observa un aumento el número de espinas en las neuronas de la amígdala basolateral en ratas (Leuner & Shors, 2013).

En un estudio en donde las ratas fueron expuestas a estrés crónico por medio de factores estresantes como privación de agua y alimento, iluminación constante, jaula sucia etc., durante 8 semanas, se demostró que las ratas presentaron conductas tipo depresivas tales como anhedonia y desesperanza,

asociadas con una reducción en la plasticidad sináptica en el área CA1 del hipocampo y en la amígdala basolateral demostrando que el estrés afecta el circuito emocional (Li et al., 2015). Las alteraciones de ritmos circadianos también se han demostrado como estresores, por ejemplo, las ratas desincronizadas mediante un ciclo LD de 22 hrs (11: luz, 11: oscuridad muestran comportamiento tipo depresivo tales como anhedonia, disfunción sexual y mayor inmovilidad en la prueba de nado forzado, así como altos niveles de monoaminas (noradrenalina, serotonina) en la corteza prefrontal (Ben-Hamo et al., 2017).

## **6. Neuroinflamación asociada a la depresión**

La neuroinflamación es un mecanismo de defensa normal para proteger al sistema nervioso central contra daño, infección, lesión o enfermedad (Skaper, Facci, Zusso & Giusti, 2018). En la mayoría de los casos, es un proceso benéfico que se resuelve por sí mismo una vez que se ha eliminado la amenaza y se restaura la homeostasis. Los astrocitos y la microglía juegan un papel importante en los procesos neuroinflamatorios, ambos se activan en respuesta a varios estímulos lo que resulta en algunos cambios morfológicos como hipertrofia y aumento de la proteína GFAP (*astrocitos*) o del marcador IBA (*microglía*) (Allan & Rothwell, 2003).

### *Astrocitos*

Los astrocitos participan en una variedad de procesos fisiológicos esenciales en el cerebro, proporcionan soporte estructural a las neuronas, participan en la formación y maduración de sinapsis, control de la homeostasis de iones y modulan la plasticidad sináptica. Además, se ha demostrado su contribución en el procesamiento de la información y formación de memoria en el cerebro (Dossi, Vasile & Rouach, 2017a). Hay evidencia de que los astrocitos son esenciales para la formación y función de desarrollar sinapsis al liberar señales moleculares como la trombospondina y también parecen influir en la poda sináptica (Barres, 2008) a través de la liberación de una variedad de gliotransmisores como glutamato, D-serina, ATP, GABA y el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), los astrocitos son capaces de regular la plasticidad sináptica (Singh & Abraham, 2017).



La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) es una proteína filamentosa intermedia que expresa y regula la morfología de los astrocitos (Finch, 2003). En procesos neuroinflamatorios los astrocitos se activan en respuesta a daño o lesiones. Un astrocito activo libera una gama de mediadores inflamatorios tales como citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias. La interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) generalmente se consideran citocinas proinflamatorias que promueven neurotoxicidad, mientras que otras como la interleucina 6 (IL-6) y el factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) han sido consideradas citocinas antiinflamatorias implicadas en procesos neuroprotectores (Jeon & Kim, 2016).

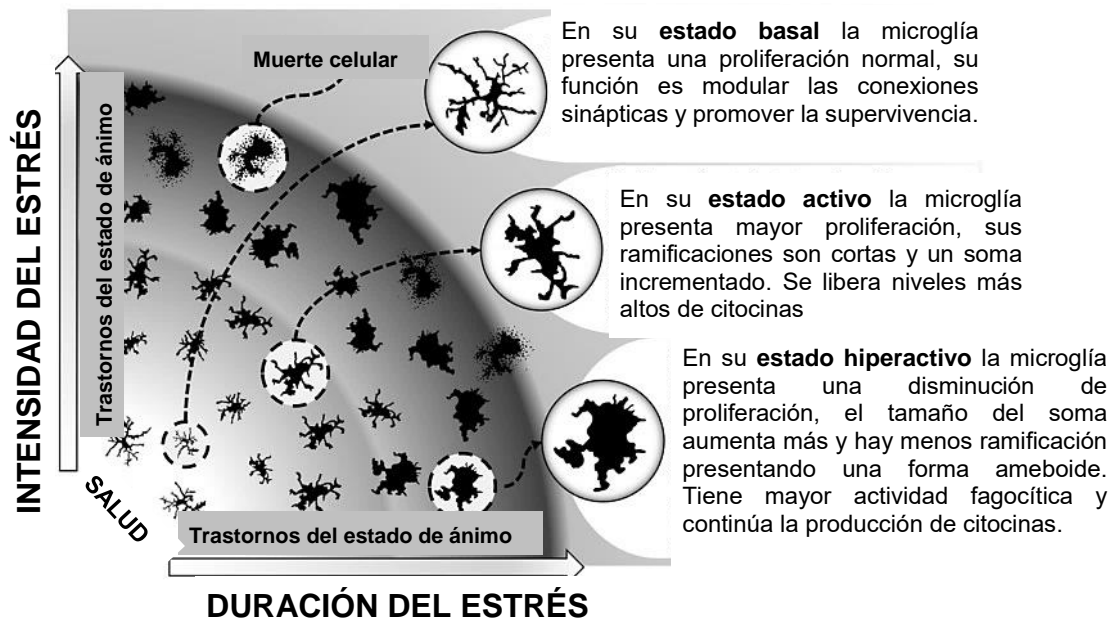
En personas con Trastorno Depresivo Mayor se han encontrado alteraciones en astrocitos, específicamente en su densidad, morfología y expresión de la proteína de GFAP. Varias regiones del cerebro de pacientes deprimidos muestran una población reducida de astrocitos en la corteza prefrontal dorsolateral y en la corteza cingulada anterior y la amígdala, mientras que en el hipocampo y en la circunvolución dentada, se ha encontrado un aumento en el número de astrocitos (Dossi, Vasile & Rouach, 2017b). En modelos animales expuestos a estrés en la vida temprana para medir conductas tipo depresivas se ha observado una disminución de densidad de astrocitos en el hipocampo (Saavedra, Navarro & Torner, 2018). En otro estudio que utilizó un paradigma de inyección de corticosterona por 5 semanas para desarrollar un modelo de depresión en ratones, se observó que los animales presentaron un comportamiento similar a la ansiedad y la depresión, acompañado de una disminución en el número de astrocitos en el hipocampo (Zhao et al., 2018).

### *Microglía*

La microglía son los macrófagos residentes en el Sistema Nervioso Central (SCN) que analizan constantemente su entorno en preparación para lesión o insultos “inmunovigilancia” y se han estudiado como mediadores de respuestas inflamatoria. En términos homeostáticos, la microglía regula muerte celular, la neurogénesis y envuelve activamente el material sináptico (Skaper et al., 2018).

La microglía contribuye de manera prominente a las patologías del SNC como Enfermedad de Parkinson y depresión, incluyendo su establecimiento, perpetuación y resolución. La microglía se activa durante condiciones patológicas, como infección, lesión y neurodegeneración para ejecutar procesos inflamatorios, protectores y recuperativos (Shemer, Erny, Jung & Prinz, 2015). La estructura y función de la microglía se altera cuando esta se activa, lo cual se caracteriza por: 1) movimiento rápido y específico de procesos microgliales hacia el sitio de infección o lesión, 2) proliferación y aumento de su densidad, 3) alteraciones morfológicas como agrandamiento del soma, acortamiento de los procesos distales asumiendo una morfología ameboide, 4) producción y secreción de citocinas inflamatorias (Yirmiya, Rimmerman & Reshef, 2015b) (ver figura 4).

En estudios post-mortem de pacientes deprimidos, se ha observado una mayor activación microglial en la corteza cingulada anterior, corteza prefrontal y en el hipocampo (Haarman et al., 2014). En ratas expuestas a estrés para inducir conductas similares a la depresión, se observó la activación microglial en la corteza prefrontal, amígdala, hipocampo y giro dentado (Delpech et al., 2015). En experimentos con ratones expuestos a estrés crónico se demostró un comportamiento depresivo caracterizado por la disminución del consumo de agua con azúcar y exploración social además de proliferación y activación microglial en el hipocampo (Kreisel et al., 2014). Se ha demostrado que existe una regulación circadiana de procesos inflamatorios en el sistema nervioso central, por ejemplo, las ratas que se les inyectó lipopolisacárido (LPS, un componente bacteriano) durante la fase de luz mostraron conducta de enfermedad, esto quiere decir, una disminución en la conducta de exploración social ante una rata intrusa, pérdida de masa corporal y una disminución del consumo de agua con azúcar en comparación con las ratas que fueron inyectadas durante la fase oscura, así como una elevada expresión del ARNm de citocinas como IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL6 e IL1R1 en microglía hipocampal durante la fase de luz (Fonken et al., 2015).



Diferentes etapas de activación de la microglía causada por la intensidad y duración de factores estresantes. En el estado basal, la microglía se prepara para situaciones de estrés. Cuando se activa, se liberan niveles mediadores inflamatorios (citocinas), si la microglía continúa hiperactiva se sigue liberando mediadores proinflamatorios. **Tomado y traducido de Stein y colaboradores (2017).**

## 7. Modelos animales de depresión y pruebas conductuales

A lo largo de los años se han diseñado modelos animales para abarcar ciertos aspectos del comportamiento similar a la depresión humana, pero es imposible imitar algunos síntomas de la depresión, por ejemplo, pensamiento de culpa y suicidio (Slattery & Cryan, 2017). Los modelos animales de depresión se han desarrollado principalmente a base de exposición crónica o aguda al estrés. Algunos de los modelos más utilizados son:

- I. *Estrés leve crónico impredecible (UCMS)*: El objetivo del método UCMS es desarrollar crónicamente el estado depresivo en respuesta a estímulos de estrés impredecibles. La rata o el ratón recibe una serie de diferentes factores estresantes durante un período de varias semanas. Los factores estresantes incluyen principalmente la privación de alimentos y agua, la iluminación durante la noche y la inclinación de la jaula. Los síntomas del modelo incluyen principalmente la disminución del consumo de agua con azúcar, el aumento del umbral de autoestimulación intracraneal, la pérdida de peso y apetito, etc. (Willner, 2017).

- II. *Modelo de estrés de restricción crónica:* En este modelo, el roedor experimental es introducido en un restrictor de acrílico o malla. . Para un estresor más crónico y predecible, los animales son restringidos por un mínimo de 2 horas por día durante 14 o 21 días. Se ha demostrado que este modelo induce atrofia de las células piramidales del hipocampo, aumento de corticosteroides y comportamiento tipo depresivo (Zhang et al., 2014).
  
- I. *Modelo de estrés en la vida temprana:* Uno de los modelos que se utiliza para generar estrés en la vida temprana es la separación materna, la cual consiste en separar a la cría de la madre durante el periodo posnatal. En diversos laboratorios se utilizan diferentes tiempos de separación que varían desde horas a días, interfiriendo con la relación madre-cría (Levine, 2005). Este modelo induce cambios en el sistema serotoninérgico, y una expresión disminuida del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés) en la corteza prefrontal y el hipocampo. Se ha demostrado que los animales presentan comportamientos similares a la depresión y ansiedad en la edad adulta (Daniels, Pietersen, Carstens & Stein, 2004). El modelo de aislamiento social se considera comúnmente como un factor de estrés en la vida temprana, consiste en separar a los roedores a partir del día 21 y alojarlos en jaulas individuales durante un determinado tiempo (1-5 semanas). Mediante este modelo se ha observado que los animales muestran conductas de ansiedad y tipo depresivas en la prueba de campo abierto, nado forzado y test de suspensión de la cola (Djordjevic, Djordjevic, Adzic & Radojcic, 2012).
  
- III. *Modelo de derrota social:* En este modelo se usa el conflicto social como un estresor con la finalidad de producir estrés emocional y psicológico. El modelo consiste en introducir un roedor macho en la jaula de un roedor macho mayor, agresivo y dominante. El intruso es atacado y derrotado por el residente. Una vez que se ha producido el ataque físico o ataque

de amenaza, los residentes y los intrusos se separan con una barrera. Posteriormente, el roedor intruso se expone a un agresor diferente. Los roedores derrotados muestran anhedonia, así como una serie de cambios fisiológicos que incluyen disminución del comportamiento sexual, mayor conducta defensiva y aumento de la ansiedad (Chaouloff, 2013).

IV. *Modelos de alteraciones circadianas*: Diversos estudios sugieren que las alteraciones de los ritmos circadianos son un tipo de estrés y, por lo tanto, también se han evaluado las conductas tipo depresivas en modelos animales de alteraciones circadianas tales como animales sometidos a luz constante durante 7 semanas (Tapia-Osorio, Salgado-Delgado, Ángeles-Castellanos, Escobar, 2013b) a luz tenue por 4 semanas (Fonken & Nelson, 2013) o ciclos de luz-oscuridad < 24 hrs (Le Gates et al., 2012). En todos estos modelos, se ha observado que los animales presentan conductas tipo depresivas y de ansiedad tales como: mayor acicalamiento y bolos fecales, un incremento en el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado y disminución del consumo de agua con azúcar.

Algunas de las pruebas conductuales para medir conductas tipo depresivas tales como desesperanza, ansiedad, actividad general, memoria y anhedonia son empleadas después de haber sometido a los animales a diferentes paradigmas de estrés o modelos de depresión. Las pruebas conductuales más comunes son:

*Prueba de Nado forzado*: Esta prueba evalúa la desesperación en función de cómo reacciona un roedor ante un entorno desagradable. Se coloca al roedor en un cilindro con agua por un determinado tiempo (aproximadamente 5 min), normalmente el roedor tratará de escapar, sin embargo, si presenta un comportamiento depresivo, simplemente flotará sin tratar de escapar hasta que lo saquen del agua (Wang, Timberlake, Prall & Dwivedi, 2017).

*Prueba de suspensión de cola:* En esta prueba se mide la respuesta ante una situación de estrés, los roedores se suspenden de la cola con cinta adhesiva en una barra horizontal por 5 min (aproximadamente) y se observa el tiempo de inmovilidad. Si el animal muestra un comportamiento depresivo, tendrá un aumento en el tiempo de inmovilidad (Cryan, Mombereau & Vassout, 2005).

*Prueba de laberinto elevado:* Esta prueba se utiliza para evaluar la ansiedad. Se coloca al roedor en el centro de un laberinto de cuatro brazos, en forma de cruz, el tiempo es variado de acuerdo a cada laboratorio. La ansiedad se mide por la cantidad de tiempo que el roedor pasa en los brazos cerrados frente a los brazos abiertos. Normalmente, un roedor no ansioso explora más los brazos abiertos, mientras que uno ansioso permanece en los brazos cerrados o solo se asoma desde el centro (Padurariu et al., 2017).

*Prueba de campo abierto:* Evalúa la ansiedad y la actividad general de los roedores. Se coloca al animal en el centro o en la esquina de una arena (cuadrada o circular) para que explore por 5 min. Un roedor no ansioso explorará más el centro de la arena, sin embargo, uno ansioso, permanecerá más en las esquinas. Otras conductas que se miden son: acicalamiento, bolos fecales y levantamiento (Prut & Belzung, 2003).

*Prueba de interacción social:* Se utiliza para evaluar la ansiedad. Los animales se colocan en una arena, dos ratas de diferentes grupos durante 5-10 min. El animal no ansioso interactuará más y tendrá un mayor número de contactos con el otro animal (File & Seth, 2003).

*Prueba de reconocimiento de objeto novedoso:* Esta prueba evalúa la memoria de los roedores. En la fase de habituación se coloca al roedor en una arena parecida al campo abierto donde se encuentran dos objetos iguales para que explore los objetos por 5-10 min. En la fase de prueba, se cambia uno de los objetos y se coloca un objeto novedoso. Se mide el tiempo que pasa el roedor explorando cada uno de los objetos, si el animal presenta comportamiento tipo depresivo, explorara menos el objeto novedoso (Lueptow, 2017).

*Prueba de anhedonia:* La pérdida de interés o placer a ciertos estímulos puede medirse mediante la prueba de preferencia a agua con azúcar. Los roedores tienen preferencia a agua con azúcar, si el animal muestra una falta de preferencia se dice que presenta anhedonia, un síntoma principal de la depresión (Rizvi, Pizzagalli, Sproule & Kennedy, 2016).

En algunos modelos animales se han evaluado áreas cerebrales que pueden estar involucradas en la depresión de acuerdo a la conducta que está asociada a la prueba elegida y que permita estudiar esta relación, especialmente áreas asociadas al circuito emocional como el hipocampo, corteza prefrontal, amígdala, hipotálamo, por mencionar algunas que se han estudiado en paradigmas de estrés que inducen conductas tipo depresivas y de ansiedad (Bath, 2017) (ver tabla 1).

**Tabla 1.** Se muestran áreas cerebrales implicadas en algunas pruebas conductuales para evaluar conductas tipo depresivas en animales.

<b>Pruebas conductuales</b>	<b>Áreas cerebrales</b>
<i>Campo abierto</i>	Región CA1 de hipocampo ventral, Hipotálamo lateral y Amígdala basolateral: relacionado a la regulación del estado de ansiedad y comportamientos relacionado a ella (Hale et al., 2008).
<i>Reconocimiento de objetos novedosos</i>	Hipocampo: Se relaciona con la consolidación de la memoria, es responsable del reconocimiento de objetos a largo plazo. Corteza perirrinal: Está involucrada en el reconocimiento de objetos después de intervalos cortos de retención. (Cohen & Stackman, 2015).

<i>Interacción social</i>	<p>Amígdala basolateral y corteza prefrontal: Se relaciona con la regulación de conductas sociales (Paine, Swedlon, Swetschinski, 2017).</p> <p>Amígdala basolateral y corteza prefrontal medial: Modulan ansiedad y conductas sociales (Félix-Ortiz et al., 2016).</p>
<i>Test de anhedonia</i>	<p>Hábenua lateral, Área tegmental ventral, Corteza prefrontal (humanos): Están asociadas a un tono hedónico bajo que es la capacidad reducida para experimentar placer (Sternat &amp; Katzman, 2016).</p>

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente se ha reportado que el 20% de la población desempeña algún tipo de trabajo nocturno o trabajo por turnos (Haus & Smolensky, 2006). El trabajo nocturno provoca alteración de los ritmos circadianos y se ha asociado con un mayor riesgo a desarrollar diversas enfermedades tales como problemas cardiovasculares, gastrointestinales, obesidad, cáncer, así como alteraciones del estado de ánimo tales como el estrés y la depresión (Salgado, Fuentes & Escobar, 2009). En estudios post mortem de personas depresivas se han encontrado activación de células gliales como astrocitos y microglía en corteza prefrontal, hipocampo, amígdala, giro dentado, entre otras estructuras cerebrales (Haarman et al., 2014)

Existen modelos animales de alteraciones circadianas tales como la exposición de roedores a luz constante (Tapia et al., 2013) a luz tenue por la noche (Fonken & Nelson, 2013) y/o ciclos de luz-oscuridad < 24 hrs (Le Gates et al., 2012) con los cuales se ha demostrado la inducción de conductas tipo depresivas y de ansiedad. En nuestro laboratorio de Ritmos Biológicos y Metabolismo, se ha diseñado un protocolo de actividad forzada en ratas, el cual simula el trabajo nocturno en humanos (Salgado et al., 2008). Con este modelo hemos demostrado que las ratas sufren de desincronización circadiana caracterizada



por esquemas de alimentación invertido y alteraciones metabólicas, sin embargo, en los modelos de trabajo nocturno no se ha evaluado el comportamiento tipo depresivo ni los mecanismos asociados a éste.

Con este estudio proponemos explorar con un modelo experimental de trabajo nocturno los mecanismos del sistema nervioso que asocian la desincronización circadiana con conductas similares a la depresión y estados de neuroinflamación.

## **OBJETIVOS**

### *General*

- ❑ Determinar modificaciones a nivel del sistema nervioso central, así como cambios que indiquen conducta tipo depresiva ocasionados por la desincronización circadiana con un modelo de actividad forzada en ratas macho.

### *Específicos*

- ❑ Determinar conductas tipo depresivas en un protocolo de actividad forzada (trabajo nocturno) en ratas macho.
- ❑ Identificar marcadores de neuroinflamación en el cerebro de ratas macho expuestas a un protocolo de actividad forzada (trabajo nocturno).
- ❑ Observar si el alimento actúa como sincronizador en el protocolo de actividad forzada (trabajo nocturno) y previene conductas tipo depresivas y la neuroinflamación en el cerebro.

## **HIPÓTESIS**

Ho. El protocolo de actividad forzada ocasionará cambios a nivel del sistema nervioso y a nivel conductual, promoviendo conductas tipo depresivas en ratas macho.

Ho. El protocolo de actividad forzada inducirá neuroinflamación en el cerebro de ratas macho.

Ho. El alimento sincronizará a las ratas en un protocolo de actividad forzada y de esta forma prevendrá las conductas tipo depresivas y la neuroinflamación.

## **MATERIALES Y MÉTODO**

### *Sujetos y condiciones generales*

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 200 g, las cuales fueron alojadas en cajas individuales (40x50x20 cm) en lockers de monitoreo conductual ubicados en nuestro bioterio del departamento de Anatomía en la Facultad de Medicina. Las ratas fueron mantenidas en un ciclo regular luz /oscuridad (LD 12:12 h), con las luces encendidas a las 7:00 horas (Zeitgeber Time 0; ZT0) y luces apagadas a las 19:00 horas (ZT12), con condiciones de temperatura controlada (22±1 °C), y con libre acceso a comida chow estándar (Rodent laboratory chow 5001, Purina, México) y agua. Los experimentos realizados en esta tesis fueron aprobados por la comisión de investigación y de ética de la Facultad de Medicina de la UNAM.

### *Diseño experimental*

Para la línea base, todas las ratas fueron monitoreadas en sus jaulas durante 8-10 días en condiciones LD. Posteriormente fueron asignadas de forma aleatoria a uno de tres grupos: ratas control (CTRL; n=10), las cuales se mantuvieron en su caja habitación durante las 6 semanas de duración de los protocolos de trabajo nocturno. Las ratas de trabajo nocturno (TN; n=10) y trabajo nocturno más alimento restringido durante la noche (TN-RN; n=10), se mantuvieron activas durante su fase de descanso con la finalidad de mimetizar las condiciones de los humanos que trabajan de noche, esto se realizó durante 6 semanas.

Se evaluó el peso corporal y el consumo de alimento semanalmente, las conductas tipo depresivas se evaluaron por medio de una batería de pruebas conductuales que incluyó: campo abierto, reconocimiento de objeto novedoso, interacción social y consumo de agua con azúcar, en esta última prueba se realizaron exposiciones durante la línea base y sexta semana del protocolo. Todas las pruebas conductuales se realizaron durante la fase de actividad (noche) entre ZT12-ZT13 bajo luz roja a la quinta semana del protocolo. Al finalizar el protocolo de trabajo nocturno (semana 6), se obtuvo una muestra de sangre en ZT10 para determinar los niveles corticosterona, posteriormente se

sacrificaron a los animales por medio de la inyección de una sobredosis de pentobarbital intraperitoneal y se obtuvieron los cerebros para evaluar marcadores de neuroinflamación (Figura 1).



Figura 1. Esquema representativo del diseño experimental.

#### *Protocolo de actividad forzada (trabajo nocturno)*

Para inducir actividad, las ratas fueron colocadas de lunes a viernes en un cilindro giratorio durante su fase de reposo por 8 horas a partir de las 9:00 am hasta las 17:00 pm (ZT2-ZT10). Cada cilindro tiene 4 subdivisiones, lo que permite el alojamiento individual de 4 ratas. Los cilindros giran con una velocidad de 1 revolución cada 3 min con lo que se consigue que las ratas se mantengan despiertas. En los cilindros las ratas tienen libre acceso a agua y alimento. Después de las 8 horas, las ratas fueron regresadas a sus jaulas. Los fines de semana todas las ratas se mantuvieron sin alteraciones en sus jaulas.

#### *Restricción de alimento*

El grupo control y el grupo de trabajo nocturno (TN) tuvieron acceso *ad libitum* al alimento y agua durante todo el protocolo, el grupo trabajo nocturno con restricción de alimento en la noche (TN-RN) solamente tuvo acceso al alimento en sus jaulas de ZT12 a ZT2. Los fines de semana, todos los grupos se mantuvieron en sus jaulas con libre acceso al agua y al alimento.

### *Peso corporal e ingesta de alimento*

Las ratas fueron pesadas antes de comenzar la línea base y cada semana durante el protocolo de trabajo nocturno. La ingesta de alimento se monitoreó cada semana durante 24 horas separando el consumo diurno y nocturno.

### *Actividad general*

La actividad general se registró con sensores de movimiento colocados bajo las jaulas donde las ratas se alojaron. Estos sensores permitieron registrar el movimiento durante 24 horas, los pulsos de actividad fueron colectados por una computadora que los almacenó cada minuto y nos permitió elaborar un perfil temporal de actividad. La actividad general se monitoreó durante la línea base (LB) y las 6 semanas del protocolo. Se elaboró un porcentaje de cambio de actividad general durante todo el experimento con respecto a su línea base, para lo cual se dividió el número de cuentas de la última semana entre el número de cuentas de la línea base x 100. Se evaluó el porcentaje de cambio de actividad diurna y nocturna entre semana y fines de semana.

## **Pruebas conductuales**

### *Prueba de campo abierto*

Para medir conductas de ansiedad se utilizó un campo abierto de 59.3 cm de ancho y 59.5 de largo dividido en 15 cuadros. En un inicio las ratas fueron colocadas en una esquina del campo y se les dejó por explorar por 5 min, durante la prueba se evaluaron las conductas: **acicalamiento, levantamiento, cruces al centro del campo y número de bolos fecales**. El aumento en acicalamiento, un número reducido de pasos al centro, levantamiento y bolos fecales indican un estado de ansiedad. El campo abierto se limpió después de cada sesión (entre un animal y otro) y se obtuvieron grabaciones en video de 5 minutos por cada rata. Después se elaboró una estrategia llamada muestreo instantáneo, para este método los videos fueron divididos en intervalos de 5 segundos, la conducta se registraba al pausar o cortar el video a los 5 seg, con este método se obtuvieron al final del registro 60 conductas. Se utilizó un método de doble ciego para evitar sesgos de parte del experimentador.

### *Prueba de reconocimiento de objeto novedoso*

Para evaluar la memoria de reconocimiento en las ratas. En el día 1 de la prueba, las ratas se habituaron al campo abierto durante 5 min sin ningún objeto. La prueba consistió en una fase de muestra (2 sesiones) y una fase de prueba (1 sesión) estas fases se separaron por un intervalo de tiempo de 24 horas. En la fase de muestra, dos objetos idénticos de textura, tamaño y forma (*legos cuadrados de color azul*) fueron colocados en diagonal en el campo abierto y la rata se colocó en una esquina del campo. A cada rata se le permitió explorar libremente estos objetos durante 5 min. Después de la fase de muestra la rata se retiró del campo y se devolvió a su jaula. El campo abierto se limpió después de cada sesión (entre un animal y otro).

En la fase de prueba, dos objetos fueron colocados en las mismas posiciones que en la fase de muestra. Uno de los objetos era el objeto familiar, que fue presentado en la fase de muestra, y el otro fue un objeto novedoso con diferente textura, tamaño y forma (*un cilindro de alambre*); el animal se colocó en el campo abierto y se le permitió la exploración de los objetos durante 5 min (ver figura 2). El campo abierto se limpió después de cada sesión (entre un animal y otro) y se obtuvieron grabaciones en video con una duración de 5 minutos. La exploración de objetos se define como: **oler o tocar el objeto con la nariz y patas**. Se asume que el animal dedicará más tiempo a explorar el objeto novedoso, pero que en un estado tipo depresivo el animal explorará más el objeto familiar.

Los resultados se evaluaron por medio de un índice de discriminación (DI), el cual se calculó por medio de la siguiente ecuación (Cohen & Stackman, 2015):

**DI= (TN- TF) / (TN+TF)** en donde:

TN = tiempo dedicado a explorar el objeto novedoso.

TF = tiempo dedicado a explorar el objeto familiar.



**Figura 1.** Prueba de reconocimiento de objetos novedosos. En la fase de muestra se colocó dos objetos iguales (legos azules) en diagonal, durante la fase prueba se colocó un objeto familiar y un objeto novedoso (cilindro de alambre).

### *Interacción social*

En roedores, la prueba de interacción social se utiliza para evaluar comportamientos de agresión similares a la ansiedad y depresión (File y Seth, 2003). Esta prueba consiste en una fase de habituación y otra de prueba.

Las ratas se habituaron durante 5 min al campo abierto 24 horas antes, la fase de prueba se llevó a cabo mediante la colocación de dos animales de diferente grupo en diagonal al campo abierto para un periodo de observación por 5 min, una de las ratas fue marcada para ser diferenciada. Los parámetros tomados en cuenta para la prueba fueron el número de eventos de **interacción pasiva** (la rata experimental estuvo dentro del espacio de la rata estímulo, pero no interactuó con ella), **interacción activa** (oler y escalar a la rata estímulo), **número de combates activos** (duración de 5 segundos para ser considerado un combate) y **las conductas de evitación social** (la rata estímulo intentó interactuar con la rata experimental, pero ésta se aleja). El campo abierto se limpió después de cada sesión (entre un animal y otro) y se obtuvieron grabaciones en video con una duración de 5 minutos. En esta prueba también se realizó la estrategia de muestreo instantáneo ya descrita en la prueba de campo abierto. La rata experimental fue el animal que estuvo marcado y al que se le evaluaron todas estas conductas. También se evaluaron las conductas del animal no marcado.

### *Prueba de consumo de agua con azúcar (Anhedonia)*

Con esta prueba se evalúa la conducta anhedónica, es decir, la pérdida de placer. Para evitar la neofobia, las ratas se expusieron a un día de habituación en el cual se les dejó dos botellas de agua con azúcar en sus jaulas (segunda semana de la LB). El día previo a la prueba se les privó de agua por 19 horas, en donde quedó incluida una noche. Al día siguiente, en ZT12 se colocaron dos botellas, una con 50 ml de agua con azúcar al 5% y otra botella con 50 ml de agua; ambas botellas se dejaron durante 30 min. Al finalizar la prueba se les permitió libre acceso al agua. El consumo de agua con azúcar se evaluó por medio de un índice de discriminación DI (%), el cual se calculó con la siguiente ecuación:

**DI:**  $\text{Consumo de solución de azúcar} / (\text{consumo de agua} + \text{consumo de sacarosa}) \times 100$ .

### *Evaluación de los niveles de la hormona corticosterona*

Al finalizar la sexta semana del protocolo de trabajo nocturno, a todos los animales se les realizó un corte en la punta de la cola y se tomó una muestra de sangre (500 µl) en tubos Microvette (SARSTEDT AG & Co.) que contienen un agente anticoagulante (EDTA), esto se realizó en ZT10 (hora que salen de los cilindros giratorios). Posteriormente la sangre se centrifugó a 7000 rpm durante 7 min, se guardaron alícuotas de 60 µl de plasma y se congelaron a -45° c para su posterior análisis. La hormona corticosterona se determinó con el Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) con un kit comercial (Diagnostic Systems Laboratorios, Inc. Webster TX, USA), los niveles de la hormona fueron obtenidos a partir de una curva estándar y los resultados son expresados en ng/ml.

### *Neuroinflamación*

#### *Inmunohistoquímica para GFAP e IBA-1.*

Al finalizar las 6 semanas de protocolo las ratas fueron anestesiadas con una sobredosis de pentobarbital y perfundidas por vía intracardiaca con 250 ml de solución salina (0.9%) seguida de 250 ml de paraformaldehído al 4% en 0.1 mM de buffer fosfato (PB: pH 7.3). Todas las ratas se perfundieron en ZT10 (hora que salen de los cilindros giratorios). Los cerebros fueron removidos, postfijados

y crioprotectados en una solución de sacarosa al 30%. Se obtuvieron cortes coronales de 40  $\mu\text{m}$  de grosor en un criostato, de las áreas CA1 y CA3 del hipocampo, corteza prefrontal y amígdala basolateral. La localización de estas estructuras se identificó con el atlas de Paxinos y Watson (1998). Una serie de cortes cerebrales se incubó por 48 h con el anticuerpo primario para **GFAP** (*marcador de astrocitos*) (hecho en conejo) (Millipore) a una dilución 1:3000 en Supermix (PBS, 0.25% gelatina y 0.5% tritón). Otra serie de cortes se incubó por 48 horas con el anticuerpo primario **IBA-1** (*marcador de microglía*) (hecho en cabra) a una dilución 1:3000 en Supermix.

Después de la incubación con los anticuerpos primarios, los cortes se lavaron 3 veces en PBS por 10 min y las secciones se incubaron con los anticuerpos secundarios biotilnados correspondientes anti-conejo (igG) y anti-cabra (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) a una dilución 5:1000 en Supermix por 2 horas a temperatura ambiente. Después de 2 horas se realizaron 3 lavados en PBS por 10 min y los cortes se incubaron en el complejo AB (avidina-biotina vector laboratories Inc.) a una dilución 9:1000 en Supermix durante 2 horas. Al finalizar este periodo, el tejido se lavó con PBS y se activó la reacción de oxidación con diaminobenzidina (1.5 gr por cada 100 ml), níquel (750  $\mu\text{l}$ ) y peróxido de hidrogeno (35  $\mu\text{l}$  al 30% por cada 100 ml). La reacción se paró a los 3 min con PBS para los anticuerpos GFAP e IBA-1.

Las secciones fueron montadas en portaobjetos gelatinizados, los cuales se deshidrataron en una serie de alcoholes y se aclararon con Xilol para ser cubiertos con cubreobjetos y Entellan (Merck).

## **Análisis de tejido**

### *Cuantificación del número de células positivas para la proteína GFAP*

Se seleccionaron cortes anteriores, mediales y posteriores de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (1998) para corteza prefrontal, hipocampo CA1 Y CA3 y amígdala basolateral. Los cortes se observaron con un microscopio óptico (Olympus) y se eligieron tres cortes (del lado izquierdo y derecho) para cada área; después se adquirieron fotografías en formato JPG con un lente de 20x. La cuantificación de las células positivas para GFAP se realizó mediante el software *Image J Pro Plus 6.0.0.260* (MedianCybernetics, Inc.) utilizando la



herramienta New AOI donde se eligió un área de interés utilizada para ambos lados de los cortes y posteriormente se realizó un conteo manual.

#### *Cuantificación del número de células positivas para IBA-1*

Los cortes se observaron con un microscopio óptico (Olympus) y se eligieron tres cortes (del lado izquierdo y derecho) para corteza prefrontal, hipocampo CA1 Y CA3 y amígdala basolateral, después se adquirieron fotografías en formato JPG con un lente de 20x. La cuantificación del número de células positivas para IBA-1 se realizó de la misma manera que para la proteína GFAP, se eligió un área de interés (rectángulo) utilizada para ambos lados de los cortes y se realizó un conteo manual.

#### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos fueron clasificados por grupos y se presentan como la media  $\pm$  el error estándar (SEM). La actividad general se representa como promedio de los patrones temporales diarios. Debido a la diferencia de sensibilidad de los sensores de las placas, las cuentas obtenidas se normalizaron al 100% de su actividad diaria. Para el porcentaje de cambio de la actividad general con respecto a su línea base se utilizó un ANOVA de una vía, y se realizó una prueba *post hoc Tukey*.

La ingesta de alimento se analizó por un ANOVA de dos vías para medidas repetidas para los factores: tiempo (semanas) y fase (día y noche), se realizó una prueba *post hoc Bonferroni*.

La ganancia de peso fue analizada con un ANOVA de dos vías para medidas repetidas: tiempo (semanas) y grupo (CTRL, TN, TN-RN).

Las pruebas conductuales (campo abierto, reconocimiento de objetos, interacción social) se evaluaron por una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis utilizada para el análisis de varianza de rangos, la comparación múltiple fue realizada con la prueba *post hoc de Dunn*.

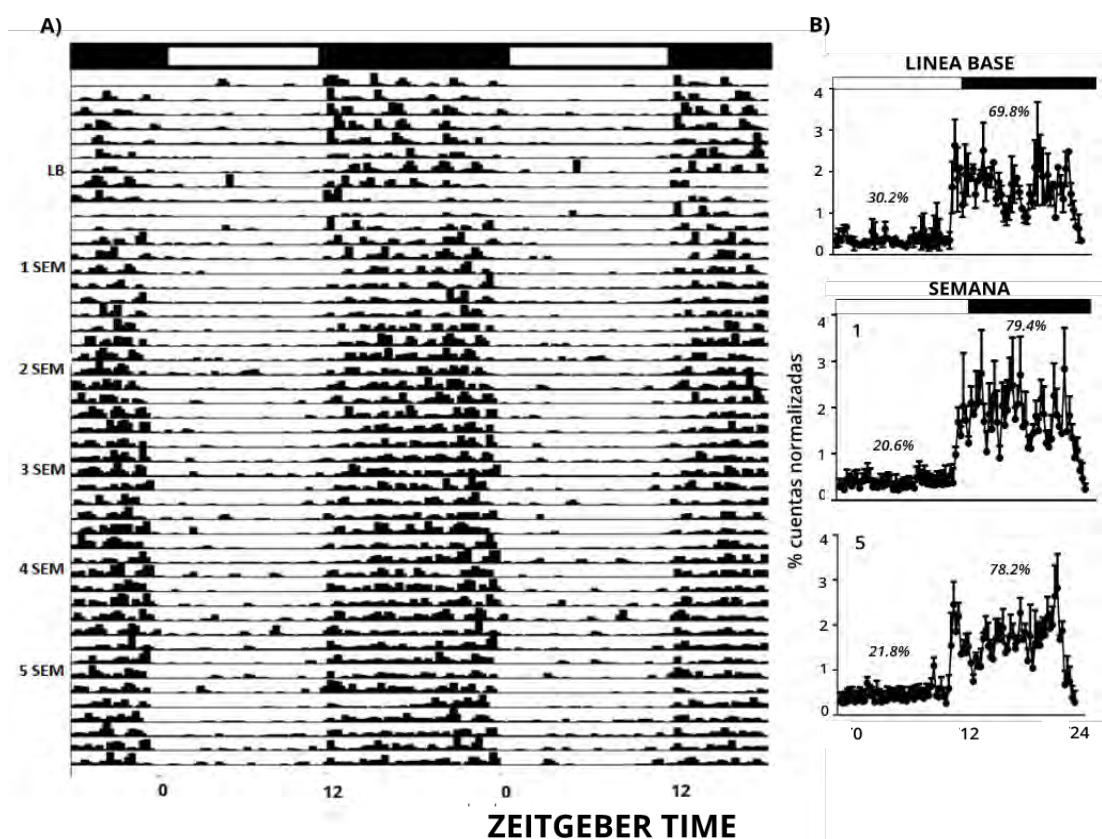
En la prueba conductual consumo del agua con azúcar se analizó un ANOVA de dos vías, para los factores: tiempo (semanas) y grupos (CTRL, TN, TN-RN) posteriormente se realizó una prueba *post hoc Bonferroni*.

Para analizar el número de células positivas para GFAP e IBA se utilizó un ANOVA de una vía para cada estructurada analizada.

## RESULTADOS

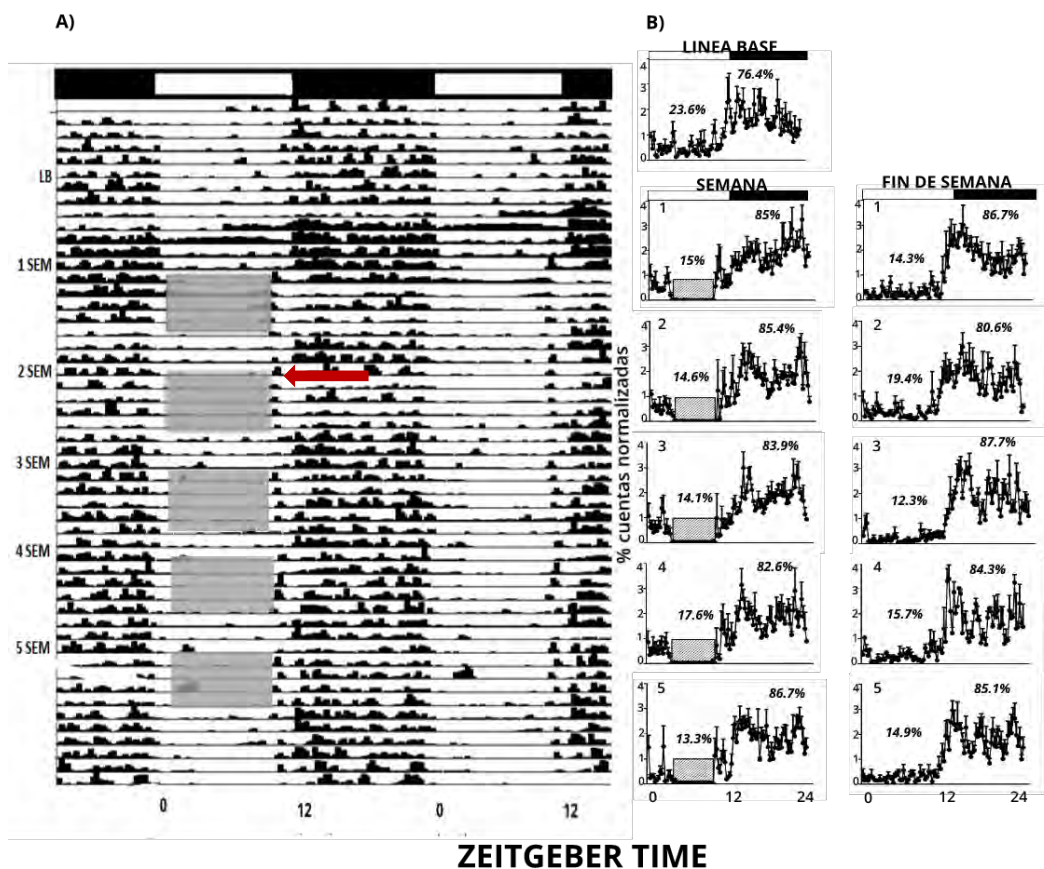
### *Actividad general*

En su línea base todos los grupos mostraron un patrón circadiano de actividad general sincronizada al ciclo luz-oscuridad (LD) presentando mayor actividad durante su fase activa (noche) y menor actividad durante la fase de reposo (día) (Figuras 1-3). El grupo control (CTRL) permaneció sincronizado al ciclo LD durante las seis semanas que duró el protocolo de trabajo nocturno. Para los perfiles de actividad se presenta el porcentaje de cuentas normalizadas, sin embargo, al no observar cambios a lo largo del protocolo solo se muestran la primera y última semana. En el perfil de actividad correspondiente a la primera semana de manipulación (lunes a viernes), los animales del grupo CTRL presentan mayor actividad durante la noche (alrededor de 79%) y menor actividad durante el día (21%). En la última semana del protocolo el grupo CTRL mantuvo el porcentaje de actividad nocturna (78%) y diurna (22%) (Figura 1).



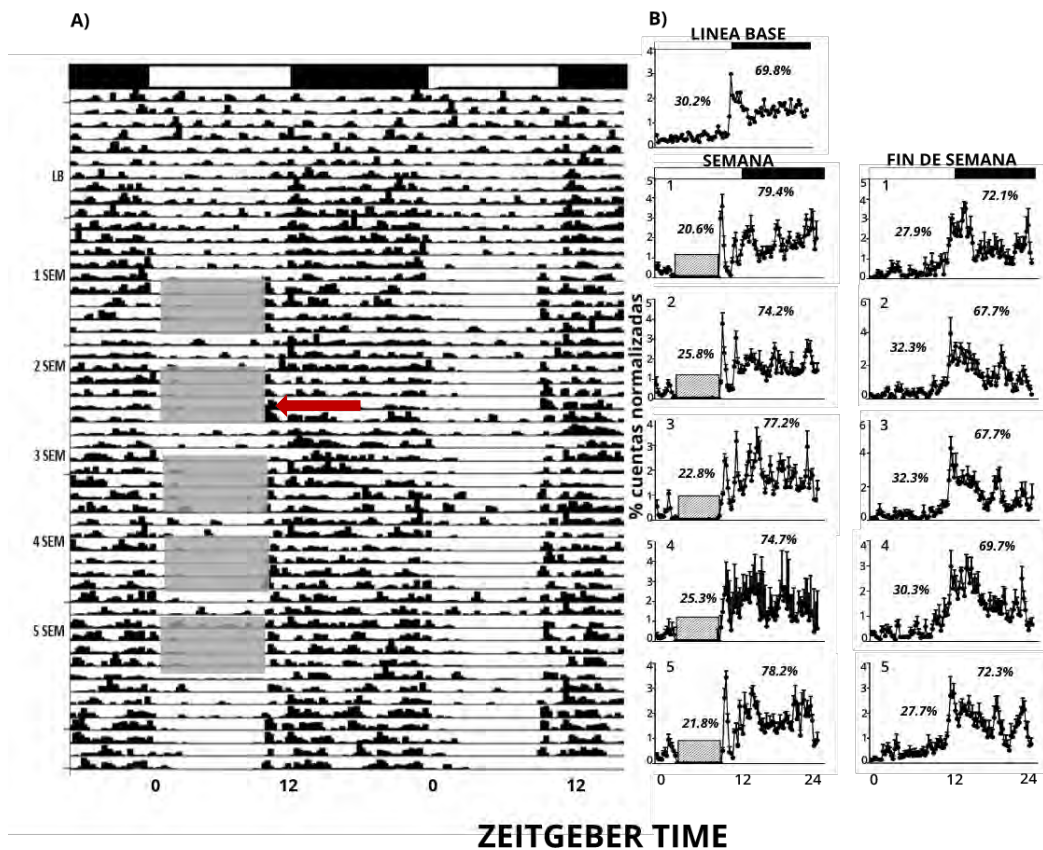
**Figura 1.** A) Actograma doble representativo de un animal del grupo control (CTRL). La actividad del grupo CTRL permaneció sincronizado al ciclo LD. Las barras negras representan la noche y las barras blancas representan el día. En el eje de las ordenadas se muestran la línea base (LB) y las semanas de protocolo (1-5 SEM). En el eje de las abscisas se representan las horas del día, la hora en la que se prende la luz (ZT0) y la hora en la que se apaga la luz (ZT12). B) Perfiles de actividad que representan la primera y la última semana de manipulación. Se observa mayor actividad en la noche y menor actividad en el día.

Al iniciar la primera semana de la fase experimental (lunes a viernes), es decir, cuando las ratas estuvieron en los cilindros giratorios, el grupo de trabajo nocturno (TN) presentó mayor actividad nocturna (85%) en comparación con su actividad diurna (15%). En la segunda semana de protocolo presento 85.4% de actividad nocturna y 14.6% de actividad diurna. En la tercera y cuarta semana de protocolo, su actividad nocturna disminuyó a 82-83% y su actividad diurna aumentó a 16-17%. En la quinta semana presento actividad nocturna de 86.7% y actividad diurna de 13.3% (Figura 2-A). Durante los fines de semana las ratas se mantuvieron sin alteraciones lo cual nos permitió observar la actividad diurna sin la influencia de la rueda. En los perfiles de actividad correspondientes a los fines de semana, se muestra que no hubo cambios en su actividad característica, es decir, se observó mayor actividad durante la noche (80-87%) y menor actividad durante el día (14-19%) (Figura 2-B).



**Figura 2. A) Actograma doble representativo de un animal del grupo de trabajo nocturno (TN).** A partir de la primera semana se inició el protocolo de trabajo nocturno, los rectángulos representan las horas que estuvieron las ratas en las ruedas giratorias (ZT2-ZT10), el grupo TN estuvo sincronizado al ciclo LD impuesto y se muestra un pico de actividad cuando las ratas son ingresadas a sus jaulas (flecha). Las barras negras representan la noche y las barras blancas representan el día. En el eje de las ordenadas se muestran la línea base (LB) y las semanas de protocolo (1-5 SEM). En el eje de las abscisas representan las horas del día, la hora que se prende la luz (ZT0) y la hora que se apaga la luz (ZT12). B) Los perfiles de actividad (derecha) representan las semanas de manipulación y sus fines de semana.

El grupo de trabajo nocturno con restricción de alimento (TN-RN) presentó un patrón de actividad similar al grupo TN. En la primera y segunda semana, presentó actividad nocturna de 74-79% y actividad diurna de 20-25%. En las últimas tres semanas del protocolo, el grupo TN-RN mantuvo mayor actividad durante la noche (74-78%) y menor actividad durante el día (21-25%) (Figura 3-A). Durante los días de trabajo (lunes a viernes) en ZT12 (fase activa), se observa un pico de actividad el cual coincide cuando las ratas tienen acceso al alimento. Las ratas se mantuvieron sin alteraciones los fines de semana, esto nos permitió observar la actividad diurna sin la influencia de la rueda. En los perfiles de actividad correspondientes se muestra que su mayor actividad se concentró durante la noche (67-72%) con una menor actividad durante el día (27-32%) (Figura 3-B).

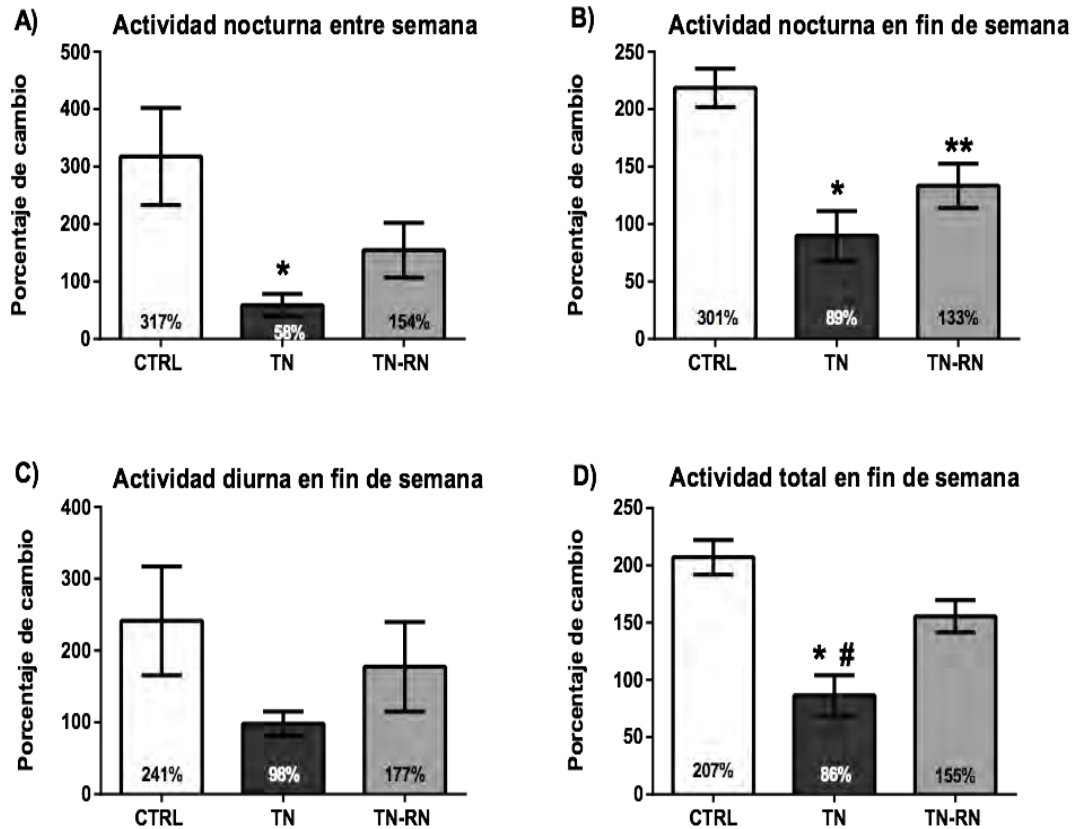


**Figura 3. A) Actograma doble representativo de un animal del grupo trabajo nocturno con restricción de alimento (TN-RN).** En la línea base el grupo TN-RN mantuvo su actividad sincronizada al ciclo LD. En la primera semana se inició el protocolo de modelo nocturno, los rectángulos representan las horas que estuvieron las ratas en las ruedas giratorias, se muestra un pico de actividad (flecha) cuando se les dio acceso al alimento (ZT12). Las barras negras representan la noche y las barras blancas representan el día. En el eje de las ordenadas se muestran la línea base (LB) y las semanas de protocolo (1-5 SEM). En el eje de las abscisas representan las horas del día, la hora que se prende la luz (ZT0) y la hora que se apaga la luz (ZT12). B) Los perfiles de actividad (derecha) representan las semanas de manipulación y sus fines de semana.

Para determinar cambios en la actividad a lo largo del protocolo, evaluamos el porcentaje de cambio de la actividad general de los días entre semana y fines de semana con respecto a la línea base de cada grupo que corresponde al 100%. En la Figura 4-A el grupo TN disminuyó su actividad nocturna entre semana con respecto a su línea base y en comparación con el grupo CTRL ( $p < 0.05$ ) que mostró un aumento en su actividad nocturna entre semana con respecto a su línea base. En la figura 4-B se observa que el grupo TN disminuyó su actividad nocturna en fines de semana con respecto a su línea base y en comparación con el grupo CTRL ( $p < 0.05$ ) el cual aumentó su actividad nocturna en fines de semana con respecto a su línea base, el grupo TN-RN también muestra un aumento en su actividad nocturna en fines de semana con respecto a su línea base, pero fue diferente significativamente en comparación con el grupo CTRL ( $p < 0.05$ ).

En la figura 4-C se observa que el grupo TN, disminuye su actividad diurna en fines de semana con respecto a su línea base, sin embargo, la prueba *post hoc* de Tukey no mostró diferencias significativas en comparación con los grupos CTRL y TN-RN ( $p > 0.05$ ) quienes presentaron un aumento en su actividad diurna en fines de semana con respecto a su línea base. En la figura 4-D se observa que el grupo TN disminuye su actividad total con respecto a su línea base y en comparación con los grupos CTRL y TN-RN ( $p < 0.05$ ), los cuales aumentaron su actividad total los fines de semana con respecto a su línea base.

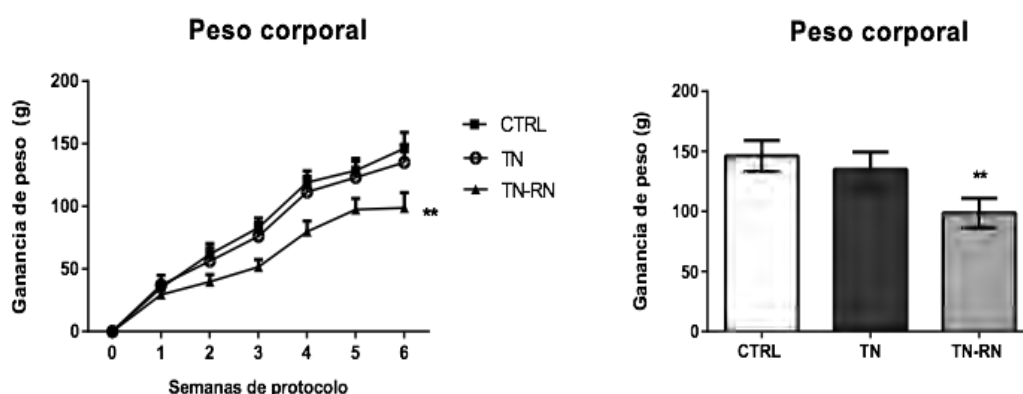




**Figura 4.** Porcentaje de cambio de actividad con respecto a su línea base. A) Actividad nocturna entre semana a lo largo del protocolo. B) Actividad nocturna solo en fin de semana. C) Actividad diurna en fin de semana. D) Actividad diurna y nocturna en fin de semana. ANOVA de una vía, ( $p < 0.05$ ). El *post hoc* de Tukey mostró diferencias significativas entre grupos. \* Indica diferencia entre grupo TN (gris oscuro) en comparación con grupo control (blanco). # Indica diferencia entre grupo TN y grupo TN-RN (gris). \*\* Indica diferencia entre grupo TN-RN y grupo control.

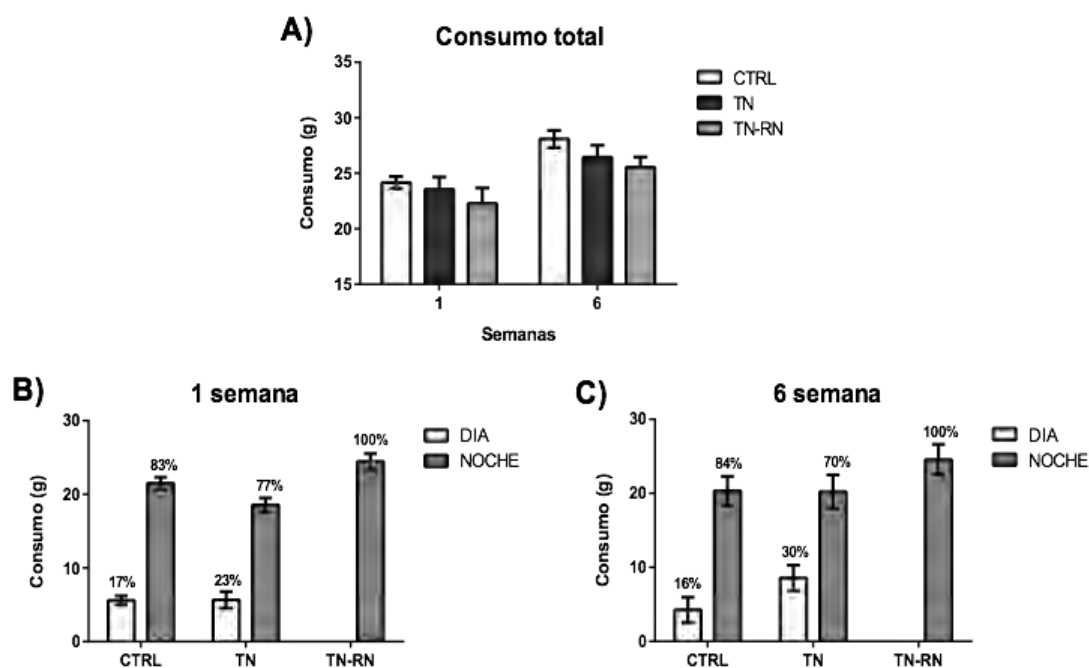
### *Peso corporal e ingesta de alimento*

La ganancia de peso se calculó cada semana a lo largo del protocolo experimental (Figura 5). En el grupo CTRL se observó una ganancia de peso de  $146 \pm 1.7$  gr al terminar el protocolo, las ratas del grupo TN tuvieron niveles similares en ganancia de peso que los animales CTRL ( $135 \pm 6.5$  gr). El grupo TN-RN, aunque ganó peso durante el protocolo ( $98 \pm 4.9$  gr) su ganancia fue menor en comparación con los otros grupos experimentales; el *post hoc* de Tukey ( $p < 0.05$ ) indicó diferencias significativas entre el grupo TN-RN con respecto a los grupos CTRL y TN.



**Figura 5.** Ganancia de peso durante las 6 semanas de protocolo de trabajo nocturno. Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  error estándar ( $n=10$ ). \*\* Indica diferencia entre el grupo TN-RN (triángulos) en comparación con el grupo control (cuadrados) y TN (círculos). ANOVA de una vía, ( $p < 0.05$ ). El *post hoc de Tukey* mostró diferencias significativas entre grupos.

En cuanto a la ingesta de alimento, esta se evaluó durante las seis semanas del protocolo, sin embargo, al no observar cambios a lo largo del protocolo, sólo se muestra la primera y la última semana de fase experimental (Figura 6A-B). La primera semana del protocolo de trabajo nocturno, no se observaron diferencias en el consumo diurno y nocturno de alimento entre los grupos CTRL y TN. En la última semana del protocolo, el grupo CTRL siguió manteniendo un mayor consumo de alimento durante la noche y un menor consumo durante el día. Del mismo modo, el grupo TN consumió la mayor parte de su alimento durante la fase activa (noche), pero durante el día consumió casi el doble de alimento (30%) en comparación con el grupo CTRL, sin embargo, el *post hoc de Tukey* no mostró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Debido a que el grupo TN-RN solo tenía acceso al alimento durante la noche, el consumo de alimento se concentró en este periodo. También se evaluó el consumo total de alimento (día más noche) (Figura 6-C). En la primera semana se observó que los tres grupos presentaron niveles similares en consumo de alimento, en la sexta y última semana del protocolo los grupos aumentaron su consumo en comparación con la primera semana, sin embargo, el ANOVA de dos vías no indicó diferencias significativas en factor tiempo y grupos ( $p > 0.05$ ).



**Figura 6.** Ingesta de alimento. Consumo diurno (barras blancas) y nocturno (barras grises) en la primera (A) y última semana del protocolo (B). (C) Consumo total de alimento de la primera y última semana. ANOVA de dos vías, ( $p < 0.05$ ). El *post hoc de Tukey* no indicó diferencias significativas entre grupos. Los datos se muestran como el promedio  $\pm$  error estándar ( $n = 10$ ).

### Análisis conductual

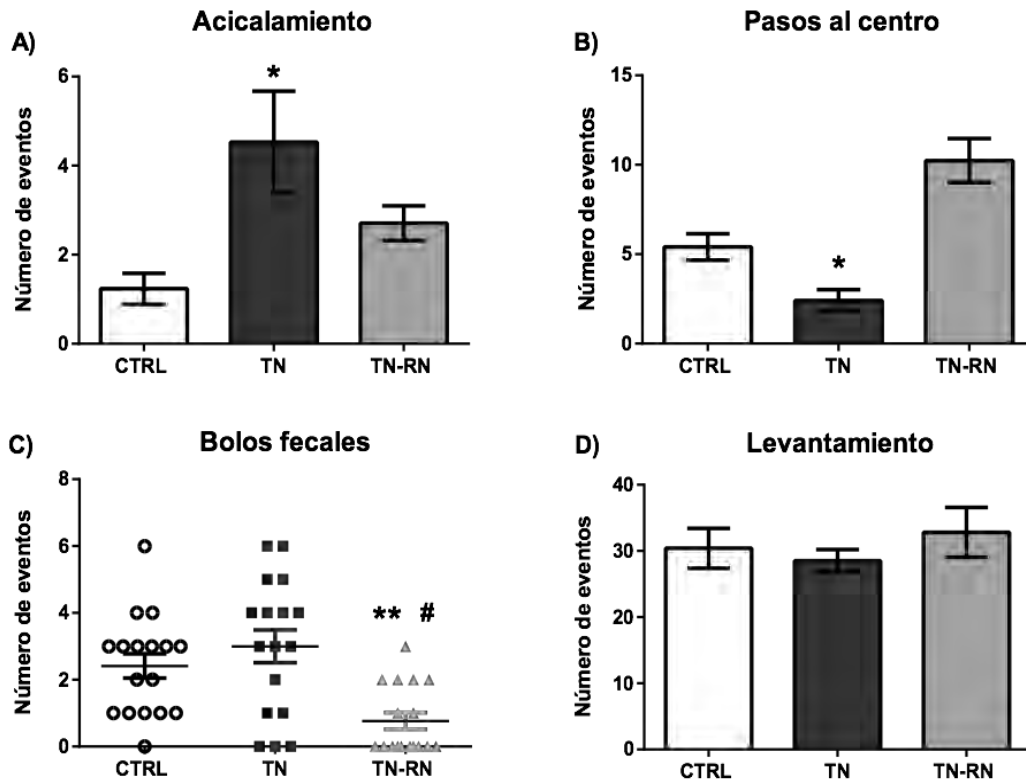
#### Campo abierto

En la prueba de campo abierto con la cual se miden conductas de ansiedad (ver apartado de métodos), el grupo TN mostró un aumento en el número de eventos en la conducta de acicalamiento en comparación con el grupo CTRL y TN-RN (Figura 7-A). La prueba no paramétrica Kruskal-Wallis indicó diferencias significativas entre grupos y el *post hoc de Dunn* indicó diferencias entre el grupo TN y CTRL ( $p < 0.05$ ).

En la conducta de paradas al centro (Figura 7-B), el grupo TN tuvo un menor número de eventos en comparación con el grupo CTRL y TN-RN, este último grupo mostró un mayor número de paradas al centro en comparación con los grupos CTRL y TN. El análisis estadístico Kruskal-Wallis indicó diferencias significativas entre grupos y el *post hoc de Dunn* indicó diferencias entre el grupo TN y CTRL ( $p > 0.05$ ). En el número de bolos fecales no se encontraron diferencia entre el grupo CTRL y TN, sin embargo, el grupo TN-RN tuvo un menor número



de bolos fecales, (Figura 7-C), el *post hoc de Dunn* indicó diferencias entre el grupo TN-RN y los grupos CTRL y TN ( $p < 0.05$ ). Para la conducta de levantamiento (Figura 7-D), los grupos CTRL y TN-RN presentaron el mismo número de eventos, sin embargo, se observa una disminución en la conducta de levantamiento en el grupo TN, aunque esto no fue estadísticamente significativo ( $p > 0.05$ ).

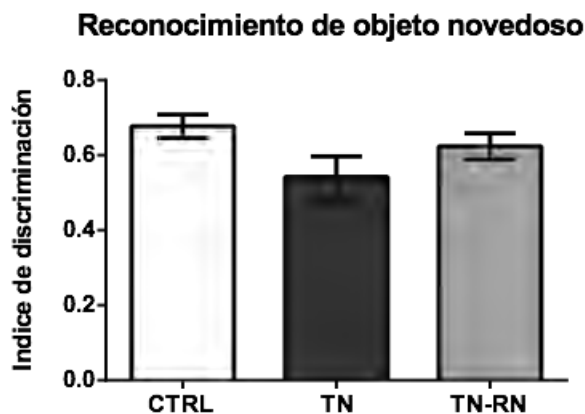


**Fig 7. Prueba de campo abierto.** Los datos representan como el número de eventos durante los 5 min de evaluación. A) Número de veces que la rata se rascaba o aseaba, B) El número de veces que la rata cruzaba al centro del campo, C) El número de bolos fecales, grupo CTRL (círculos), grupo TN (Cuadrados) y grupo TN-RN (triángulos), D) Número de veces que la rata se levantó en dos patas. Los datos son representados como media  $\pm$  error estándar ( $n=10$ ). Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, ( $p < 0.05$ ). El *post hoc de Dunn* mostró diferencia significativa entre grupos. \* Indica diferencia significativa contra el grupo CTRL (blanca) y grupo TN (gris oscuro). # Diferencia significativa entre grupo TN y grupo trabajador con TN-RN (gris). \*\* Indica diferencia entre grupo TN-RN y CTRL.

### Reconocimiento de objeto novedoso

La prueba de reconocimiento de objeto novedoso evalúa la memoria ante diversos estresores. Para esta prueba se utilizó un índice de discriminación con la finalidad de evaluar el tiempo que dedicaban las ratas a explorar los dos objetos (Figura 8). Los grupos CTRL y el grupo TN-RN dedicaron más tiempo a explorar el objeto novedoso con respecto al grupo TN. En contraste, en el grupo

TN se observa una disminución en el tiempo de exploración al objeto novedoso con respecto a los grupos CTRL y TN-RN, sin embargo, esto no fue estadísticamente significativo (prueba no paramétrica Kruskal-Wallis,  $p > 0.05$ ).

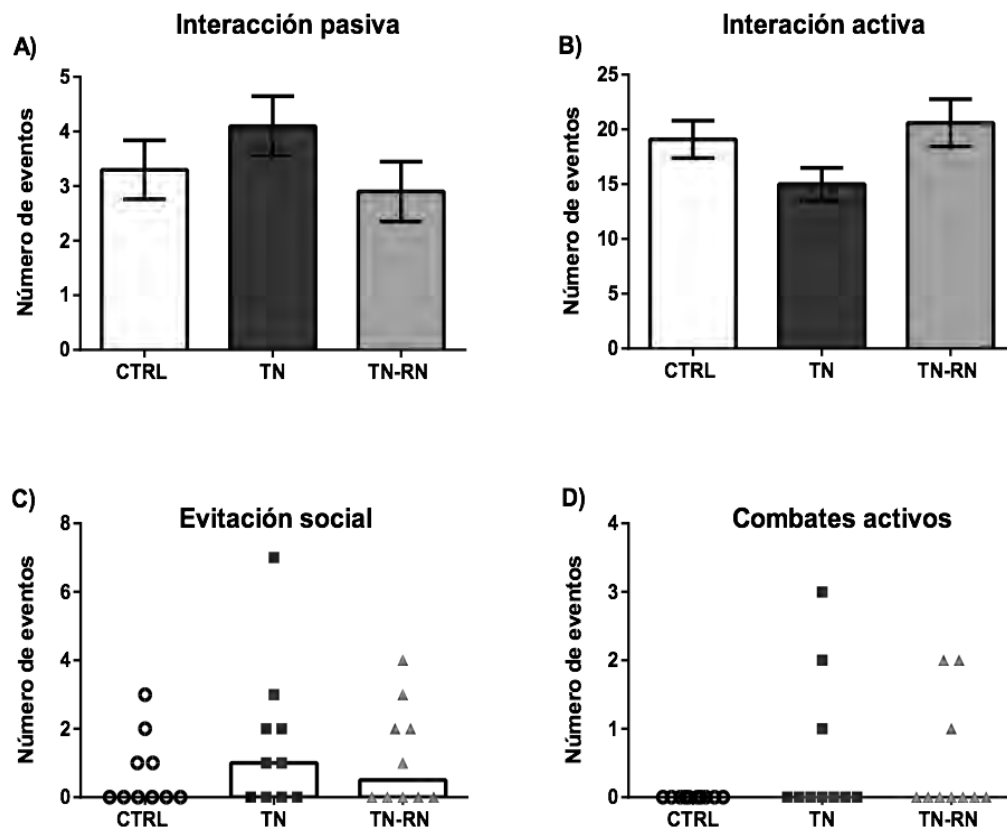


**Figura 8. Prueba de reconocimiento de objeto novedoso.** El grupo TN (gris oscuro) disminuye su índice de discriminación en comparación con el grupo CTRL (blanco) y el grupo TN-RN (gris). Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, ( $p < 0.05$ ). Los datos son representados como media  $\pm$  error estándar ( $n=10$ ). El *post hoc de Dunn* no mostró diferencias significativas entre los grupos.

### Interacción social

La interacción social es otra prueba en la que se pueden medir conductas de ansiedad (ver apartado de métodos). En la evaluación de la conducta de interacción pasiva (Figura 9-A) se encontró que el grupo TN tiene una tendencia a aumentar el número de veces en las que se acercó a una rata de diferente grupo sin olerla ni tocarla. En la categoría de interacción activa (Figura 9-B), el grupo TN mostró un menor número de eventos al acercarse y oler a otra rata en comparación con los grupos CTRL y TN-RN, sin embargo, el *post hoc de Dunn* no mostro diferencias significativas. Para la conducta de evitación social caracterizada por alejarse o huir de la rata estímulo (Figura 9-C), los tres grupos mostraron valores similares.

El grupo CTRL no tuvo ningún combate activo (Figura 9-D), sin embargo, los grupos TN y TN-RN presentaron entre 2 y 3 combates durante los 5 minutos que duró la prueba. El análisis estadístico Kruskal-Wallis ( $p > 0.05$ ) no mostro diferencias significativas entre grupos.

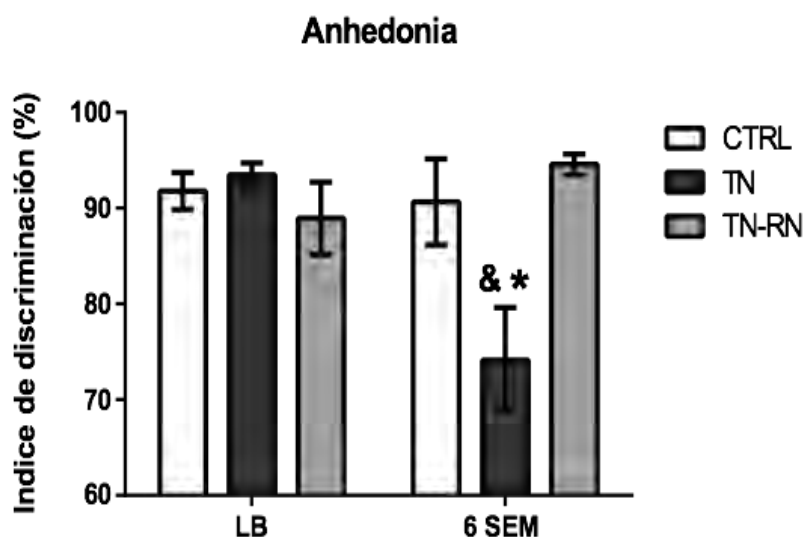


**Figura 9. Prueba de interacción social.** A) Interacción pasiva, se tomó en cuenta el número de veces en que las ratas se acercaban sin oler a la otra rata. B) Interacción activa, número de veces en que olían y escalaban a la otra rata. Los datos son representados como media  $\pm$  error estándar ( $n=10$ ). Prueba no paramétrica Kruskal-Wallis, ( $p < 0.05$ ). C) Evitación social, número de veces en que la rata se alejaba o huía, D) Combates activos, número de veces de combates activos con duración de 5 segundos. Los datos son representados como mediana ( $n=10$ ). Grupo CTRL (círculos), grupo TN (cuadrados) y grupo TN-RN (triángulos).

### Anhedonia

Para esta prueba se evaluó el consumo de agua con azúcar. En su línea base las ratas fueron expuestas a dos botellas, una de ellas contenía agua natural y la otra botella agua con azúcar, los tres grupos presentaron niveles similares en el consumo de agua natural y de agua con azúcar durante los 30 minutos de exposición a las botellas (Figura 10). En la última semana del protocolo de trabajo nocturno nuevamente las ratas fueron expuestas a las dos botellas, el grupo CTRL mantuvo los niveles de consumo comparado con su línea base, el grupo TN-RN aumentó su consumo de agua con azúcar en la sexta semana y el grupo TN disminuyó su consumo de agua con azúcar en la última semana en comparación con su línea base y en comparación con los grupos CTRL y TN-RN.

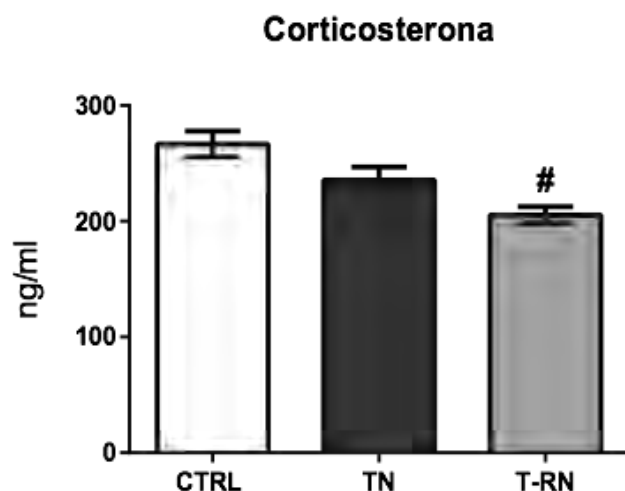
Lo anterior sugiere que este grupo de animales desarrolló una conducta anhedónica. El ANOVA de dos vías ( $p < 0.05$ ) mostró diferencias, el *post hoc de Tukey* indico diferencias significativas entre el grupo TN en comparación con el grupo CTRL en la sexta semana.



**Figura 10. Prueba de agua con azúcar.** En línea base no se observan diferencias en el consumo de agua con azúcar entre grupos. Durante la 6ª semana, el grupo TN (gris oscuro) disminuyó su consumo de agua con azúcar en comparación con su línea base y con el grupo control (blanco) y TN-RN (gris) presentando conducta anhedónica. Los datos son representados como media  $\pm$  error estándar ( $n=8$ ) ANOVA de dos vías ( $p < 0.05$ ). El *post hoc de Bonferroni* mostró diferencias significativas entre grupos. & Indica diferencia significativa en comparación con su línea base. \* Indica diferencia entre el grupo TN en comparación con los grupos CTRL y TN-RN.

#### *Concentración de corticosterona en sangre*

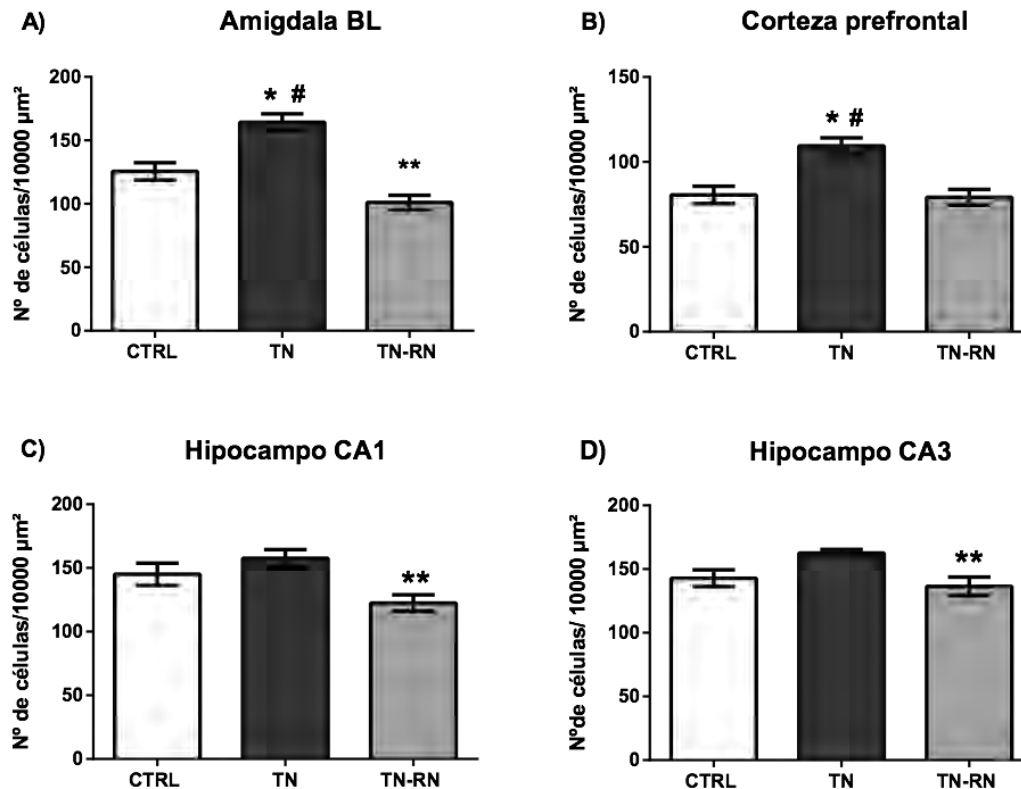
No se observaron diferencias en los niveles de corticosterona del grupo TN en comparación con el grupo CTRL ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, el grupo TN-RN presentó niveles más bajos de corticosterona en comparación con los grupos CTRL y TN. El *post hoc de Tukey* indicó diferencias significativas entre el grupo TN-RN y el grupo CTRL ( $p < 0.05$ ).



**Figura 11.** Concentración de corticosterona en sangre en la sexta semana de protocolo. Los niveles de corticosterona en los grupos CTRL (blanco) y TN (gris oscuro) fueron similares. El TN-RN (gris) presentó niveles bajos de esta hormona. Los datos son representados como media  $\pm$  error estándar ( $n=8$ ). ANOVA de una vía ( $p<0.05$ ), el *post hoc* de Tukey indicó diferencias significativas entre grupos. # Indica diferencia significativa entre el grupo TN-RN en comparación con el grupo CTRL.

#### *Marcadores de neuroinflamación*

En la Figura 12 se muestra el número de células positivas para GFAP (expresión de la proteína GFAP) en la A) Amígdala Basolateral, B) Corteza Prefrontal y en el área CA1 y CA3 del Hipocampo (C-D). El grupo TN presentó un mayor número de células positivas para la proteína GFAP en la amígdala basolateral y en la corteza prefrontal en comparación con el grupo CTRL y TN-RN (Fig 12- A-B). El ANOVA de una vía indicó diferencias significativas entre el grupo TN en comparación con el grupo CTRL ( $p < 0.05$ ) en amígdala basolateral y corteza prefrontal e indicó diferencias significativas entre el grupo TN-RN y grupo TN en amígdala basolateral. Los grupos CTRL y TN-RN presentaron niveles similares de células positivas en la corteza prefrontal. En el área CA1 y CA3 del hipocampo (Figura 12-C-D) no se encontraron diferencias en el número de células positivas entre el grupo TN y los grupos CTRL y TN-RN. El ANOVA de una vía indicó diferencias significativas entre el grupo TN-RN en comparación con el grupo CTRL ( $p < 0.05$ ) en amígdala basolateral y las áreas CA1 y CA3 del hipocampo. En la figura 14 se muestran las fotos representativas de células positivas para GFAP en las áreas antes mencionadas.

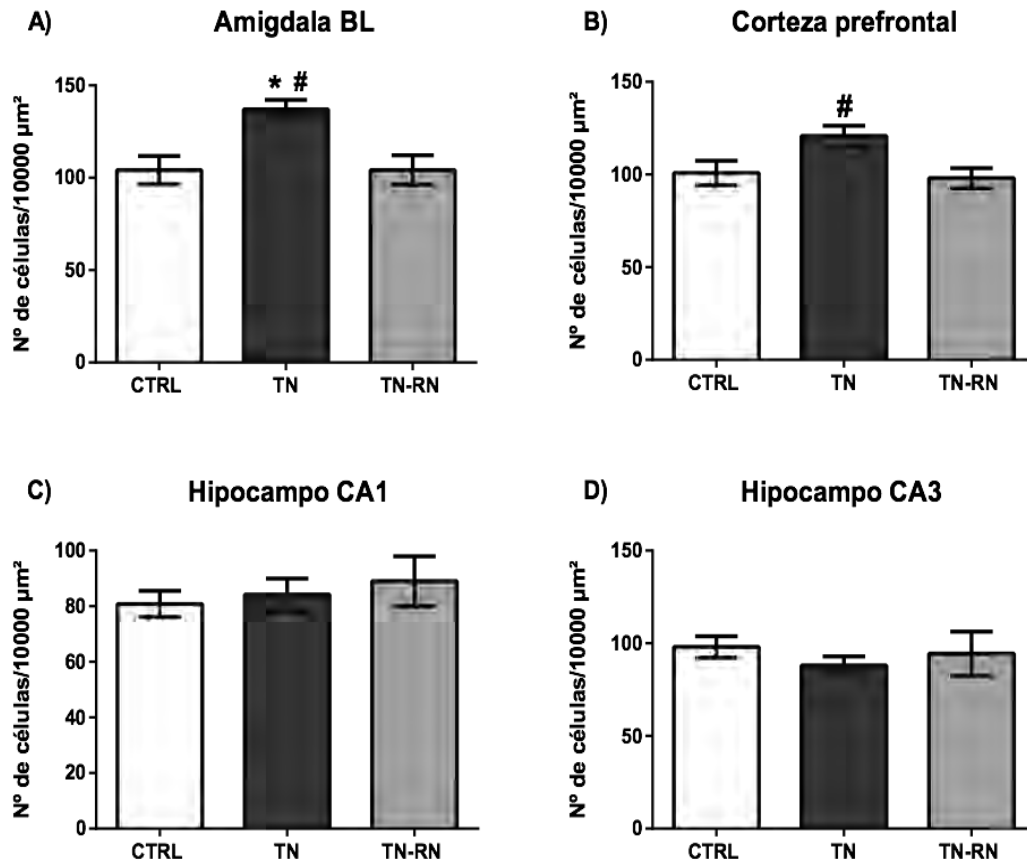


**Figura 12.** Promedio del número de células positivas para la proteína GFAP. A) Amígdala basolateral, B) Corteza prefrontal, C) Hipocampo CA1 y D) Hipocampo CA3. Los datos son representados como media  $\pm$  error estándar (n=5). ANOVA de una vía ( $p < 0.05$ ), el *post hoc* de Tukey mostró diferencias entre grupos. \* Indica diferencia significativa entre el grupo TN (gris oscuro) en comparación con el grupo CTRL (blanco). # Indica diferencia significativa entre el grupo TN en comparación con el grupo TN-RN (gris). \*\* indica diferencia significativa entre el grupo TN-RN (gris) y grupo CTRL.

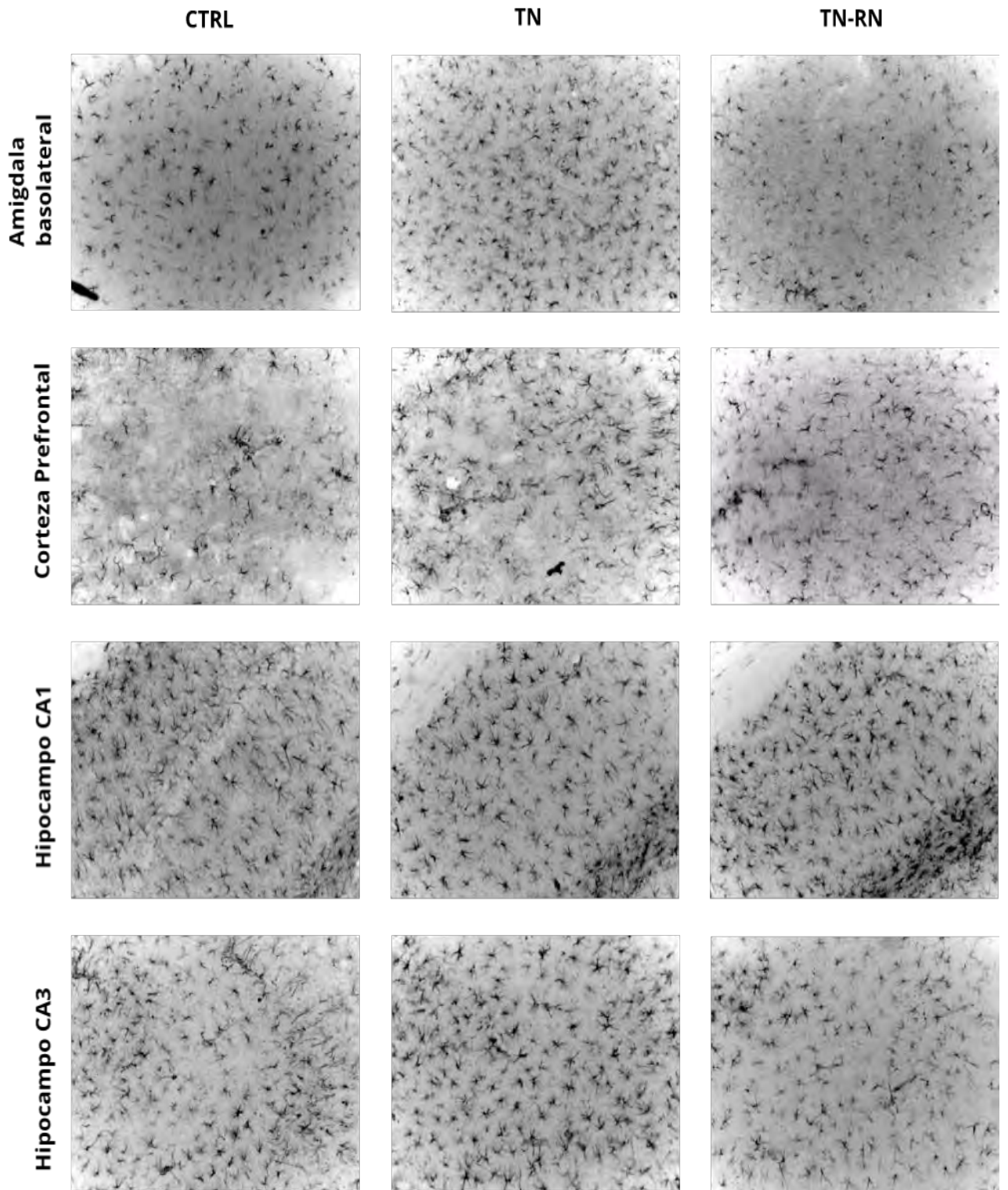
También se evaluó el marcador de neuroinflamación IBA-1 en la microglía. En la Figura 13 se muestra el número de células positivas para IBA-1 en la A) Amígdala Basolateral, B) Corteza Prefrontal y en área CA1 y CA3 del Hipocampo (C-D). En la amígdala basolateral el grupo TN presentó niveles más altos de células positivas para IBA-1 (Figura 13-A) en la corteza prefrontal, aunque se ve un aumento de células esto no fue estadísticamente significativo ( $p > 0.05$ ) (Figura 13-B). Los grupos CTRL y TN-RN muestran niveles similares de células positivas para IBA-1 en la amígdala basolateral y en corteza prefrontal.

En las áreas CA1 y CA3 del hipocampo, no se observaron diferencias en el número de células positivas para IBA-1 en los tres grupos (Figura 13-C-D). La prueba de ANOVA indicó diferencias significativas entre el grupo TN en comparación con el grupo CTRL solamente en la amígdala basolateral y diferencias significativas entre el grupo TN-RN en comparación con el grupo TN

en la corteza prefrontal. En la figura 15 se muestran las fotos representativas de células positivas para IBA-1 en las áreas antes mencionadas.

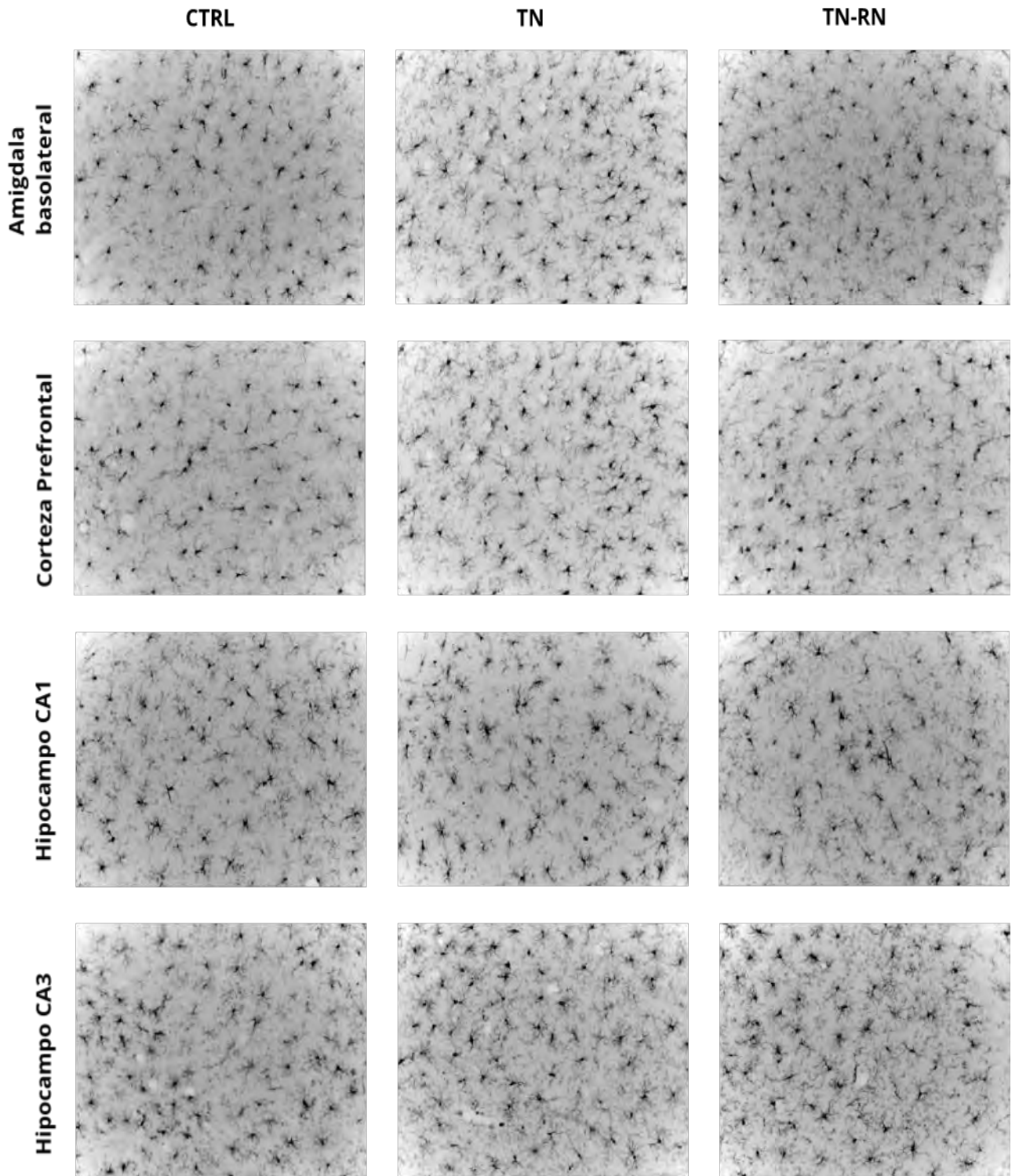


**Figura 13.** Promedio del número de células positivas a IBA-1. A) Amígdala basolateral, B) Corteza prefrontal, C) Hipocampo CA1 y D) Hipocampo CA3. Los datos son representados como media  $\pm$  error estándar (n=5). ANOVA de una vía ( $p < 0.05$ ), el *post hoc* de Tukey mostro diferencias entre grupos. \* Indica diferencia significativa entre el grupo TN (gris oscuro) en comparación con el grupo CTRL (blanco). # indica diferencia significativa entre el grupo TN-RN (gris) y grupo TN.



**Figura 14.** Fotos representativas 20x correspondientes al número de células positivas para la proteína GFAP. Imágenes en blanco y negro de la amígdala basolateral, corteza prefrontal, hipocampo CA1 y CA3 de cada grupo experimental.





**Figura 15.** Fotos representativas 20x correspondientes al número de células positivas para IBA-1. Imágenes en blanco y negro de la amígdala basolateral, corteza prefrontal, hipocampo CA1 y CA3 de cada grupo experimental.

## DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio demuestran que la exposición a un protocolo de trabajo nocturno por seis semanas induce conductas tipo depresivas en ratas macho de la cepa Wistar, tales como el aumento en la conducta de acicalamiento, una disminución de pasos al centro que se presentaron en la prueba de campo abierto, una tendencia a explorar por menor tiempo un objeto novedoso y una reducción del consumo de agua con azúcar. A nivel del sistema nervioso central, reportamos un incremento en el número de células inmunorreactivas a la proteína GFAP y de células positivas para IBA-1 en las áreas asociadas al circuito de depresión como son la corteza prefrontal y la amígdala basolateral. De forma importante, estos efectos se revierten cuando las ratas son alimentadas en su fase de actividad, señalando que el alimento tiene un papel crucial como sincronizador del sistema circadiano.

A lo largo del protocolo, todos los grupos estuvieron expuestos a un ciclo normal de 12h de luz/ 12h oscuridad. El grupo CTRL mantuvo su actividad sincronizada al ciclo LD (luz-oscuridad) durante todo el protocolo. De la misma forma, el grupo TN mantuvo un mayor porcentaje de actividad durante la noche y menor actividad durante el día a lo largo de las seis semanas de trabajo nocturno. Lo anterior se contrapone a lo previamente reportado por nuestro grupo, en donde se encontró que los animales sometidos a este paradigma sufren de alteraciones en su ritmo de actividad general, específicamente, disminuyen su actividad nocturna durante los días de “trabajo” y durante los fines de semana aumentan su actividad diurna y disminuyen la nocturna (Salgado-Delgado et al., 2008). De forma similar a lo previamente reportado, el grupo TN-RN a pesar de ser expuesto al protocolo de trabajo nocturno mantuvo su mayor actividad en la noche sin presentar cambios en su actividad general (Salgado, Ángeles, Saderi, Buijs & Escobar, 2010). En los porcentajes de cambio de actividad con respecto a su línea base, observamos que la actividad del grupo TN disminuye durante la noche en los fines de semana y entre semana. Sin embargo, esta disminución no fue suficiente para alcanzar el porcentaje de actividad diurna e inducir una pérdida del ritmo de actividad general tal como lo reportan los resultados de Salgado y colaboradores en 2008.

Nuestros datos demuestran que las ratas del grupo TN presentaban hipoactividad, lo que sugiere que se encontraban fatigadas después del día de trabajo y durante los fines de semana (cuando no eran sometidas a los cilindros giratorios). La fatiga y enlentecimiento motor son síntomas que presentan los pacientes con depresión (Ohashi, Yamamoto, Teicher, 2015). Aunque no observamos pérdida del ritmo de actividad general como se ha reportado anteriormente, sugerimos que otras señales podrían estar funcionando como sincronizadores en el grupo TN, por ejemplo, el ciclo luz/oscuridad el cual no fue alterado, y es el principal sincronizador del sistema circadiano (Fukuhara & Tosini, 2003).

En este modelo de trabajo nocturno también se ha evaluado la temperatura corporal, y se ha reportado que las ratas modifican su ritmo de temperatura. En nuestro estudio no evaluamos la temperatura corporal pero lo anteriormente reportado demuestra que el trabajo nocturno altera el ritmo de temperatura (Salgado, Ángeles, Saderi, Buijs & Escobar, 2010) tal como se reporta en pacientes deprimidos en quienes se observa que la temperatura corporal es más elevada en la noche comparado con pacientes sanos (Soria & Urretavizcaya, 2009).

Los pacientes con depresión muestran variabilidad en su apetito, aproximadamente el 48% de los pacientes disminuye su apetito, y aproximadamente el 35% lo aumenta, lo cual repercute en su peso corporal (aumento o disminución) (Simmons et al., 2006).

Anteriormente demostramos que los animales sometidos a actividad forzada en la fase de reposo combinado con el libre acceso al alimento en los cilindros giratorios desarrollan desincronización circadiana y alteraciones metabólicas, tales como: ganancia de peso, ingestión de alimento durante la fase de descanso, acumulación de tejido adiposo, y pérdida del ritmo de los genes reloj en hígado (Salgado et al., 2013). En nuestro estudio, las ratas del grupo TN consumieron más alimento en la fase de luz, en comparación con las ratas CTRL, sin embargo, el mayor consumo de alimento permaneció durante la fase activa, al igual que en las ratas CTRL. En cuanto al peso corporal, no observamos cambios en comparación con el grupo CTRL, estos datos concuerdan con un estudio por Barclay y colaboradores (2012), en donde al exponer a sus ratones

a un modelo de trabajo por turnos, se encontraron cambios agudos en su ingesta de alimento diurno sin diferencias en el peso corporal.

Los modelos de trabajo nocturno que usan el tiempo desplazado y/o restringido de la disponibilidad de alimentos se basan en el conocimiento de que la ingesta de alimentos es la señal sincronizadora más importante para los relojes periféricos, de la misma manera que es la luz para el reloj biológico (Opperhuizen et al., 2015). En el caso del grupo TN-RN, que tuvo acceso al alimento durante la noche, se observó una menor ganancia de peso a lo largo del protocolo en comparación con el grupo TN que tuvo alimento *ad libitum*, esto concuerda con lo previamente reportado por nuestro grupo. De forma importante, se ha sugerido que la restricción de alimento durante la fase activa (noche) previene los efectos de la desincronización ocasionados por el modelo de trabajo nocturno (Salgado et al., 2010). El grupo TN-RN nos permitió estudiar el papel del alimento como el principal sincronizador en este grupo. El acceso restringido de alimento a la hora adecuada evitó que las ratas se desincronizarán y promovió un comportamiento similar al del grupo control.

Las alteraciones en los ritmos circadianos tienen un impacto en la homeostasis física y psicológica de un individuo (Salgado, Fuentes & Escobar, 2009). Se ha demostrado que los roedores sometidos a cambios inesperados en su ciclo luz-oscuridad exhiben conductas de ansiedad tales como menor número de entradas a los brazos abiertos en la prueba de laberinto elevado y mayor acicalamiento en la prueba de campo abierto (Campos, Fogaça, Aguiar & Guimarães, 2013).

La prueba de campo abierto ha sido una de las pruebas más utilizadas en la investigación del comportamiento. Calvin Hall en 1934 habló sobre la emotividad en la rata como sinónimo de temor, en esta prueba conductual las dos medidas más comúnmente utilizadas para emocionalidad han sido deambulación y defecación, lo que sugiere que la respuesta de miedo de un animal expuesto a un ambiente nuevo se caracteriza por una alta frecuencia de defecación y una baja deambulación (Ramos & Morméde, 1988). Sin embargo, en diversos estudios se han evaluado otras medidas como indicadores de ansiedad en los roedores, por ejemplo, si las ratas pasan menos tiempo en el centro del campo abierto, mayor acicalamiento y menor exploración (Prut & Belzung, 2003). En la

prueba del campo abierto el grupo TN tuvo más acicalamiento y una reducción del número de pasos al centro en comparación con los grupos CTRL y TN-RN, lo que sugiere que estos animales presentan una conducta similar a la ansiedad. En la medición de bolos fecales esperábamos un mayor número en el grupo TN como indicador de ansiedad, pero obtuvo niveles similares en comparación con el grupo CTRL, sin embargo, esta conducta en otros estudios tampoco se ha visto alterada, por ejemplo, en un estudio en donde se emplearon diferentes ciclos de luz-oscuridad simulando el trabajo por turnos en ratones, demostraron que con este paradigma los animales presentaron conductas similares a la ansiedad como una mayor tigmotaxis, es decir, la exploración predomina en la periferia, y una mayor distancia recorrida, sin embargo, otras mediciones como levantamiento y bolos fecales no fueron significativos en comparación con el grupo control (McGowan & Coogan, 2013).

En el campo abierto, la frecuencia de levantamiento se utiliza como medida de actividad, pero también como medida de exploración y ansiedad. La alta frecuencia de tales conductas indica mayor locomoción y exploración refiriendo a un nivel más bajo de ansiedad (Prut, 2003 citado en Zimcikova, Simko, Karesova, Kremlacek & Malakowa, 2017). Respecto a la conducta de levantamiento, el grupo TN tuvo una tendencia a presentar un menor número de levantamientos con respecto al grupo CTRL y TN-RN, lo cual sugiere baja exploración al campo abierto, sin embargo, esto no fue estadísticamente significativo. Por otro lado, el grupo TN-RN tuvo una tendencia a aumentar los números de levantamientos con respecto al grupo CTRL, esto nos indica una alta exploración al campo abierto. La exploración al campo abierto puede verse incrementada por algunos factores como la restricción de agua o alimento (Prut & Belzung, 2003a), lo cual podría explicar lo observado en el grupo TN-RN ya que tenía restringido el alimento a la noche durante el protocolo y al momento de la prueba aún no habían recibido el alimento.

En la prueba de interacción social, el tiempo de interacción de cada uno de los roedores se ve afectado por el comportamiento del animal compañero. El comportamiento ansiolítico se infiere por un aumento en el tiempo de interacción social, por el contrario, la disminución del tiempo dedicado a la interacción en el comportamiento social indicaría un comportamiento similar al ansiogénico (Campos et al., 2013). Los tres grupos presentaron niveles similares en las

conductas evaluadas para interacción pasiva y activa, nosotros esperábamos que el grupo TN tuviera un menor número de eventos para la conducta de interacción activa. En la conducta de interacción pasiva se observó un aumento en el número de veces que los animales del grupo TN se acercaron al animal estímulo, sin embargo, esto no fue significativo. Las conductas de combates activos y de evitación social fueron similares en los tres grupos. Nuestros resultados indican que la conducta de las ratas TN no se vio afectada por un animal intruso. Consideramos que la prueba de interacción social no fue la indicada para medir conductas de ansiedad, sin embargo, hay pocos estudios donde se evalué la conducta social en animales y se vea una disminución de dicha conducta como se ha demostrado en personas que sufren de depresión y presentan menor interacción social con la gente que los rodea (Poradowska, Dudek, Rogoz & Zieba, 2009).

El protocolo de trabajo nocturno afectó algunas conductas de ansiedad. En estudios futuros sería importante evaluar la conducta de ansiedad por medio de otras pruebas, por ejemplo, laberinto elevado o la caja blanco y negro. De forma importante la restricción de alimento en la fase adecuada evita el desarrollo de las conductas de ansiedad.

Los pacientes con depresión sufren de deterioro cognitivo que incluye alteraciones en funciones ejecutivas, atención y déficit de memoria (Reppermund, Ising, Lucae & Zihl, 2009). En la prueba de reconocimiento de objetos novedosos los roedores exhiben una tendencia natural a explorar lo nuevo, por lo tanto, durante las sesiones de la prueba los roedores prefieren explorar más un objeto nuevo que uno familiar. La preferencia por el objeto novedoso indica que la memoria para el objeto familiar fue adecuadamente codificada, consolidada y recuperada para guiar el comportamiento del animal durante la prueba, esto no sucede cuando los animales exploran más el objeto familiar (Cohen & Stackman, 2015).

Nuestros datos indicaron que el grupo TN exploró por menos tiempo el objeto novedoso, aunque esto no fue significativo. Cabe destacar que el grupo TN-RN exploró por más tiempo el objeto novedoso, comportándose como el grupo CTRL con respecto al grupo TN. En los paradigmas de alteraciones circadianas como exposición a luz constante, se ha demostrado que no se afecta la memoria de

las ratas a pesar de presentar conductas de ansiedad (Castro et al., 2005). Nosotros esperábamos un déficit en la memoria espacial como se ha reportado en personas con depresión y en modelos animales que inducen conductas tipo depresivas. Se ha establecido que la memoria espacial puede estar influenciada por la intensidad, la duración, el control y la predictibilidad del estrés, el tipo específico de factor estresante, el momento que se experimenta el factor estresante y la tarea cognitiva empleada (Cazakoff, Johnson & Howland, 2010). Por lo que sugerimos que el tiempo dedicado a explorar el objeto familiar en las fases de habituación pudo haber sido mayor a 5 minutos como se ha utilizado en diferentes estudios (Cohen & Stackman, 2015) para una mayor codificación de la memoria durante la fase de prueba.

Uno de los principales síntomas de la depresión es la pérdida de interés o placer, a lo cual se le denomina anhedonia. De acuerdo con el DSM-V (Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales) las personas que sufren el Trastorno Depresivo Mayor pueden referir que se sienten menos interesados por sus *hobbies*, o que no sienten placer en las actividades que antes consideraban placenteras, lo que promueve un mayor aislamiento social.

Existen modelos animales de estrés crónico y/o leve y modelos animales de alteraciones circadianas que pueden inducir anhedonia (Stepanichev et al., 2016). Una de las pruebas para validar que los animales tienen anhedonia es la prueba preferencia de agua con azúcar. Dado que el azúcar es más apetecible que el agua simple, se considera que beber agua simple en lugar de agua con azúcar refleja niveles de anhedonia. La prueba de preferencia a agua con azúcar es un indicador del interés de un animal a un estímulo placentero, del cual solo se puede inferir "gusto" (Rizvi, Pizzagalli, Sproule & Kennedy, 2016).

Al realizar esta prueba, el grupo TN mostró una disminución del consumo de agua con azúcar al finalizar el protocolo de trabajo nocturno presentando conducta anhedónica, esto aunado a las conductas de ansiedad que se vieron reflejadas en la prueba de campo abierto. Los grupos CTRL y TN-RN tuvieron niveles similares de consumo de agua con azúcar en su línea base y en la última semana del protocolo, a pesar de que el grupo TN-RN se expuso a los cilindros

giratorios, éste no mostró conducta anhedonica, demostrando una vez más que a pesar de estar expuestos a actividad en su fase de descanso el acceso a alimento en la fase adecuada funciona como sincronizador para los animales, y evita que se presenten conductas tipo depresivas.

Nuestros resultados concuerdan con otros estudios en donde la exposición a luz constante o luz tenue por la noche han demostrado alterar los ritmos circadianos e inducir conducta anhedonica (Le Gates et al., 2012; Fonken et al., 2012; Moriya et al., 2014).

La corticosterona es la principal hormona corticosteroide en roedores, los corticosteroides no solo llegan a los órganos periféricos, sino que también llegan a las células del cerebro, en consecuencia, se espera que estas células cambien su función después del estrés, lo que tendrá un impacto en el comportamiento. En modelos animales de depresión se han encontrado altos niveles de corticosterona, esto es debido a una desregulación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA) (Joëls, Karst & Sarabdjitsingh, 2018). Diversos estudios han demostrado que el estrés crónico incrementa los niveles de corticosterona en plasma y esto se correlaciona con conductas tipo depresivas.

Debido a lo anterior, decidimos evaluar los niveles de esta hormona en los animales sometidos al protocolo de TN, CTRL y TN-RN. El grupo TN y el grupo CTRL presentaron niveles similares de corticosterona. En contraste, el grupo TN-RN presentó niveles bajos de esta hormona en comparación con el grupo CTRL. Esperábamos que el grupo TN que presentó conductas de ansiedad y tipo depresivas tuviera un aumento en la hormona corticosterona como se ha reportado en pacientes con depresión quienes presentan altos niveles de cortisol en plasma (Dean & Keshavan, 2017). Cabe señalar que, en este estudio, la corticosterona se evaluó en ZT10, es decir cuando los animales salen de los cilindros giratorios. Previamente reportamos que los animales expuestos a este protocolo de trabajo nocturno presentan altos niveles de corticosterona en dos puntos temporales, en ZT12 (al inicio de la fase activa) y en ZT2 (cuando las ratas eran colocadas en los cilindros giratorios) (Salgado-Delgado et al., 2008). Lo anterior indica que a pesar de que en ZT10 los niveles de corticosterona no son más elevados en el grupo TN, este grupo si presenta altos niveles de la



hormona en otros puntos temporales, lo cual concuerda con lo reportado en pacientes deprimidos.

Diversos trabajos han estudiado el papel de los astrocitos en relación con los trastornos del estado de ánimo como estrés, ansiedad y depresión. Altos niveles de la proteína GFAP son asociados con activación astrogial (Kim, Healey, Sepúlveda & Reissner, 2017). Nuestros resultados demuestran que el grupo TN tuvo un mayor número de células inmunorreactivas a la proteína GFAP en la amígdala basolateral y corteza prefrontal en comparación con los grupos CTRL y TN-RN, estas áreas están asociadas especialmente a la regulación emocional (Turchi et al., 2017). El aumento en el número de células positivas para GFAP en el grupo TN se relaciona con las conductas de ansiedad y la conducta anhedónica observadas en el campo abierto y en la prueba de agua con azúcar respectivamente. Lo anterior sugiere que el modelo de trabajo nocturno además de inducir comportamiento tipo depresivo induce neuroinflamación en áreas relacionadas con la regulación emocional (negativa) tal como se ha observado en pacientes con depresión (Price & Drevets, 2010).

El hipocampo es el encargado de la memoria, del procesamiento de las emociones, contiene altos niveles de receptores para glucocorticoides y regula al eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) lo que lo hace más susceptible al estrés y a la depresión (Li-Juan et al., 2014). En las áreas CA1 y CA3 del hipocampo no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos. Estos resultados concuerdan con lo reportado para la prueba de reconocimiento de objetos novedosos, en donde no se observó alterada la memoria espacial de las ratas TN. A esta prueba conductual se han asociado otras estructuras cerebrales encargadas con la memoria, por ejemplo, la corteza entorrinal y la corteza perirrinal que tienen conexión con el hipocampo. Se sabe que la información “qué” (objetos, lugares, etc.) se transmite desde la corteza perirrinal, mientras que el “dónde” se transmite a través de la corteza entorrinal, mientras que en el hipocampo se asocia la información “qué” y “dónde” (Cohen & Stackman, 2015).

La activación de la microglía es el mayor elemento neuroinflamatorio en el sistema nervioso central, proporciona defensa cuando ocurre una lesión, enfermedad o infección. Los procesos inflamatorios promueven la liberación de

mediadores proinflamatorios, por ejemplo, citocinas: factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 6 (IL-6). La microglía también ha sido estudiada en trastornos psicológicos, especialmente en la depresión (Stein, Vasconcelos, Albrechet, Ceresér, de Almeida, 2017) particularmente en la corteza cingulada anterior, corteza prefrontal y en el hipocampo (Haarman et al., 2014).

Nosotros observamos que el grupo TN presentó un aumento en el número de células positivas a IBA-1 en la amígdala basolateral en comparación con el grupo CTRL. De forma similar a lo reportado para GFAP, la amígdala basolateral fue la estructura cerebral más afectada por el protocolo de trabajo nocturno, esta estructura está asociada a las conductas de ansiedad (Bijlsma, van Leeuwen, Westphal, Olivier & Groenink, 2011), mismas que presentaron las ratas del grupo TN. En la corteza prefrontal se observa un aumento en el número de células positivas a IBA-1 en el grupo TN, pero éste no fue significativo en comparación con el grupo CTRL, se esperaba encontrar neuroinflamación en esta estructura como se ha reportado en pacientes deprimidos y en modelos animales (Tynan et al., 2010). Por otro lado, el grupo TN-RN presentó niveles similares en el número de células positivas a la proteína GFAP e IBA-1 en comparación con el grupo CTRL demostrando que el alimento presentado en la fase adecuada puede atenuar los efectos neuroinflamatorios del protocolo de trabajo nocturno. El estudio de la morfología de la microglía se ha utilizado para evaluar su estado de activación. Bajo paradigmas de estrés agudo y crónico en ratas macho, la morfología de la microglía se ve afectada en la corteza orbitofrontal, amígdala basolateral e hipocampo dorsal (CA3) (Bollinger, Collins, Patel & Wellman, 2017). Para futuros estudios se recomienda evaluar la morfología de la microglía y medir citocinas para corroborar la neuroinflamación en las áreas asociadas a la depresión.

El objetivo de incluir un grupo experimental que fue sometido a los cilindros giratorios con restricción de alimento durante la noche (fase activa) fue el de prevenir los efectos de la desincronización circadiana ocasionados por el protocolo de trabajo nocturno (Salgado-Delgado et al., 2010) y así evitar que se presenten las conductas tipo depresivas y la neuroinflamación en áreas

específicas que se han visto involucradas en la depresión. De acuerdo a lo esperado, el grupo TN-RN no presentó conductas de ansiedad y tipo depresivas y tampoco presentó neuroinflamación en áreas asociadas a la depresión demostrando que el sistema circadiano sincronizado, en este caso por el alimento en la fase adecuada, previene que se presenten las conductas tipo depresivas. Esto es relevante para los trabajadores nocturnos ya que estrategias para aminorar la desincronización podrían contribuir a su bienestar psicológico.

## **CONCLUSIONES**

Actualmente en nuestra sociedad, el trabajo nocturno es cada vez más común en el personal de salud, aviadores y vigilantes entre otros. Todas estas personas se exponen a luz artificial durante la noche, además, este horario de trabajo afecta su ciclo sueño-vigilia, horario de alimentación, procesos cognitivos y emocionales. Muy pocos estudios han evaluado como el trabajo nocturno afecta el estado de ánimo, en especial la depresión. En este estudio comprobamos que el modelo de trabajo nocturno en ratas promueve conductas de ansiedad y tipo depresivas asociado a un estado neuroinflamatorio en la amígdala basolateral y corteza prefrontal. De forma importante, reportamos que los efectos del protocolo de trabajo nocturno se atenúan cuando se restringe el acceso de alimento a la noche, lo que demuestra que el alimento actúa como sincronizador para el sistema circadiano evitando la desincronización y al mismo tiempo el desarrollo de conductas tipo depresivas. Nuestros resultados demuestran que el modelo de trabajo nocturno es un buen modelo para estudiar los mecanismos que desatan las conductas tipo depresivas en situaciones de desincronización circadiana. Lo anterior es relevante debido a que cada vez más personas se enfrentan a horarios nocturnos de trabajo y aunque comenzamos a entender las consecuencias para el estado de salud y psicológico de este esquema de trabajo, es indispensable generar estrategias para evitar o aminorar sus consecuencias sobre la salud del individuo.

## REFERENCIAS

- Albrecht, U. (2010). Circadian clocks in mood-related behaviors. *Annals of medicine*. DOI: 10.3109/07853891003677432.
- Allan, S., Rothwell, N. (2003). Inflammation in central nervous system injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. DOI 10.1098/rstb.2003.1358.
- Anacker, C., Zunszain, P., Carvalho, L., Pariante, C. (2011). The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? *Science Direct*. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2010.03.007.
- Anacker, C., Scholz, J., O'Donnell, K., Allemang, R., Diorio, J., Bagot, R., Nestler, E., Hen, R., Lerch, J., Meaney, M. (2016). Neuroanatomic differences associated with stress susceptibility and resilience. *Biol Psychiatry*. DOI: 10.1016/j.biopsych.2015.08.009.
- Ángeles Castellanos, M., Rodríguez, K., Salgado, R., Escobar, C. (2007). Cronobiología médica. Fisiología y fisiopatología de los ritmos biológicos. *Rev Fac Med. UNAM Vol. 50 N. ° 6*.
- Aubrecht, T., Jenkins, R., Nelson, R. (2015). Dim light at night increases body mass of female mice. *Chronobiol Int*. DOI: 10.3109/07420528.2014.986682.
- Bannai, A., Yoshioka, E., Saijo, Y., Sasaki, S., Kishi, R., Tamakoshi, A. (2016). The risk of developing diabetes in association with long working hours differs by shift work schedules. *J Epidemiol*. DOI: 10.2188/jea.JE20150155.
- Barclay, J., Husse, J., Bode, B., Naujokat, N., Meyer, J., Schmid, S., Lehnert, H., Oster, H. (2012). Circadian desynchrony promotes metabolic disruption in a mouse model of shiftwork. *Plos one*. DOI: 10.1371/journal.pone.0037150.
- Barres, BA. (2008). The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron*. DOI: 10.1016/j.neuron.2008.10.013.
- Bath, K., Russo, S., Pleil, K., Wohleb, E., Duman, R., Radley, J. (2017). Circuit and synaptic mechanisms of repeated stress: perspectives from differing contexts, duration, and development. *Neurobiology of stress*. DOI: 10.1016/j.ynstr.2017.05.001.
- Bechtel, W. (2015). Circadian rhythms and mood disorders: are the phenomena and mechanisms causally related? *Front. Psychiatry*. DOI: 10.3389/fpsy.2015.00118.
- Bedrosian, T., Nelson, R. (2013). Influence of the modern light environment on mood. *Mol Psychiatry*. DOI: 10.1038/mp.2013.70.

Bedrosian, T., Nelson, R. (2017). Timing of light exposure affects mood and brain circuits. *Transl Psychiatry*. DOI: 10.1038/tp.2016.262.

Ben-Hamo, M., Larson, T., Duge, L., Sikkema, C., Wilkinson, C., de la Iglesia, H., González, M. (2017). Circadian forced desynchrony of the master clock leads to phenotypic manifestation of depression in rats. *eNeuro*. DOI: 10.1523/ENEURO.0237-16.2016.

Berton, O., Nestler, E. (2006). New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nature*. DOI:10.1038/nrn1846.

Bijlsma, E., van Leeuwen, M., Westphal, K., Olivier, B., Groenink, L. (2011). Local repeated corticotropin-releasing factor infusion exacerbates anxiety- and fear-related behavior: differential involvement of the basolateral amygdala and medial prefrontal cortex. *Neuroscience*. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2010.11.026.

Boivin, D., Boudreau, P. (2014). Impacts of shift work on sleep and circadian rhythms. *Phatologie Biologie*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.patbio.2014.08.001>.

Bollinger, J., Collins, K., Patel, R., Wellman, C. (2017). Behavioral stress alters corticolimbic microglia in a sex- and brain region-specific manner. *Plos One*. DOI: 10.1371/journal.pone.0187631.

Buijs, R., Scheer, F., Kreier, F., Yi, C., Bos, N., Goncharuk, V., Kalsbeek, A. (2006). Organization of circadian functions: interaction with the body. *Progress in Brain Research*. DOI: 10.1016/S0079-6123(06)530201.

Buijs, R., Salgado, R., Sabath, E., Escobar, C. (2013). Peripheral circadian oscillators: time and food. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. DOI: 10.1016/B978-0-12-396971-2.00004-X.

Bunney, J., Potkin, S. (2008). Circadian abnormalities, molecular clock genes and chronobiological treatments in depression. *British Medical Bulletin*. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldn019>.

Cambras, T. (2006). Propiedades fundamentales de los ritmos circadianos (Cap 4). J & Rol de Lama, M (autores). *Cronobiología básica y clínica*. Madrid, España: Editec@Red.

Castro, J., Frussa, R., Fukushima, D., Chinen, C., Abilio, V., Silva, R. (2005). Effects of long-term continuous exposure to light on memory and anxiety in mice. *Physiol Behav*. 15;86(1-2):218-23.

Campos, A., Fogaça, M., Aguiar, D., Guimarães, F. (2013). Animal models of anxiety disorders and stress. *Rev. Bras. Psiquiatri*. DOI:10.1590/1516-4446-2013-1139.

Czakoff, B., Johnson, K., Howland, J. (2010). Converging effects of acute stress on spatial and recognition memory in rodents: A review of recent

behavioural and pharmacological findings. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2010.04.002.

Chaouloff, F. (2013). Social stress models in depression research: what do they tell us? *Cell Tissue Res*. DOI: 10.1007/s00441-013-1606-x.

Cho, Y., Ryu, S., Lee, B., Kim, K., Lee, E., Choi, J. (2015). Effects of artificial light at night on human health. A literature review of observational and experimental studies applied to exposure assessment. *Chronobiology Int*. DOI: 10.3109/07420528.2015.1073158.

Cohen, S., Stackman, R. (2015). Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behavioural Brain Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.08.002>.

Cryan, J., Mombereau, C., Vassout, A. (2005). The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neurosci Biobehav Rev*. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2005.03.009.

Daniels, W., Pietersen, C., Carstens, M., Stein, D. (2004). Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. *Metabolic Brain Disease*. DOI: 10.1023/B:MEBR.0000027412.19664.b3.

Dean, J., Keshavan, M. (2017). The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian J Psychiatry*. DOI: 10.1016/j.ajp.2017.01.025.

Delpech, J., Madore, C., Nadjar, A., Joffre, C., Wohleb, E., Layé, S. (2015). Microglia in neuronal plasticity: influence of stress. *Neuropharmacology*. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.12.034.

Djordjevic, J., Djordjevic, A., Adzic, M., Radojic, M. (2012). Effects of chronic social isolation on Wistar rat behavior and brain plasticity markers. *Neuropsychobiology*. DOI: 10.1159/000338605.

Drake, C.L., Roehrs, T., Richardson, G., Walsh, J.K., Roth, T. (2004). Shift work sleep disorder: prevalence and consequences beyond that of symptomatic day workers. *Sleep*. 27(8):1453-62.

Dossi, E., Vasile, F., Rouach, N. (2017). Human astrocytes in the diseased brain. *Brain Research Bulletin*. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2017.02.001.

Duman, R., Aghajanian, G. (2012). Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. *Science*. DOI: 10.1126/science.1222939.

Félix-Ortiz, A., Burgos, A., Bhagat, N., Leppla, C., Tye, K. (2016). Bidirectional modulation of anxiety-related and social behaviors by

amygdala projections to the medial prefrontal cortex. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.07.041>.

Finch, C.E. (2003). Neurons, glia, and plasticity in normal brain aging. *Neurobiology of Aging*. [http://dx.doi.org/10.1016/S0197-4580\(03\)00051-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0197-4580(03)00051-4).

Fonken, L., Nelson, R. (2011). Illuminating the deleterious effects of light at night. *F1000 Medicine Reports*. DOI:10.3410/M3-18.

Fonken, L., Kitsmiller, E., Smale, L. (2012). Dim nighttime light impairs cognition and provokes depressive-like responses in a diurnal rodent. *Journal of biological rhythms*. DOI: 10.1177/0748730412448324.

Fonken, L., Nelson, R. (2013). Dim light at night increases depressive-like responses in male C3H/HeNHsd mice. *Behavioral Brain Research*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2012.12.046>.

Fonken, L., Frank, M., Kitt, M., Barrientos, R., Watkins, L., Maier, S. (2015). Microglia inflammatory responses are controlled by an intrinsic circadian clock. *Brain Behav Immun*. DOI: 10.1016/j.bbi.2014.11.009.

Fukuhara, C., Tosini, G. (2003). Peripheral circadian oscillators and their rhythmic regulation. *Frontiers in Bioscience* 1;8: d642-51.

Guo Y, Liu, Y., Huang, X., Rong, Y., He, M., Wang, Y., Yuan, J., Wu, T, Chen, W. (2013). The effects of shift work on sleeping quality hypertension and diabetes in retired workers. *Plos One*. DOI: 10.1371/journal.pone.0071107.

Golombek, D., Casigarhi, L., Agostino, P., Paladino, N., Duhart, J., Plano, S., Chiesa, J. The times they're a changing: Effect of circadian desynchronization on physiology and disease. *Journal of physiology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphysparis.2013.03.007>.

Gronli, J., Meerlo, P., Pedersen, T., Pallensen, S., Marti, A., Wisor, J., Henriksen, T., Rempe, M., Mrdalj, J. (2017). A rodent model of night-shift work induces short-term and enduring sleep and electroencephalographic disturbances. *J Biological Rhythms*. DOI: 10.1177/0748730416675460.

Gruart, A., Delgado, JM., Escobar, C., Roblero A, R. (2002). Los relojes que gobiernan la vida, México: Fondo de Cultura Económica.

Haarman, B., Riemersma, R., Cees de Groot, J., Ruhé, H., Klein, H., Zandstra, T., Burger, H., Schoevers, R., de Vries, E., Drexhage, H., Nolen, W., Doorduyn, J. (2014). Neuroinflammation in bipolar disorder – A [11C] - (R)-PK11195 positron emission tomography study. *Brain, Behavior and Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.03.016>.

Hale, M., Schmidt, A., Mikkelsen, J., Poulsen, B., Shekhar, A, Lowry, C. (2008). Exposure to an open-field arena increases c-Fos expression in a

distributed anxiety-related system projecting to the basolateral amygdaloid complex. *Neuroscience* DOI: org/10.1016/j.neuroscience.2008.05.054.

Hall, A., Franche, R., Koehoorn, M. (2018). Examining exposure assessment in shift work research: A study on depression among nurses. *Ann Work Expo Health*. DOI: 10.1093/annweh/wxx103.

Haus, E., Smolensky, M. (2006). Biological clocks and shift work: circadian dysregulation and potential long-term effects. *Cancer Causes Control*. DOI: 10.1007/s10552-005-9015-4.

Heller, A. (2016). Cortical-subcortical interactions in depression: from animal models to human psychopathology. *Front Syst Neurosci*. DOI: 10.3389/fnsys.2016.00020.

Jeon, S., Kim, Y. (2016). Neuroinflammation and cytokine abnormality in major depression: Cause or consequence in that illness? *World J Psychiatry*. DOI: 10.5498/wjp.v6.i3.283.

Joëls, M., Karst, H., Sarabdjitsingh, R. (2018). The stressed brain of humans and rodents. *Acta Physiol (Oxf)*. DOI: 10.1111/apha.13066.

Kalmbach, D., Pillai, V., Cheng, P., Arnedt, J., Drake, C. (2015). shift work disorder, depression, and anxiety in the transition to rotating shifts: the role of sleep reactivity. *Sleep Med*. DOI:10.1016/j.sleep.2015.09.007.

Keller, J., Flores, B., Gomez, R., Brent, H., Kenna, H., Williams, G., Schatzberg, A. (2006). Cortisol circadian rhythm alterations in psychotic major depression. *Biological Psychiatry*. DOI: 10.1016/j.biopsych.2005.10.014.

Kim, R., Healey, K., Sepulveda, M., Reissner, K. (2017). Astroglial correlates of neuropsychiatric disease: from astrocytopathy to astrogliosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2017.10.002.

Kong, L., Chen, K., Tang, Y., Driesen, N., Womer, F., Fan, G., Ren, L., Jian, W., Blumberg, H., Xu, K., Wang, F. (2013). Functional connectivity between the amygdala and prefrontal cortex in medication-naïve individuals with major depressive disorder. *J Psychiatry Neurosci*. DOI: 10.1503/jpn.120117.

Kreisel, T., Frank, M., Lich, T., Resher, R., Ben-Menachem, O., Baratta, M., Yirmiya, R. (2014). Dynamic microglial alterations underlie stress-induced depressive like-behavior and suppressed neurogenesis. *Molecular Psychiatry*. DOI:10.1038/mp.2013.155.

Lee, HY., Kim, MS., Kim, O., Lee, IH., Kim, HK. (2016). Association between shift work and severity of depressive symptoms among female



nurses: the Korea nurses' health study. *J Nurs Manag.* DOI: 10.1111/jonm.12298.

Le Gates, T., Altimus, C., Wang, H., Lee, H.K., Yang, S., Zhao, H., Kirkwood, A., Weber, E., Hattar, S. (2012). Aberrant light directly impairs mood and learning through melanopsin-expressing neurons. *Nature.* DOI:10.1038/nature11673.

Leuner, B., Shors, T. (2013). Stress, anxiety, and dendritic spines: What are the connections? *Neuroscience* DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.04.021.

Levine, S. (2005). Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology.* DOI: 10.1016/j.psyneuen.2005.03.013.

Li-Juan, Z., Meng-Ying, L., Huan, L., Xiao, L., Chen, C., Zhou, H., Hai-Yin, W., Xing, J., Hai-Hui, Z., Hoonkyo, S., Dong-Ya, Z., Qi-Gang, Z. (2014). The different roles of glucocorticoids in the hippocampus and hypothalamus in chronic stress-induced HPA axis hyperactivity. *Plos One.* DOI:10.1371/journal.pone.0097689.

Li, X., Yuan, Y., Xu, H., Wu, D., Gong, W., Geng, L., Wu, F., Tang, H., Xu, L., Zhang, Z. (2015). Changed synaptic plasticity in neural circuits of depressive like-behaviors and escitalopram-treated rats. *Int J Neuropsychopharmacology.* DOI: 10.1093/ijnp/pyv046.

Liu, W., Ge, T., Leng, Y., Pan, Z., Fan, J., Yang, W., Cui, R. (2017). The role of neural plasticity in depression: from hippocampus to prefrontal cortex. *Neural plasticity.* DOI: 10.1155/2017/6871089.

Lueptow, L. (2017). Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. *J Vis Exp.* 2. DOI: 10.3791/55718.

Lunn, R., Blas, D., Coogan, a., Figueiro, M., Gorman, M., Hall, J., Hansen, J., Nelson, R., Panda, S., Smolensky, M., Stevens, R., Turek, F., Vermeulen, R., Carreón, T., Caruso, C., Lawson, C., Thayer, K., Twery, M., Ewens, A., Garner, S., Schwingl., Boyd, W (2017). Health consequences of electric lighting practices in the modern world: A report on the National Toxicology Program's workshop on shift work at night, artificial light at night, and circadian disruption. *Sci Total Environ.* DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.07.056

Mahoney, M. (2010). Shift work, jet lag, and female reproduction. *International Journal of Endocrinology.* DOI:10.1155/2010/813764.

Maletic, V., Robinson, M., Oakes, T., Ball, S., Russell, J. (2007). Neurobiology of depression: an integrated view of key findings. *Int J Clin Pract.* DOI: 10.1111/j.1742-1241.2007. 01602.x.

Marco, E., Velarde, E., Llorente, R., Laviola, G. (2016). Disrupted circadian rhythm as a common player in developmental models of neuropsychiatric disorders. *Curr Top Behav Neurosci*. DOI: 10.1007/7854\_2015\_419.

Marti, A., Meerlo, P., Gronli, J., van Hasselt, S., Mrdalj, J., Pallesen, S., Pedersen, T., Gjotterud, T., Skrede, S. (2016). Shift in food intake and changes in metabolic regulation and gene expression during simulated night-shift work: A rat model. *Nutrients*. DOI:10.3390/nu8110712.

Mazzaccoli, G., Paziienza, V., Vinciguerra, M. (2012). Clock genes and clock-controlled genes in the regulation of metabolic rhythms. *Chronobiology International*. DOI: 10.3109/07420528.2012.658127.

McGowan, N., Coogan, A. (2013). Circadian and behavioural responses to shift work-like schedules of light/dark in the mouse. *Journal of Molecular Psychiatry*. DOI: 10.1186/2049-9256-1-7.

Moriya, S., Tahara, Y., Sasaki, H., Ishigooka, J., Shibata, S. (2015). Housing under abnormal light-dark cycles attenuates day/night expression rhythms of the clock genes *Per1*, *Per2*, and *Bmal1* in the amygdala and hippocampus of mice. *Neuroscience Research*. DOI: 10.1016/j.neures.2015.05.005.

Murphy, H., Wideman, C., Nadzam, G. (2003). A laboratory animal model of human shift work. *Integr Physiol Behav Sci*. 38(4):316-28.

Ohashi, K., Yamamoto, Y., Teicher, M. (2015). Locomotor micro-activities associated with therapeutic responses in patients with seasonal affective disorders. *Integr Med Int*. 1(3):151-161.

Opperhuizen, A., van Kerkhof, L., Proper, K., Rodenburg, W., Kalsbeek, A. (2015). Rodent models to study the metabolic effects of shiftwork in humans. *Front Pharmacol*. DOI: 10.3389/fphar.2015.00050.

Ozdemir, PG., Selvi, Y., Ozkol, H., Tuluce, Y., Boysan, M., Besiroglu, L. (2013). The influence of shift work on cognitive functions and oxidative stress. *Psychiatry Research*. DOI: 10.1016/j.psychres.2013.09.022.

Padurariu, M., Antioch, I., Balmus, I., Ciobica, A., El-Lethey, H., Kamel, M. (2017). Describing some behavioural animal models of anxiety and their mechanistics with special reference to oxidative stress and oxytocin relevance. *Int J Vet Sci Med*. DOI: 10.1016/j.ijvsm.2017.08.003.

Paine, T., Swedlon, N., Swetschinski, L. (2017). Decreasing GABA function within the medial prefrontal cortex or basolateral amygdala decreases sociability. *Behavioral Brain Research*. DOI: 10.1016/j.bbr.2016.10.012.

Plano, S., Casiraghi, L., Moro, P., Paladino, N., Golombek, D., Chiesa, J. (2017). Circadian and metabolic effects of light: implications in weight

homeostasis and health. *Frontiers in Neurology* DOI: 10.3389/fneur.2017.00558.

Poradowska, M., Dudek, D., Rogoz, M., Zieba, A. (2009). Social networks of depressed patients. *Arco. Psychiatric Psychother.* 3: 35–42.

Price, J., Drevets, W. (2010). Neurocircuitry of mood disorders. *Neuropsychopharmacology*. DOI: 10.1038/npp.2009.104.

Prut, L., Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects drugs in anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*. DOI:10.1016/S0014-2999(03)01272-X.

Ramos, A., Morméde, P. (1988). Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neurosci Biobehav Rev.* Vol. 22, No. 1, pp. 33–57.

Reid, K. J & Abbott, S. M. (2015). Jet lag and shift work disorder. *Sleep Med Clin*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsmc.2015.08.006>.

Reppermund, S., Ising, M., Lucae, S., Zihl, J. (2009). Cognitive impairment in unipolar depression is persistent and non-specific: Further evidence for the final common pathway disorder hypothesis. *Psychological Medicine*. DOI: 10.1017/S003329170800411X.

Rivzi, S., Pizzagalli, D., Sproule, B., Kennedy, S. (2016). Assessing anhedonia in depression: Potentials and pitfalls. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.03.004>.

Roosendaal, B., McEwen, B., Chattarji, S. (2009). Stress, memory and the amygdala. *Nature Reviews Neuroscience*. DOI:10.1038/nrn2651.

Saavedra, LM., Navarro, B., Torner, L. (2018). Early stress activates glial cells in the hippocampus but attenuates cytokine secretion in response to an immune challenge in rat pups. *Neuroimmunomodulation*. DOI: 10.1159/000485383.

Salgado-Delgado, R., Ángeles Castellanos, M., Buijs, R., Escobar, C. (2008). Internal desynchronization in a model of night-work by forced activity in rats. *Neuroscience*. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2008.03.066.

Salgado-Delgado, R., Fuentes, B., Escobar, C. (2009). La desincronización interna como promotora de enfermedad y problemas de conducta. *Salud mental*. 32:69-76.

Salgado-Delgado, R., Ángeles-Castellanos, M., Saderi, N., Buijs, R., Escobar, C. (2010). Food intake during the normal activity phase prevents obesity and circadian desynchrony in a rat model of night work. *Endocrinology*. DOI: 10.1210/en.2009-0864.

Salgado-Delgado, R., Saderi, N., Basualdo, MC., Guerrero, N., Escobar, C., Buijs, R. (2013). Shift work or food intake during the rest phase promotes metabolic disruption and desynchrony of liver genes in male rats. *Plos One*. DOI: 10.1371/journal.pone.0060052.

Schibler, U & Sassone, C. P. (2002). A web of circadian pacemakers. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01225-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01225-4).

Serra, L. (2013). Trabajo en turnos, privación de sueño y sus consecuencias clínicas y médico legales. *Revista médica clínica Las Condes*. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(13\)70180-9](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(13)70180-9).

Shemer, A., Erny, D., Jung, S., Prinz, M. (2015). Microglia plasticity during health and disease: An immunological perspective. *Trends in Immunology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2015.08.003>.

Shuboni, D., Yan, L. (2010). Nighttime dim light exposure alters the responses of the circadian system. *Neuroscience*. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2010.08.009.

Simmons, W., Burrows, K., Avery, J., Bodurka, J., Savage, C., Drevets, W. (2016). Depression-related increases and decreases in appetite: dissociable patterns of aberrant activity in reward and interoceptive neurocircuitry. *Am J Psychiatry*. DOI: 10.1176/appi.ajp.2015.15020162.

Slattery, D.A., Cryan, J.F. (2017). Modelling depression in animals: at the interface of reward and stress pathways. *Psychopharmacology*. DOI: 10.1007/s00213-017-4552-6.

Singh, A., Abraham, W. (2017). Astrocytes and synaptic plasticity in health and disease. *Exp Brain Res*. DOI: 10.1007/s00221-017-4928-1.

Skaper, S., Facci, L., Zusso, M., Pietro, G. (2018). An inflammation-centric view of neurological disease: Beyond the neuron. *Front Cell Neurosci*. DOI: 10.3389/fncel.2018.00072.

Soria, V., Urretavizcaya, M. (2009). Circadian rhythms and depression. *Actas Esp Psiquiatr*. 37(4):222-232.

Stein, D., Vasconcelos, M., Albrechet, L., Ceresér, K., de Almeida, R. (2017). Microglial over-activation by social defeat stress contributes to anxiety and depressive like behaviors. *Front Behav Neurosci*. DOI: 10.3389/fnbeh.2017.00207.

Sternat, T & Katzman, M. (2016). Neurobiology of hedonic tone: the relationship between treatment-resistant depression, attention-deficit hyperactivity disorder, and substance abuse. *Neuropsychiatr Dis Treat*. DOI: 10.2147/NDT.S111818.

Stepanichev, M., Tishkina, A., Novikova, M., Levshina, I., Freiman, S., Onufriev, M., Levchenko, O., Lazareva, N., Gulyaeva, N. (2016). Anhedonia but not passive floating is an indicator of depressive-like behavior in two chronic stress paradigms. *Acta Neurobiol Exp.* 76(4):324-333.

Stratmann, M., Schibler, U. (2006). Properties, entrainment, and physiological functions of mammalian peripheral oscillators. *Journal of biological rhythms.* DOI: 10.1177/0748730406293889.

Suzuki, k., Ohida, T., Kaneita, Y., Yokoyama, E., Miyake, T., Harano, S., agi, Y., Ibuka, E., Kaneko, A., Tsutsui, T., Uchiyama, M. (2004). Mental health status, shift work and occupational accidents among hospital nurses in Japan *J. Occup. Health* <https://doi.org/10.1539/joh.46.448>.

Tang, Y., Kong, L., Wu, F., Womer, F., Jiang, W., Cao, Y., Ren, L., Wang, J., Fan, G., Blumberg, H., Xu, K., Wang, F. (2013). Decreased functional connectivity between the amygdala and the left ventral prefrontal cortex in treatment-naïve patients with major depressive disorder: a resting-state functional magnetic resonance imaging study. *Psychol Med.* DOI: 10.1017/S0033291712002759.

Tapia-Osorio, A., Salgado, R., Castellanos, M., Escobar, C. (2013). Disruption of circadian rhythms due to chronic constant light leads to depressive and anxiety-like behaviors in the rat. *Behavioral Brain Research.* DOI: 10.1016/j.bbr.2013.05.028.

Thorpy, M. (2012). Classification of sleep disorders. *Neurotherapeutics.* DOI: 10.1007/s13311-012-0145-6.

Touitou, Y., Reinberg, A., Touitou, D. (2017). Association between light at night, melatonin secretion, sleep deprivation, and the internal clock: health impacts and mechanisms of circadian disruption. *Life sciences.* <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.02.008>.

Tsaras, K., Papathanasiou, I., Vus, V., Panagiotopoulou, A., Katsou, MA., Kelesi, M., Fradelos, E. (2018). Predicting factors of depression and anxiety in mental health nurses: A quantitative cross-sectional study. *Medical Archives.* DOI: 10.5455/medarh.2017.72.62-67.

Turchi, F., Cuomo, A., Amodeo, G., Favaretto, E., Righini, S., Mellina, E., La mela, C., Fagiolini, A. (2017). The neural bases of social cognition in major depressive disorder: A review. *Riv Psichiatr.* 52(4): 137-149.

Tynan, R., Naicker, S., Hinwood, M., Nalivaiko, E., Buller, K., Pow, D., Day, T., Walker, F. (2010). Chronic stress alters the density and morphology of microglia in a subset of stress-responsive brain regions. *Brain Behav Immun.* DOI: 10.1016/j.bbi.2010.02.001.

Voigt, R., Forsyth, C., Keshavarzian, A. (2013). Circadian disruption: potential implications in inflammatory and metabolic diseases associated with alcohol. *Alcohol Research*. 35(1):87-96.

Wang, Q., Timberlake, MA., Prall, K., Dwivedi, Y. (2017). The recent progress in animal models of depression. *Prog Neuropsychopharmacology Biol Psychiatry*. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2017.04.008.

Waterhouse, J., Edwards, B., Atkinson, G., Reilly, T. (2006). Alteraciones exógenas de los ritmos biológicos trabajo por turnos, jet lag (Cap. 26). J & Rol de Lama, M (autores). Cronobiología básica y clínica. Madrid, España: Editec@Red.

Wen-Pei, M., Cao, J., Tian, M., Cui, MH., Han, HL., Yang, YX., Xu, L. (2007). Exposure to chronic constant light impairs spatial memory and influences long-term depression in rats. *Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2007.06.1474>.

Wideman, C., Murphy, H. (2009). Constant light induces alterations in melatonin levels, food intake, feed efficiency, visceral adiposity, and circadian rhythms in rats. *Nutritional Neuroscience*. DOI: 10.1179/147683009X423436.

Willner, P. (2017). The chronic mild stress (CMS) model of depression: History, evaluation and usage. *Neurobiology of Stress*. DOI: 10.1016/j.ynstr.2016.08.002.

Woelfer, M., Kasties, V., Kahlfuss, S., Walter, M. (2018). The role of depressive subtypes within the neuroinflammation hypothesis of major depressive disorder. *Neuroscience*. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2018.03.034.

Wright, K., Bogan, R., Wyatt, J. (2013). Shift work and the assessment and management of shift work disorder (SWD). *Sleep Med Rev*. DOI: 10.1016/j.smrv.2012.02.002.

Yan, L. (2011). Structural and functional changes in the suprachiasmatic nucleus following chronic circadian rhythm perturbation. *Neuroscience*. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.03.041.

Yirmiya, R., Rimmerman, N., Reshef, R. (2015). Depression as a microglial disease. *Trends in neuroscience*. DOI: 10.1016/j.tins.2015.08.001.

Yoshizaki, T., Kawano, Y., Noguchi, O., Onishi, J., Teramoto, R., Sunami, A., Yokoyama, Y., Tada, Y., Hida, Z, Togo, F. (2016). Association of eating behaviors with diurnal preference and rotating shift work in Japanese female nurses: a cross-sectional study. *BMJ open*. DOI: 10.1136/bmjopen-2016-011987.

Zhang, L., Luo, J., Zhang, M., Yao, W., Ma, X., Yan Yu, S. (2014). Effects of curcumin on chronic, unpredictable, mild, stress induce depressive like behavior and structural plasticity in the lateral amygdala of rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology* <https://doi.org/10.1017/S146114571300161>.

Zhao, Y., Lin, Z., Chen, L., Gu, L., Chen, F., Zhang, Q. (2018). Hippocampal astrocyte atrophy in a mouse depression model induced by corticosterone is reversed by fluoxetine instead of benzodiazepine diazepam. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2018.01.011.

Zielinski, M.R., Krueger, J.M. (2011). Sleep and innate immunity. *Front Biosci (Schol Ed)* 3: 632–642.

Zimcikova, E., Simko, J., Karesova, I., Kremlacek, J., Malakova, J. (2017). Behavioral effects of antiepileptic drugs in rats: Are the effects on mood and behavior detectable in open field test? *Seizure*. DOI: 10.1016/j.seizure.2017.09.015.