



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

Universidad Nacional Autónoma de México

---

---

Facultad de Psicología  
División de estudios profesionales

**El acceso restringido al alcohol genera  
anticipación circadiana y conductas tipo-  
adictivas**

**TESIS**

Que para obtener el título de:

**Licenciado en Psicología**

PRESENTA:

**Sebastián Boy Waxman**

Directora de Tesis:

**Dra. Carolina Escobar Briones**

Revisora:

**Dra. Irma Yolanda del Río Portilla**



Ciudad Universitaria, CDMX, 2022



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.

## **MIEMBROS DEL COMITÉ SINODAL**

Dra. Carolina Escobar Briones. Facultad de Medicina, UNAM

Dra. Irma Yolanda del Río Portilla. Facultad de Psicología, UNAM

Dra. Mónica Méndez Díaz. Facultad de Medicina, UNAM

Dra. Gabriela Orozco Calderón. Facultad de Psicología, UNAM

Dr. Hugo Sánchez Castillo. Facultad de Psicología, UNAM

## **AGRADECIMIENTOS**

Le agradezco a la Dra. Carolina Escobar, por darme la oportunidad de integrarme a su laboratorio, por la confianza, la ayuda, y todas las enseñanzas durante todos estos años en el camino a formarme en la investigación.

A María Fernanda Setien, Mafer, por trabajar conmigo en este proyecto, mantenerlo a flote durante mi semestre de intercambio, hacer más fácil y divertido el trabajo diario, su responsabilidad, y su amistad.

A Natalí, Estefa, la Sra. Bertha, y todos los miembros del Laboratorio de Ritmos Biológicos y Metabolismo que colaboraron en este proyecto y en mi formación.

A mis padres, por todo el esfuerzo y la paciencia, por apoyarme y motivarme siempre a seguir adelante, y darme las herramientas para poder seguir mis metas.

A Gen, por estar ahí en todo momento, escucharme, animarme, y darme un respiro.

A Nuria, por introducirme al campo de la Cronobiología, y apoyarme desde lejos.

Al programa de CONACYT para ayudantes de investigador SNI III o emérito, por la beca que me concedieron para la realización de este proyecto. Este trabajo fue financiado por CONACYT proyecto 239403.

Y a todas las ratas que fungieron como sujetos en este proyecto; sin sus vidas, ningún avance sería posible.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	3
ANTECEDENTES .....	5
Consumo de alcohol y trastorno por consumo de alcohol en humanos .....	5
Modelos experimentales de consumo de alcohol en ratas .....	7
Estrategias para medir conductas similares al trastorno por consumo de sustancias en ratas .....	9
Ritmos circadianos .....	12
Interacciones alcohol-ritmos circadianos .....	14
Anticipación circadiana (y no circadiana) .....	17
Anticipación al alimento .....	18
Anticipación a otras conductas motivadas .....	20
Anticipación a drogas de abuso .....	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN .....	24
OBJETIVOS .....	25
HIPÓTESIS .....	25
MATERIAL Y MÉTODOS .....	28
Sujetos y condiciones generales .....	28
Diseño experimental .....	28
Medición de consumo de agua/ALC10% .....	32
Registro de actividad general .....	34
Registro de temperatura corporal .....	36
Medición de consumo de alimento .....	37
Prueba de atracón (binge) posterior a la abstinencia .....	38
Prueba de la caja luz-oscuridad .....	38
Prueba de la gota .....	39
Análisis estadístico .....	40
RESULTADOS .....	43
Consumo de alimento .....	43

Actividad general -----	44
Temperatura Corporal -----	52
Respuestas de actividad y temperatura en abstinencia -----	58
Consumo de alcohol o agua adicional -----	61
Prueba de atracón (Binge) -----	65
Pruebas de esfuerzo -----	66
Correlaciones anticipación - conducta tipo adictiva -----	69
DISCUSIÓN -----	70
El acceso restringido al alcohol genera anticipación circadiana -----	70
El acceso restringido al alcohol genera conductas tipo adictivas -----	74
Correlación entre la anticipación y las conductas tipo adictivas -----	76
CONCLUSIONES -----	78
REFERENCIAS -----	80

## RESÚMEN

El acceso restringido de un estímulo motivante en un periodo circadiano predecible puede resultar en un cambio en el patrón de actividad general y temperatura previas al horario de acceso. Este fenómeno, denominado anticipación circadiana, se ha estudiado principalmente con el acceso al alimento, pero también se ha observado con agua, parejas sexuales, alimento apetecible y, más recientemente, algunas drogas de abuso (metanfetamina, cocaína, nicotina), pero no se conoce si ocurre con el acceso restringido a una de las drogas más prevalentes a nivel mundial: el alcohol. La conducta anticipatoria no circadiana involucra un aumento en la motivación por adquirir o consumir el estímulo. El deseo intenso por consumir alcohol (*craving*), ha mostrado un patrón circadiano en sus consumidores. Se ha hipotetizado que el desarrollo de anticipación circadiana involucre también un aumento en la motivación, generando una periodización del incremento de *craving* que, cuando el estímulo es una droga de abuso, perpetuaría el ciclo de consumo de la droga, fomentando el desarrollo de una adicción.

Para este estudio se diseñó un modelo experimental de acceso restringido al alcohol, para explorar si se puede desarrollar anticipación al acceso diario al alcohol. Adicionalmente, se realizaron mediciones de preferencia de consumo y de cuatro conductas similares a las observadas en adicción: la tolerancia, el atracón, y la permanencia de la conducta a pesar de las consecuencias negativas y a pesar de la falta de recompensas, con el fin de explorar si el desarrollo de la respuesta anticipatoria está relacionado al de estas conductas. Después de la línea base y de un periodo de inducción al alcohol a través de una exposición gradual, cuatro grupos de ratas tuvieron diariamente acceso a una solución de 10% de alcohol (grupos experimentales) o a una botella de agua, adicional a su botella de acceso *ad libitum* (grupos control) por 3 horas en su fase de reposo (ZT3 a ZT6) o en su fase de actividad (ZT15-ZT18). Después de tres semanas se exploró la persistencia de la conducta sin presentar el estímulo (abstinencia), y se realizó una serie de pruebas para identificar las conductas similares a las observadas en adicción. Se realizó seguimiento de su actividad locomotora,

temperatura corporal y consumo de alcohol y/o agua de manera continua durante todo el estudio.

Los grupos experimentales, y no los controles, mostraron un incremento significativo de actividad 15 minutos antes de la llegada del alcohol, que persistió en la abstinencia en el grupo que tuvo acceso en su fase de actividad (AN: Alcohol Noche). Sólo el grupo AN presentó cambios anticipatorios en su temperatura, que persistieron en la abstinencia. Adicionalmente, sólo los grupos experimentales mostraron una preferencia de consumo de alcohol sobre agua, y mostraron cambios significativos respecto a los controles en 3 de las cuatro conductas tipo-adictivas medidas. Sin embargo, no se encontró una correlación significativa entre estas conductas tipo-adicción y la anticipación. Esto quiere decir que el acceso diario y programado al alcohol puede generar anticipación circadiana, y fomentar la manifestación de conductas características de la adicción, pero el desarrollo de estos dos fenómenos es independiente el uno del otro.

#### **PALABRAS CLAVE**

Adicción, Alcohol, Anticipación circadiana, Consumo de sustancias, Ritmos circadianos

## INTRODUCCIÓN

Una de las drogas de abuso más comúnmente utilizada en el mundo es el alcohol. En México, el 49.1% de la población (12 a 65 años) lo ha consumido en el último año, y 33.6% ha presentado consumo excesivo. Estas cifras son las más altas entre todas las drogas estudiadas en el país, a excepción de las de la marihuana, cuya tasa de consumo ha incrementado significativamente en los últimos años (Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz [INPRF] et al., 2017; United Nations Office on Drugs and Crime [UNODC], 2021). La prevalencia del uso de alcohol en la población mundial se debe en gran parte a su legalidad, y al interés económico de la industria alcoholera, por el cual se ha dificultado la promovido el concepto de que no es una sustancia altamente dañina ((World Health Organization, 2018).

El consumo excesivo de alcohol puede tener múltiples consecuencias en la salud y la sociedad. El alcohol está asociado al desarrollo de múltiples enfermedades, y su consumo estuvo relacionado el 5.3% del total de muertes en 2016 (World Health Organization, 2018). Además, su consumo se ha relacionado con diversos de los problemas sociales más prevalentes en los países de las Américas, como el abuso y maltrato infantil, el abandono familiar, las conductas delictivas y la violencia doméstica (Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas [CICAD] & Organización de los Estados Americanos [OEA], 2019). El consumo de alcohol y la prevalencia de los problemas relacionados a él han incrementado aún más a partir de los cambios en la dinámica social derivados de la pandemia del Covid-19 (Ramalho, 2020).

El consumo repetitivo de alcohol, en conjunto con múltiples variables genéticas, socioculturales, ambientales y del desarrollo, favorecen la transición de un consumo ocasional motivado por los efectos hedónicos de la sustancia a una serie de conductas compulsivas y descontroladas orientadas al consumo, que se caracterizan como adicción (Volkow & Morales 2015). Esta es un trastorno crónico que se caracteriza por un ciclo de búsqueda y uso compulsivo de una sustancia (el alcohol), pérdida de control por su consumo, y un estado emocional negativo cuando no se tiene acceso a la sustancia.

Este ciclo involucra modificaciones en la estructura sináptica de múltiples vías de neurotransmisión, resultando en cambios plásticos en los sistemas de función ejecutiva, estrés y recompensa del cerebro (Koob & Volkow 2016).

Una característica común en la adicción es el incremento del deseo intenso por consumir (*craving*) y, por lo tanto, de las conductas orientadas al consumo, cuando se presentan ciertas condiciones sociales relacionadas al consumo, incluyendo el horario de consumo. El desarrollo de estas conductas en presencia de las condiciones relacionadas es el resultado de un proceso previo de condicionamiento que incrementa la saliencia de la droga ante la presencia de cierta condición o estímulo (Volkow et al., 2012). Se ha demostrado que estos incrementos en el *craving* también ocurren diariamente a cierta hora del día, demostrando que el consumo de alcohol tiene un patrón circadiano (Danel et al., 2003; Hisler et al., 2021). Esto abre la posibilidad de que se pueda anticipar al consumo de una manera circadiana, incrementando el *craving* y la búsqueda de alcohol antes del horario de consumo, e impulsando entonces el consumo de alcohol y el desarrollo de una adicción. De ser así, se abriría la puerta a nuevas líneas de investigación para el tratamiento y prevención de la adicción en humanos a través de la disrupción de este patrón temporal. De esa posibilidad nace la importancia de desarrollar un modelo de anticipación circadiana al alcohol en roedores.

## ANTECEDENTES

### Consumo de alcohol y trastorno por consumo de alcohol en humanos

Al ser el alcohol una sustancia legal insertada en nuestra cultura, su consumo se ha vuelto muy común en el ser humano. En México, el 71% de población de 12 a 65 años lo ha consumido alguna vez en su vida (INPRF et al., 2017). Las razones principales reportadas por las que inician su consumo son para “brindar” en eventos culturales, por curiosidad sobre los efectos de la sustancia, y “para divertirse más en la fiesta” (Kuntsche & Müller, 2012), y mantienen su consumo en etapas tempranas por conformidad o por búsqueda de los efectos en eventos sociales y, en menor medida, como mecanismo de afrontamiento contra el estrés (Smith et al., 2022).

Sin embargo, el consumo de una sustancia no necesariamente involucra adicción, hasta que este se vuelve compulsivo y se pierde el control sobre el consumo (Koob & Volkow 2016). En el Manual Estadístico de los Trastornos Mentales V (DSM-V) se utiliza la expresión “trastorno por consumo de sustancias” (en adelante “TCS”) en lugar de “adicción” como término diagnóstico para caracterizar este fenómeno. Los criterios diagnósticos para considerar un TCS en humanos están relacionados con un consumo problemático de la sustancia y la dificultad para controlarlo (Asociación Americana de Psiquiatría [APA], 2013). El diagnóstico en el DSM-V es específico por sustancia, llamándose al alcoholismo “trastorno por consumo de alcohol” (en adelante “TCA”), aunque las diferencias entre los criterios para diagnosticarlo no son radicales entre las distintas clases de drogas. Para ser considerado TCA, el consumo de alcohol debe generar un malestar significativo, y cumplir con dos de once criterios diagnósticos, mencionados a continuación (APA, 2013).

Los primeros nueve criterios se caracterizan por el consumo prolongado, a pesar de las consecuencias negativas que este conlleva, los esfuerzos por consumir y la dificultad para detener el consumo, y la presencia de *craving* (APA, 2013):

1. Consumo de alcohol con frecuencia en cantidades superiores a las previstas.

2. Deseo persistente o esfuerzos fracasados de abandonar o controlar el consumo.
3. Inversión significativa de tiempo en las actividades necesarias para conseguir alcohol, consumirlo o recuperarse de sus efectos.
4. Ansias o un poderoso deseo o necesidad de consumir alcohol (*craving*)
5. Incumplimiento de los deberes fundamentales en el trabajo, la escuela o el hogar por el consumo recurrente.
6. Consumo continuado de alcohol a pesar de sufrir problemas sociales o interpersonales, provocados o exacerbados por los efectos del alcohol.
7. Abandono o la reducción de actividades sociales, profesionales o de ocio por el consumo.
8. Consumo recurrente de alcohol en situaciones en las que provoca un riesgo físico.
9. Persistencia del consumo a pesar de saber que se sufre un problema físico o psicológico probablemente causado o exacerbado por el alcohol.

Los últimos dos criterios son la presencia de tolerancia (10) y de abstinencia (11). La tolerancia se caracteriza por una disminución progresiva del efecto de una determinada dosis de alcohol a medida que se repite su consumo, ocasionando frecuentemente una necesidad de consumir cantidades cada vez mayores de alcohol para conseguir el efecto deseado (APA, 2013; Elvig et al., 2021). La tolerancia es una consecuencia de los efectos neurobiológicos del consumo prolongado de alcohol: El consumo agudo de alcohol genera un incremento de actividad GABAérgica y disminución de actividad glutamatérgica (Littleton, 1998; Turton & Lingford-Hughes, 2020). El consumo crónico de alcohol resulta en una respuesta homeostática del sistema nervioso central, donde disminuye la función de receptores GABA-A, e incrementan los receptores a glutamato NMDA, lo que implica que una misma cantidad de alcohol tendrá un menor efecto de

desregulación de los sistemas de neurotransmisión de GABA y Glutamato (Elvig et al., 2021; Littleton, 1998; Turton & Lingford-Hughes, 2020).

La abstinencia se determina por la presencia del síndrome de abstinencia de alcohol, caracterizado por la aparición de síntomas como la hiperactividad del sistema nervioso autónomo, insomnio, temblor, náuseas, ansiedad, agitación psicomotora, entre otros, o por el consumo de alcohol con el propósito de aliviar o evitar estos síntomas (APA, 2013; Attilia et al., 2018). El síndrome de abstinencia es en buena medida consecuencia de la respuesta homeostática del sistema nervioso al consumo crónico de alcohol que caracteriza a la tolerancia: Al haber una desregulación de los receptores de GABA y glutamato, un cese repentino del consumo de alcohol puede resultar en un exceso de actividad glutamatérgica y una disminución de actividad GABAérgica que, sin el efecto del alcohol para contrarrestarlos, generará una sobre-excitabilidad neuronal, ocasionando los síntomas característicos del síndrome de abstinencia (Airagnes et al., 2019; Attilia et al., 2018; Littleton, 1998).

Los síntomas negativos que ocurren tras un periodo de abstinencia pueden promover en los humanos una reincidencia del consumo, en cantidades más altas (Koob & Volkow, 2016). El consumo en altas cantidades y en cortos periodos de tiempo, denominado como consumo tipo atracón (*binge*), aunque no es el único patrón de consumo, es uno de los más comunes entre los consumidores de alcohol (WHO, 2018). La presencia de atracón está ligada a la dependencia de alcohol, aunque se debe aclarar que no siempre que hay atracón hay dependencia (Crabbe et al., 2011).

### **Modelos experimentales de consumo de alcohol en ratas**

La prevalencia y consecuencias del consumo de alcohol y la adicción en humanos, han motivado el uso de modelos animales, particularmente roedores, para su estudio en investigaciones empíricas. Sin embargo, los roedores, por sí solos, no suelen tomar de manera voluntaria niveles altos de alcohol, como lo hacen los humanos. Dadas las

dificultades que esto presenta para el estudio del consumo de alcohol, se han desarrollado estrategias para inducir su consumo. Estos métodos incluyen el uso de sacarosa en el alcohol (Broadwater et al., 2013), el acceso restringido al alcohol en periodos intermitentes de 24 horas (Simms et al., 2008) y el uso de modelos genéticos de crianza selectiva para generar roedores de alto consumo (Crabbe et al., 2010). Para el presente estudio son particularmente importantes dos modelos de consumo: el modelo de consumo por la noche (Rhodes et al., 2005), y el de elección entre dos botellas (Richter & Campbell, 1940).

El modelo de consumo por la noche (*Drinking in the dark*) consiste en reemplazar la botella de agua por una de alcohol todos los días por un periodo fijo durante la fase de oscuridad, restringiendo el acceso al alcohol a un horario fijo (Rhodes et al., 2005). Este modelo ha demostrado generar un consumo de alcohol más alto que el que se presenta en condiciones *ad libitum* en roedores. Rhodes probó en sus estudios las condiciones óptimas en concentración de alcohol (10%), horario de acceso (ZT15) y duración del acceso (3 horas) para maximizar el consumo de alcohol. Este modelo, además, al presentar el estímulo de manera restringida en periodos circadianos, cumple con los requisitos necesarios para estudiar anticipación circadiana.

La desventaja de reemplazar la botella de agua con una de alcohol es que las condiciones son poco similares a las del consumo humano, en donde siempre existe una bebida alternativa al alcohol. El modelo de elección entre dos botellas (*Two bottle choice*) propone presentar siempre una botella de agua simple junto a la botella de alcohol (Richter & Campbell, 1940). Esto asegura que el consumo de la sustancia es voluntario y no se debe a la privación de líquidos, lo cual es especialmente importante en estudios donde se pretende medir la dependencia a la sustancia. Es común iniciar este método con una concentración baja de alcohol, e incrementar gradualmente la concentración los siguientes días (García Pardo et al., 2017).

Para este estudio, se utilizó como base el modelo de consumo por la noche, dando acceso intermitente a los sujetos durante 3 horas al día, siempre en el mismo horario, y

utilizando las condiciones óptimas de concentración, horario, y duración del acceso descritas por Rhodes (2005). Este modelo se combinó con el paradigma de las dos botellas, para garantizar el consumo voluntario de la sustancia, por lo que los sujetos tuvieron en todo momento acceso a una botella regular de agua (Richter & Campbell, 1940). Además, se incluyó también un periodo inicial donde se realizó un incremento gradual de la concentración de alcohol, como lo describe García Pardo (2017), facilitando el proceso de inducción a los sujetos. Usualmente, en el modelo de consumo por la noche, el acceso se da durante la fase de actividad de los sujetos, cuando el consumo de alcohol es mayor. Sin embargo, en la mayoría de los protocolos de anticipación, el acceso se da durante la fase de descanso de los sujetos, ya que la actividad anticipatoria es mucho más evidente cuando se contrasta con un periodo de baja actividad. Por esta razón se decidió, para este estudio, tener grupos con acceso a la sustancia durante el día y otros con acceso durante la noche. Una descripción más detallada del protocolo utilizado se encuentra en la sección de metodología.

### **Estrategias para medir conductas similares al trastorno por consumo de sustancias en ratas**

Como se mencionó previamente, el TCS es mucho más complejo que el consumo de sustancias por sí solo. Ya que algunos de los criterios de este trastorno tienen mediciones autorreportadas o subjetivas (por ejemplo, persistencia del consumo a pesar de saber que se sufre un problema) y/o están relacionados a conductas sociales características del ser humano (por ejemplo, incumplimiento de los deberes fundamentales en el trabajo, la escuela o el hogar) (APA, 2013), resultaría difícil medirlas en roedores y otros animales no humanos. Por eso, se han desarrollado varios métodos para medir en modelos animales conductas que sean equivalentes a las que se presentan en el TCS en humanos, que se han denominado “conductas tipo-adictivas”, o simplemente “conductas similares a las del TCS” (Vanderschuren & Ahmed, 2021). A continuación, se revisan cuatro de las conductas características que se han medido en modelos animales, y que se evaluaron en este estudio:

### *1- Escalamiento del consumo:*

Uno de los criterios del TCS es la tolerancia a los efectos de la droga (APA, 2013), que genera que el usuario requiera una dosis de la sustancia cada vez más alta para obtener un mismo efecto, causando un aumento progresivo en la cantidad de sustancia consumida (Elvig et al., 2021). Este consumo progresivo, llamado escalamiento, es característico de la dependencia a drogas y se ha utilizado como evidencia de conducta tipo adictiva en modelos animales (Ahmed, 2011; Planeta, 2013; Vanderschuren & Ahmed, 2021). En este estudio se midió el incremento semanal de la cantidad consumida de alcohol (o agua) como medida de escalamiento.

### *2- Abstinencia y atracón:*

Otra característica y criterio del TCS, particularmente de alcohol, es el síndrome de abstinencia. Este se puede caracterizar por la presencia de los síntomas negativos al retirar la sustancia, o por su consumo para aliviar o evitar esos síntomas (APA, 2013; Attilia et al., 2018). Los efectos negativos que resultan después de un periodo de no consumir la droga frecuentemente llevan al usuario a consumir de nuevo (Koob & Volkow, 2016).

En modelos animales, el consumo de la sustancia después de un periodo de abstinencia es muchas veces mayor al consumo previo (Vanderschuren & Ahmed, 2021). Este consumo en altas cantidades, en un corto periodo de tiempo, se denomina atracón (*binge*), y se ha observado también en roedores (Sabino et al., 2013). Este tipo de consumo después de un periodo de abstinencia ya ha sido utilizado como parte de modelos animales de adicción (De Jong et al., 2012; Vanderschuren & Ahmed, 2021). En este estudio se evaluó si el consumo de alcohol incrementó al reinstaurar el acceso por una ventana corta de tiempo, después de un periodo de abstinencia.

### *3- Uso a pesar de las consecuencias negativas:*

Otra característica de la adicción a drogas es el consumo continuado a pesar de provocar problemas o riesgos (Vanderschuren et al., 2017). Está presente en varios criterios de TCS, como el consumo en situaciones que representan un riesgo físico, el consumo continuado a pesar a pesar de sufrir problemas sociales, o la persistencia a pesar de saber que se sufre un problema físico o psicológico. (APA, 2013). En el pasado se han utilizado pruebas de persistencia de consumo a pesar de las consecuencias negativas para evaluar la conducta tipo adictiva en roedores (Planeta, 2013; Vanderschuren et al., 2017; Vanderschuren & Ahmed, 2021). La estrategia más común consiste en parear el consumo de la sustancia con un estímulo aversivo físico (por ejemplo, un shock eléctrico) y medir la persistencia del consumo (Deroche-Gamonet et al., 2004; Marchant et al., 2018).

Una posible alternativa de prueba, es la prueba de la caja luz oscuridad (Bourin & Hascoët, 2003). Esta prueba se fundamenta en la aversión innata que tienen los roedores a estar en lugares abiertos y con iluminación muy brillante. Consiste en una caja con un compartimento cerrado y oscuro y otro abierto e iluminado con luz brillante, donde el roedor tiene la libertad de pasar de un compartimento a otro. Pasar mayor tiempo en el compartimento iluminado es tomado como evidencia de menor aversión. Esta prueba se utilizó originalmente para medir ansiedad y la eficacia de dos benzodiazepinas (Clordiazepóxido y Clonazepam) (Crawley & Goodwin, 1980).

Teegarden y Bale (2007) utilizaron una versión modificada de esta prueba para medir el riesgo a pesar de la aversión a la luz en roedores cuando un estímulo reforzante (alimento alto en grasa) es colocado en el compartimento de luz de la caja. Esto presenta una alternativa a las pruebas utilizadas en el pasado para medir la búsqueda de una sustancia a pesar de las consecuencias negativas, con la ventaja de que se evita el daño físico a los animales. En este estudio se utilizó una versión similar a esta alternativa, con una botella de alcohol en el compartimento de luz de la caja, para evaluar el consumo a pesar de las consecuencias negativas.

#### *4- Dificultad para detener el consumo y prueba de la gota:*

La dificultad para detener el consumo también es una característica de la adicción a drogas (Garbusow et al., 2014; Zou et al., 2017), presente en algunos criterios del TCS, como el deseo persistente o esfuerzos fracasados de controlar el consumo, y la inversión significativa de tiempo para conseguir la sustancia (APA, 2013). Para medirla, se han utilizado pruebas de resistencia a la extinción, donde la persistencia del intento de consumo a pesar de una falta de recompensa es tomada como evidencia de dificultad para detener el consumo, y conducta tipo adictiva (Planeta, 2013; Vanderschuren & Ahmed, 2021). Un ejemplo de estas pruebas es un modelo de una caja operante, donde se mide la persistencia de palanqueo cuando este ya no está pareado a la entrega de una droga (Deroche-Gamonet et al., 2004).

Para este estudio, se desarrolló una prueba alternativa, que consiste en medir la persistencia en el intento de consumo cuando se presenta una botella que sólo contiene una gota (1mL) de la sustancia. Esta se denominó como “prueba de la gota”. Una descripción más detallada de la prueba se encuentra en la metodología.

#### **Ritmos circadianos**

El TCA es muy complejo en su causalidad y se ha relacionado con múltiples factores que pueden contribuir a su desarrollo y mantenimiento, uno de esos factores es el involucramiento de los ritmos biológicos. Aunque se han encontrado algunos efectos patrones infradianos y ultradianos relacionados al consumo (El-Guebaly, 1987), la mayoría de estas interacciones (discutidas mas adelante) se han encontrado con los ritmos circadianos.

Los ritmos circadianos son oscilaciones que ocurren en las funciones y en la conducta con ciclos alrededor de cada 24 horas y están presentes en todo tipo de organismos. La ritmicidad circadiana existe en una gran variedad de funciones fisiológicas esenciales

para los mamíferos, como el ciclo sueño-vigilia, la temperatura corporal, presión arterial, la secreción de múltiples hormonas y ciclos metabólicos (Buhr & Takahashi, 2013).

Los ciclos se mantienen coordinados con los ciclos externos gracias a estímulos del medio ambiente que ayudan a sincronizar las oscilaciones endógenas, a estos estímulos se les conoce como sincronizadores o “*zeitgebers*”. El principal sincronizador es la alternancia luz-oscuridad, que ayuda a coordinar al organismo con el ciclo ambiental día/noche (De & Henrik, 2019). En los mamíferos, la luz entra al ojo y es transmitida al núcleo supraquiasmático (NSQ) a través de las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipRGC) en la retina y por sus axones que forman el tracto retino-hipotalámico (TRH) (Ver figura 1). El NSQ utiliza esta información fótica para sincronizar sus ritmos de actividad molecular y eléctrica a las condiciones ambientales. El NSQ transmite esta información hacia osciladores periféricos tanto en el cerebro como a otros órganos para mantener la sincronización en todo el organismo y permitir la expresión fisiológica y conductual de los ritmos circadianos (Sollars & Pickard, 2015). Los ritmos circadianos no se presentan sin el NSQ (Stephan & Zucker, 1972).

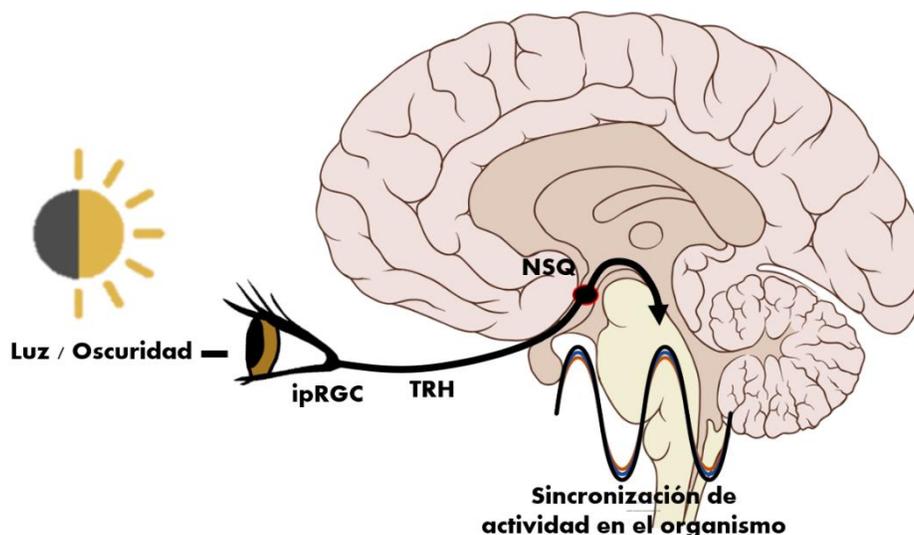


Figura 1: Esquema de la vía de la información fótica en los mamíferos. (ipRGC= células ganglionares intrínsecamente fotosensibles; TRH= tracto retino-hipotalámico; NSQ= núcleo supraquiasmático). Modificado de: Tonon et al., 2021

Esta sincronización en el organismo es necesaria para responder correctamente a las demandas del mismo (como el hambre y el sueño) sin que las funciones fisiológicas y conductuales (como comer y dormir) se contrapongan unas con otras (Buijs et al., 2013).

### **Interacciones alcohol-ritmos circadianos**

A lo largo de los años se han realizado estudios analizando la relación entre el consumo de alcohol y los ritmos circadianos, y se ha encontrado que existen múltiples puntos de interacción entre ambos. A continuación se describen los principales hallazgos en tres sentidos: los efectos de las alteraciones de los ritmos circadianos en el consumo de alcohol, las consecuencias del consumo en la ritmicidad, y el patrón circadiano de la ingesta de alcohol.

#### *Las alteraciones en los ritmos biológicos generan cambios en el consumo de alcohol*

Hay mucha evidencia de que las alteraciones en el sistema circadiano pueden resultar en cambios en el patrón de consumo de alcohol. En humanos, la desincronización circadiana causada por la diferencia del horario de sueño entre la semana laboral y el fin de semana (jet lag social) en adolescentes está relacionada a un mayor riesgo de padecer desórdenes por uso de alcohol (Hasler & Clark, 2013). Estudios clásicos han demostrado que los cambios de fase en el fotoperiodo, ya sea adelantando o retrasando la fase, generan un aumento en el consumo de alcohol en ratas Sprague-Dawley (Gauvin et al., 1997). Sin embargo, en ratas de otra cepa (Fischer), un avance de fase de seis horas resultó en una disminución en la preferencia y consumo de alcohol (Rosenwasser et al., 2010) lo que sugiere que las interrupciones cronobiológicas pueden alterar el consumo de alcohol de distintas maneras, dependiendo de factores aún poco comprendidos.

Algunos de esos factores pueden estar relacionados al modelo de desincronización circadiana utilizado. Reséndiz-Flores y Escobar (2019) encontraron que ratas sujetas a un modelo de desincronización por trabajo nocturno (shift-work) incrementan su consumo de alcohol, mientras que otras expuestas a luz por la noche (LL) no incrementaron su

consumo. Sin embargo, en ambos modelos se genera un aumento en el consumo de atracción después de un periodo de abstinencia, y cambios en un factor de transcripción para plasticidad neuronal ( $\Delta$ FosB) en estructuras cortico-límbicas. Los cambios en estas estructuras por la desincronización circadiana podrían ser el motivo de que aumente el riesgo a presentar desórdenes por uso de alcohol (Hasler & Clark, 2013).

Por otro lado, la disrupción podría generar estas alteraciones en el consumo a través de cambios en la expresión los genes involucrados en el sistema circadiano. Múltiples estudios han encontrado que las alteraciones en estos genes (*CLOCK*, *PER*, *BMAL*), ya sea por mutaciones o por análisis de polimorfismos, resultan en un aumento en el consumo de alcohol, tanto en humanos como en roedores (Damaggio & Gorman, 2014b; Logan et al., 2014). Se ha propuesto que los genes circadianos *CLOCK* y *PER2* pueden generar cambios en la regulación de dopamina en el sistema de recompensa, por lo que las disrupciones circadianas podrían tener efectos directos sobre el valor hedónico y la motivación por consumir alcohol y otras drogas de abuso (Logan et al., 2014).

### *El consumo de alcohol genera cambios en los ritmos biológicos*

La interacción entre el sistema circadiano y el consumo de alcohol no es unidireccional; ingerir alcohol puede generar cambios en los ritmos circadianos. En ratas, la administración de alcohol genera cambios en los ritmos de actividad y temperatura y una disminución general en sus valores (hipoactividad e hipotermia) (Baird et al., 1998). Esto podría deberse a que el consumo de alcohol resulta en una alteración de los ritmos de mRNA de algunos genes reloj (*Per2* y *Per3*) en el núcleo supraquiasmático de las ratas (Chen et al., 2004).

Cambios similares se han observado en pacientes alcohólicos humanos, quienes presentan una expresión disminuida de genes circadianos en sangre (Huang et al., 2010). Aunado a esto, presentan muchas variaciones en los ritmos circadianos comparados con sujetos sanos, como cambios en el ciclo de sueño-vigilia, los ritmos de temperatura corporal y los patrones de secreción de melatonina (Damaggio & Gorman,

2014b). Es posible que algunos de estos cambios persistan después de que el consumo se detiene, lo cual puede contribuir a una recaída; la queja más común en pacientes alcohólicos rehabilitados es el insomnio (Zhabenko et al., 2012).

Las correlaciones bidireccionales entre estas dos variables podrían implicar un ciclo de retroalimentación, donde el consumo de alcohol contribuye a la desincronización circadiana, y esta, a su vez, promueve el mantenimiento, incremento y recaída del uso de la sustancia.

### *El patrón temporal del consumo de alcohol*

Existen diferencias en la ingesta de alcohol a lo largo del día. En ratas, el consumo voluntario de alcohol es mayor en la fase activa (Files et al., 1993). En humanos el horario de consumo puede depender fuertemente de factores sociales, como el horario de trabajo, pero la sensación de ansia por consumir (*craving*) ocurre todos los días en horarios similares, es decir que tiene un patrón temporal. Danel y cols. (2003) encontraron que es común que el pico de *craving* en personas diagnosticadas con TCA se de en las primeras horas del día (9-11am). Recientemente, Hisler y cols. (2021) encontraron que, en consumidores de alcohol que no cumplían con las características diagnósticas para TCA, el patrón temporal de craving tuvo su pico por la noche (alrededor de las 8pm). El horario del pico se vio influenciado por múltiples factores biológicos y sociales individuales, como el horario de sueño, pero siempre se mantuvo un ritmo de alrededor de 24 horas, es decir, un patrón circadiano.

Además, no es lo mismo consumir alcohol en el día que consumirlo en la noche. La fase en la que se consume alcohol diariamente puede tener efectos diferenciales en los ritmos de actividad, la temperatura corporal, la dependencia y el síndrome de abstinencia (Damaggio & Gorman, 2014a). Esta es una de las razones por las que se decidió, para este estudio, tener grupos con acceso a la sustancia durante el día y otros con acceso durante la noche.

## **Anticipación circadiana (y no circadiana)**

Como consecuencia de la rotación de la Tierra, y por lo tanto del ciclo día-noche, hay ciertos eventos en el ambiente que se repiten diariamente a la misma hora del día. Estos eventos representan oportunidades o amenazas para los organismos, y por eso, el sistema circadiano que confiere señales internas de tiempo les da la capacidad de ajustar las funciones antes de que suceda un evento, incluso en ausencia de un estímulo externo condicionado al evento. Así, la principal función de los ritmos circadianos es la de anticipar las necesidades fisiológicas y conductuales que demandará el medio ambiente y actuar acorde a ellas para aprovechar de manera más eficiente las oportunidades que se presentarán. (Bhadra et al., 2017)

La función de anticipación circadiana se puede observar, por ejemplo, en el canto de los gallos como llamado territorial antes del amanecer (Shimmura & Yoshimura, 2006), los cambios fisiológicos y hormonales que presentan los conejos antes de amamantar a sus crías (Caba & Gonza, 2009), o los cambios en la expresión de los procesos metabólicos humanos, previo a los horarios de alimentación, de la actividad y el sueño (Dibner & Schibler, 2015).

### *Anticipación no circadiana*

La anticipación sólo es circadiana si se da por un evento que ocurre aproximadamente cada 24 horas (Bhadra et al., 2017). Existen otros mecanismos relevantes de estimación temporal (*Interval timing*) que ocurren en intervalos de segundos a minutos (Gallistel & Gibbon, 2000). Esos son los responsables de los cambios en la conducta y fisiología de un individuo en el intervalo de tiempo entre la aparición de una señal o estímulo condicionado y la llegada de una recompensa (Katner et al., 2017; Melendez et al., 2002).

Este fenómeno también podría ser relevante para el desarrollo del TCS. El consumo de drogas involucra un incremento en la señalización del sistema dopaminérgico después de la exposición a la droga (Volkow et al., 17), pero también después de la aparición de un estímulo condicionado a la aparición de la droga (Volkow et al., 2012). Así mismo,

cuando hay un intervalo de segundos a minutos entre la aparición del estímulo condicionado y el del estímulo motivante, se han observado cambios similares en el sistema dopaminérgico, que parecen estar relacionados a la motivación por obtener el estímulo (Kamada & Hata, 2021; Oleson et al., 2014).

Aunque es posible que ambos mecanismos de estimación del tiempo tengan consecuencias en el desarrollo del TCS, es importante distinguir entre ellos, ya que los mecanismos de estimación de tiempos cortos y con señales (*interval timing*) son diferentes a aquellos relacionados a ritmos de 24 hrs y sin señales (circadianos) (Petersen & Mistlberger, 2017).

### **Anticipación al alimento**

La mayoría de los estudios experimentales relativos a la anticipación circadiana se han realizado en torno a la actividad anticipatoria al alimento. En muchas especies, restringir diariamente el acceso al alimento a un horario fijo resulta en un cambio en su patrón temporal de conducta desde aproximadamente dos horas antes del horario de acceso: aumenta la actividad general, el forrajeo y conductas de búsqueda, a lo que se le ha denominado actividad anticipatoria al alimento (FAA, por sus siglas en inglés). Para que se presente la FAA, debe estar restringido el acceso al alimento y en periodos circadianos (es decir, cada 24 horas aproximadamente), la ventana de acceso no debe ser muy larga (aproximadamente 3 horas es lo más utilizado en roedores); el alimento no debe presentarse en condiciones *ad libitum* o en horarios azarosos, impredecibles. Bajo estas condiciones, también aumenta la temperatura corporal horas antes del horario de acceso al alimento, y cambia el patrón temporal de otros ciclos fisiológicos, como el ritmo de concentración de corticosterona en sangre, de liberación de enzimas gástricas, etc. La FAA ha sido propuesta como evidencia de que el sistema circadiano puede ser sincronizado por el acceso restringido al alimento (Escobar et al., 2011; Mistlberger, 1994).

Adicionalmente, muchos de los protocolos de anticipación al alimento agregan una etapa, posterior al acceso restringido, en la que el alimento no está disponible en ningún horario por pocos días. En estas condiciones, la FAA continúa presentándose, en ausencia de cualquier estímulo, en el horario en el que el alimento solía estar disponible. El mantenimiento de la conducta en ausencia del estímulo apoya la teoría de que esta anticipación supone una sincronización al horario de alimentación (Mistlberger, 2009).

*No se conoce la región neuronal ni el mecanismo molecular que subyacen la FAA*

A diferencia de la mayoría de los procesos circadianos, la FAA no requiere de una señal rítmica de luz-oscuridad, ni del núcleo supraquiasmático del hipotálamo, ya que la sincronización por alimento se presenta en protocolos con oscuridad constante y ablación del NSQ (Stephan et al., 1979). Dado esto, se han realizado múltiples estudios buscando una estructura neuronal que funcione como reloj para iniciar la anticipación circadiana al alimento. Se han revelado múltiples regiones sospechosas, pero ninguna ha resultado indispensable para la aparición de la FAA (Davidson, 2009; Escobar et al., 2011; Mistlberger, 2011; Mistlberger & Mumby, 1992).

Con estudios de lesiones ningún área ha resultado esencial para la expresión de la FAA, pero se ha demostrado que esta sí involucra cambios en el patrón temporal de actividad neuronal en múltiples regiones del cerebro, resaltando varios núcleos hipotalámicos y áreas del sistema cortico-límbico. La activación de muchas áreas al mismo tiempo ha llevado a la idea de que no hay una única estructura en particular que sea sincronizada por el acceso restringido al alimento y sea responsable de la FAA, sino que se trata de un sistema distribuido de estructuras que interactúan entre ellas (Ángeles-Castellanos et al., 2004; Ángeles-Castellanos et al., 2007; Escobar et al., 2009). Además, la FAA no parece depender de los mismos mecanismos moleculares que otros fenómenos circadianos, ya que estudios de roedores mutantes han demostrado que la actividad persiste cuando se elimina alguno de los genes reloj involucrados (Pendergast & Yamazaki, 2018).

En un intento por dilucidar los mecanismos conductuales y neuronales que subyacen la FAA, así como sus posibles implicaciones, se ha estudiado la posibilidad de que se presente anticipación a otros estímulos independientes de la luz, que podrían o no compartir los mismos mecanismos que subyacen a la anticipación al alimento.

### **Anticipación a otras conductas motivadas**

#### *El acceso restringido a estímulos reforzantes o hedónicos*

Aunque el acceso restringido al alimento es el estímulo sincronizador de FAA más ampliamente estudiado, existe evidencia de que otras conductas motivadas generan anticipación cuando se restringe el acceso a los estímulos que las propician a un horario específico.

En primer lugar, Mistlberger (1992) encontró que, al restringir el acceso al agua a una hora al día, algunas ratas muestran anticipación lamiendo la botella antes de la llegada del agua, demostrando que la restricción de líquidos también puede generar anticipación circadiana.

En nuestro grupo, se demostró que las ratas muestran actividad anticipatoria al acceso restringido de un alimento palatable (chocolate) aun cuando los sujetos no están bajo restricción de alimento (Mendoza et al., 2005). La anticipación a un alimento palatable sin restricción de alimento demuestra que la propiedad hedónica de una sustancia es suficiente para generar la actividad anticipatoria.

Por último, en ratones macho, el acceso restringido en un horario fijo a ratones hembra en esto genera actividad anticipatoria, lo cual no ocurre cuando los sujetos son del mismo sexo, por ejemplo ambas hembras. Esto demuestra que el acceso a una pareja sexual también puede generar anticipación circadiana (Hsu et al., 2010).

### *La anticipación a las conductas motivadas requiere del sistema límbico*

La ingesta de alimento y líquidos, así como la conducta sexual, son ejemplos de conductas motivadas. Estos son comportamientos orientados a satisfacer una necesidad que ayuda al organismo o a la especie a sobrevivir. Estas conductas motivadas tienen su origen en el hipotálamo y dependen principalmente de procesos homeostáticos (Hahn et al., 2019). La anticipación circadiana al alimento, agua o sexo sugieren que el fenómeno se origina de un proceso de sincronización común que posibilita las conductas motivadas. Además, la anticipación a un alimento palatable y el involucramiento del sistema de motivación y hedonismo sugieren que en la anticipación circadiana también participan las estructuras del sistema límbico y el sistema dopaminérgico (Ángeles-Castellanos et al., 2007), que es un sistema fundamental para el control hedónico de la motivación (Yang et al., 2018).

### **Anticipación a drogas de abuso**

El sistema límbico y las vías dopaminérgicas, relacionadas con el control de las conductas motivadas, están también fuertemente involucrados con el desarrollo del consumo de drogas de abuso (Di Chiara, 1995; Rodríguez De Fonseca & Navarro, 1998), por lo que tiene sentido que el fenómeno de anticipación circadiana se pueda expresar también por sincronización al acceso a estas drogas. Gillman y cols. (2019) utilizan el término “osciladores sincronizables por motivación” para referirse a regiones del cerebro responsables de la sincronización y anticipación relacionada a las conductas motivadas y las drogas de abuso.

La anticipación a las drogas se estudió primero con metanfetamina. Shibata y cols. (1994) descubrieron que una inyección diaria de metanfetamina en un horario fijo genera un aumento en la actividad general entre una y dos horas antes del horario de la inyección. Esto ocurre incluso en condiciones de luz constante y disponibilidad distribuida al alimento, descartando que se trate de una sincronización al ciclo luz-oscuridad o al hambre (Kosobud et al., 1998). Más recientemente, se encontró que la anticipación

también ocurre cuando el consumo de metanfetamina es voluntario. Cuando el acceso a metanfetaminas está restringido a un horario fijo, la anticipación es mayor si el acceso se da al inicio del día y no al final. En este estudio se propuso que el fenómeno podría estar relacionados a la activación del hipotálamo dorsomedial, la corteza orbitofrontal y el septum lateral (Juárez-Portilla et al., 2018).

Otras drogas también han mostrado producir anticipación cuando son administradas regularmente en periodos circadianos. Por ejemplo, inyecciones de cocaína producen actividad anticipatoria cuando son administradas cada 24 horas, pero no si son administradas en periodos no circadianos, cada 33 horas (White et al., 2000). Lo mismo sucede con administraciones de fentanilo, un agonista opioide con potencial de abuso, (Gillman et al., 2009).

Las inyecciones de nicotina diarias y en un horario fijo también generan actividad anticipatoria, a diferencia de las inyecciones de solución salina (Gillman et al., 2008). La anticipación se mantiene a través de manipulaciones de luz constante y de ciclos variables de luz-oscuridad, lo que implica que los estímulos de luz no están involucrados en el proceso. La anticipación disminuye con la aplicación que fármacos que actúan como antagonistas de distintas partes de las vías de orexinas, opioides y glutamato, lo que sugiere el involucramiento de estos neurotransmisores en la anticipación a la nicotina (Gillman et al., 2013).

La anticipación a todas estas drogas de abuso implica una sincronización del sistema circadiano, mismo que ocurre cuando el se anticipa a un estímulo motivante diferente. No se conoce si este fenómeno ocurre también ante el acceso restringido y predecible del alcohol.

### *Anticipación circadiana y adicción*

La anticipación a estímulos motivantes podría estar relacionada a la adicción. En nuestro grupo, se ha propuesto que la actividad anticipatoria al alimento palatable podría resultar de mecanismos similares a los que subyacen el comportamiento tipo adictivo, y que el

consumo en periodos circadianos podría originar un incremento en la dopamina, sincronizando áreas del sistema de recompensa a ese estímulo (Escobar et al., 2011).

De manera similar, se ha sugerido que la actividad anticipatoria a las drogas podría ser resultado de un incremento de la motivación por consumir droga en ciclos circadianos. Esto implicaría que la sincronización a la sustancia podría imponer ciclos de tiempo al *craving*, al uso recurrente y a la recaída ante la abstinencia (Gillman et al., 2019).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

El alcohol es una de las drogas de abuso más consumidas a nivel mundial y su consumo excesivo está relacionado a múltiples enfermedades, problemas sociales y consumo de otras drogas (CICAD & OEA 2019; INPRF et al., 2017). Una de las razones por las que el alcohol tiene tales consecuencias, es que puede desarrollar en el usuario un trastorno por consumo de alcohol, caracterizado por la falta de control sobre el consumo (Volkow & Morales, 2015; APA, 2013).

Se ha demostrado que el acceso restringido a estímulos motivantes (Mendoza et al., 2005) incluyendo algunas drogas de abuso (Gillman et al., 2019), en periodos limitados y predecibles, genera en roedores un aumento en actividad en anticipación a la llegada del estímulo. No se sabe si el fenómeno de anticipación circadiana ocurre también ante el acceso restringido a alcohol.

Tampoco se sabe si este tipo de anticipación está relacionada al nivel de consumo y dependencia a la sustancia. Se ha descrito anteriormente que la anticipación no-circadiana en intervalos de segundos a minutos (*Interval timing*) sí lo está, a través del aumento de actividad dopaminérgica en el periodo entre la aparición de una señal, o estímulo condicionado, y la entrega de un refuerzo, que incrementa la motivación y la conducta por obtenerlo (Kamada & Hata, 2021; Oleson et al., 2014). Este tipo de conducta anticipatoria es diferente a la circadiana (Petersen & Mistlberger, 2017), sin embargo, se sabe que la motivación por el consumo de alcohol también puede adquirir un patrón circadiano, ya que el *craving* en consumidores de alcohol fluctúa en un ciclo que tiene su pico aproximadamente cada 24 horas (Danel et al., 2003; Hisler et al., 2021).

Esto sugiere la posibilidad de que la anticipación circadiana también promueva en cierto grado el incremento del consumo y el desarrollo del TCA. Anteriormente se ha sugerido que la anticipación circadiana al alimento apetecible (Escobar et al., 2011) y a otras drogas de abuso (Gillman et al., 2019) podría generar incrementos temporales en la motivación por el consumo. Esto podría resultar en un incremento en el consumo y

desarrollo de dependencia en el horario regular de consumo. De ser así, la comprensión de este fenómeno abriría la puerta a la investigación de nuevas vías de tratamiento y prevención del TCA a través de la interrupción del ciclo circadiano de consumo.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

- Estudiar el fenómeno de anticipación circadiana al alcohol y su posible relación con el desarrollo de conductas tipo adictivas en ratas que consumen alcohol.

### **Objetivos particulares**

1. Evaluar el establecimiento de anticipación circadiana ante un protocolo de acceso restringido al alcohol durante el día o la noche.
2. Evaluar las conductas similares al TCA en roedores ante un protocolo de acceso restringido al alcohol durante el día o la noche.
3. Explorar la relación entre la anticipación circadiana y las conductas similares al TCA.

## **HIPÓTESIS**

### **Hipótesis generales**

1. Las ratas en un protocolo de acceso restringido al alcohol mostrarán señales de anticipación previa al horario de la llegada del alcohol.
2. Las ratas en un protocolo de acceso restringido al alcohol mostrarán conductas similares al TCA.

3. El establecimiento de anticipación circadiana se asociará al de conductas tipo adictivas.

### **Hipótesis específicas**

1.1. Las ratas en un protocolo de acceso restringido al alcohol tendrán un incremento significativo en su actividad general previo a la llegada del alcohol.

1.2. Las ratas en un protocolo de acceso restringido al alcohol tendrán un incremento significativo en su temperatura corporal previo a la llegada del alcohol.

1.3. El incremento de actividad general y temperatura corporal previo a la llegada de alcohol será visible en más puntos temporales en el protocolo con acceso de día que en el de acceso de noche.

2.1. Las ratas en un protocolo de acceso restringido al alcohol mostrarán una preferencia de consumo por el alcohol.

2.2. El consumo neto de alcohol será más alto en las ratas que consumen de noche que en las que consumen de día.

2.3. Las ratas en un protocolo de acceso restringido al alcohol mostrarán un escalamiento en su consumo a través de las semanas.

2.4. Las ratas en un protocolo de acceso restringido al alcohol mostrarán un incremento en su consumo en la prueba de atracón, después de un periodo de abstinencia.

2.5. Las ratas en un protocolo de acceso restringido al alcohol mostrarán más conductas de esfuerzo por consumir alcohol a pesar de las consecuencias negativas que los grupos control.

2.6. Las ratas en un protocolo de acceso restringido al alcohol mostrarán más conductas de esfuerzo por consumir alcohol a pesar de la falta de recompensa que los grupos control.

3.1. Los niveles de anticipación circadiana correlacionarán de manera positiva con los de conductas tipo adictivas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Sujetos y condiciones generales**

Se utilizaron 61 ratas macho de la cepa Wistar con un peso inicial entre 200 y 220 gr, provenientes del bioterio general de la Facultad de Medicina de la UNAM. Todos los sujetos fueron alojados individualmente en cajas de acrílico transparentes (40 x 50 x 20 cm) con acceso *ad libitum* a agua y comida chow estándar (Rodent Laboratory Chow 3.06 Kcal/g). Las cajas habitación se mantuvieron en racks sonoamortiguados con capacidad para 8 ratas con temperatura controlada ( $21 \pm 1$  C°), ciclo de luz/oscuridad (LD 12:12), prendido de la luz a las 8:00 am (ZT0) y flujo constante de aire. Los racks se ubicaron en un cuarto de registro aislado en el bioterio del Departamento de Anatomía, Facultad de Medicina UNAM. La manipulación de los sujetos se realizó bajo las normas de uso de animales de experimentación publicadas en la ley de protección a los animales de la CDMX (Gaceta Oficial del Distrito Federal 26/02/02) y fueron revisadas por la comisión de ética de la Facultad de Medicina de la UNAM (063/2016).

### **Diseño experimental**

Se utilizó un diseño experimental mixto (2x2) para las variables: sustancia consumida (alcohol/agua) y fase del día (noche/día), donde los sujetos fueron asignados aleatoriamente a uno de 4 grupos (Ver figura 2):

-Control Día (CD) (N=8).- 3h después de iniciada su fase de descanso (día) los sujetos tuvieron acceso durante 3 horas (ZT3 – ZT6) a una botella adicional con agua simple.

-Control Noche (CN) (N=8).- 3h después de iniciada su fase de actividad (noche) los sujetos tuvieron acceso durante 3 horas (ZT15-ZT18) a una botella adicional con agua simple.

-Alcohol Día (AD) (N=22).- 3h después de iniciada su fase de descanso (día) los sujetos tuvieron acceso por 3 horas (ZT3 – ZT6) a una botella con una solución de alcohol al 10% (ALC10%).

-Alcohol Noche (AN) (N=23).- 3h después de iniciada su fase de actividad (noche) los sujetos tuvieron acceso por 3 horas (ZT15-ZT18) a una botella con una solución de ALC10%.

Los sujetos de los grupos CD y AD fueron sometidos a un ciclo de luz/oscuridad donde las luces se encendían a las 8:00 (ZT0) y apagaban a las 20:00 (ZT12). Los sujetos de los grupos CN y AN fueron sometidos a un ciclo invertido, donde las luces se encendían a las 20:00 (ZT0) y se apagaban a las 8:00 (ZT12). Esto con el fin de que el horario geográfico en que los experimentadores debían iniciar el acceso restringido (11:00) fuera el mismo para todos los grupos.



Figura 2: Esquema de los grupos del diseño experimental. (ZT= “Zeitgeber Time” [horas a partir del encendido de las luces])

El protocolo se corrió en tres series de 7 u 8 sujetos para los grupos Alcohol, y en la tercera serie se agregó a los grupos Control. Cada serie se acomodó a diferentes etapas y no todos los sujetos pasaron por todas las pruebas, por lo que la “N” varió según la prueba realizada. Cada sección de la metodología, destinada a una medición específica, aclara la “N” de esa medición.

En la Figura 3 se muestra un esquema de las distintas etapas del diseño experimental, que se describen a continuación.

Previo a la línea base, todos los animales fueron mantenidos en sus jaulas por 2 semanas, durante las cuales se sincronizaron a sus respectivos ciclos de luz/oscuridad. Durante la segunda semana, fueron sometidos a una operación para implantar un sensor de temperatura en la cavidad intraperitoneal, seguido de 5 días de recuperación. Finalmente, se dejaron pasar de 2 a 7 días considerables como línea base antes del inicio de la fase experimental.

La fase experimental constó de 3 etapas (ver figura 3):

1.- **Etapas de inducción** (8 días): tuvo el objetivo de introducir a los sujetos al alcohol, y aumentar progresivamente su concentración (Grupos Alcohol) o introducirlos a la botella adicional de agua (Grupos Control).

El día 1, con el fin de que todos los sujetos AD y AN probaran la bebida de alcohol y así evitar un efecto de neofobia, se les retiró la botella con agua y se les dio acceso durante 24 horas únicamente a una botella con una solución de alcohol al 3%. A los grupos CD y CN, se les colocó una botella distinta con agua regular.

A partir del día 2 se dio acceso a la botella de alcohol durante las 24 horas y se permitió acceso a su bebedero con agua regular *ad libitum*. Durante esa semana se fue aumentando progresivamente la concentración de la dilución de alcohol hasta llegar al 10% que se utilizaría en las etapas siguientes. La progresión se dio de la siguiente manera: día 2 acceso libre al alcohol al 3%, días 3 y 4 acceso libre al alcohol al 6%, y días 5, 6 y 7 con acceso libre al ALC10%.

A los grupos control se les dio acceso libre tanto a la botella adicional de agua como a la botella de agua permanente en la caja habitación durante los 7 días, cambiando la botella extra de agua cada vez que se cambió la concentración de alcohol en los grupos experimentales.

**2.- Etapa de restricción (21 días):** tuvo el propósito de inducir a los sujetos a un paradigma que proporciona el acceso restringido al alcohol y posibilita su consumo en periodos circadianos

Durante 21 días, se dio acceso restringido por 3 horas al día al ALC10% (AD y CD) o la botella adicional de agua (AN y CN), iniciando el acceso 3 horas después del inicio de la luz o de la oscuridad. Así, los grupos AD y CD tuvieron acceso a la sustancia de ZT3 a ZT6 y los grupos AN y CN tuvieron acceso de ZT15 a ZT18. Para prevenir posibles artefactos en los registros de actividad por el movimiento de los experimentadores, el acceso al cuarto de monitoreo se prohibió por una hora antes del horario de acceso.

Dejando pasar el mayor tiempo posible para inducir la menor cantidad de artefactos al manipular las cajas de los animales, pero siguiendo el protocolo de higiene del laboratorio, una vez por semana. se cambió el aserrín de las cajas y se colocó alimento fresco. Esto se llevó a cabo los viernes, después de las 3 horas de acceso del restringido al alcohol o agua adicional.

Diario se monitoreó el consumo de alcohol y de agua para las 3 horas de acceso restringido. En el día 5 de la tercera semana, se midió el consumo de agua o alcohol después de 1 hora de acceso. Este valor se utilizó como referencia para comparar el consumo diario por una hora con la prueba de atracón (binge).

**3.- Etapa de abstinencia (7 días):** tuvo el objetivo de medir la respuesta de actividad y temperatura en abstinencia a la sustancia. Después de las 3 semanas de acceso restringido, se suspendió el acceso al alcohol o agua adicional durante 4 días. Al día 5 se realizó la prueba de atracón (binge) al alcohol, a la misma hora en que habían tenido acceso al alcohol o agua adicional en la etapa de restricción. En esta etapa como criterios de conducta tipo adictiva, también se evaluó la persistencia de la conducta de anticipación, y de esfuerzo por conseguir la sustancia.

Para 8 ratas de cada grupo, se corrió la prueba de la caja luz-oscuridad en el día 6 para determinar el esfuerzo por conseguir la sustancia a pesar de las consecuencias, y una

prueba de esfuerzo de consumo denominada prueba de la gota en el día 7, para determinar la dificultad para detener el consumo a y el esfuerzo por conseguir la sustancia a pesar de la falta de recompensa.

Al finalizar las etapas experimentales, se llevó a cabo la eutanasia de los sujetos vía inyección intraperitoneal de una sobredosis de pentobarbital sódico (1.5mL).

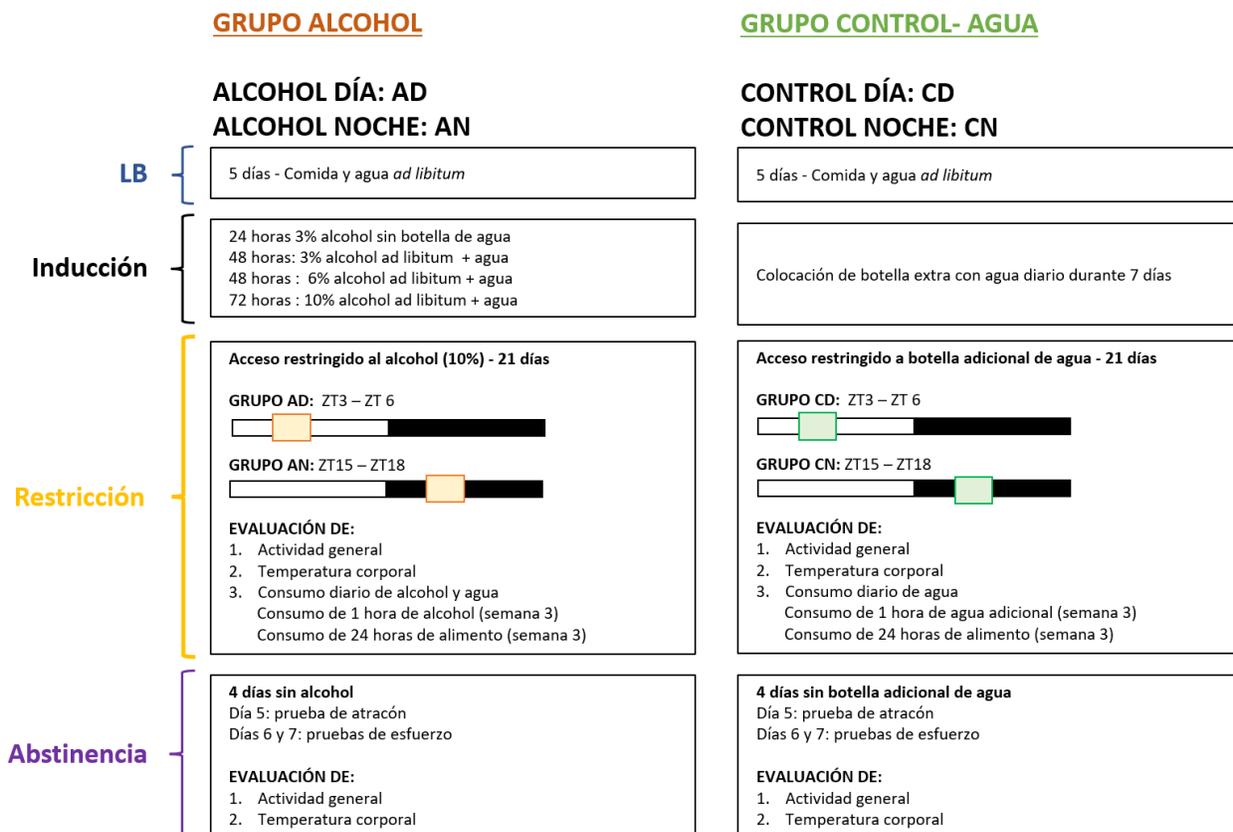


Figura 3. Esquema del diseño experimental. (ZT= “Zeitgeber Time” [horas a partir del encendido de las luces])

### Medición de consumo de agua/ALC10%

Diariamente, la botella de agua presente en la caja habitación se pesó al inicio y al final del acceso al alcohol o agua adicional (3 horas de consumo). El peso, restando el peso

de la botella vacía, se transformó a mL para conocer la cantidad de agua consumida del bebedero principal (1 g de H<sub>2</sub>O = 1 mL de H<sub>2</sub>O). Además, se monitoreó el consumo de alcohol o agua de las botellas que se colocaron para el protocolo de restricción. De estas botellas se anotó diariamente el volumen al inicio y después de finalizar el horario de acceso. Las botellas experimentales de alcohol y agua se rellenaron cada vez que se encontraran al 50% de su capacidad. La botella de agua principal y permanente en las jaulas se rellenó cada viernes al momento de cambiar el aserrín de las cajas.

Todas las ratas fueron sujetas a esta medición, la n para los análisis de medición de consumo fue la siguiente: CD=8, CN=7, AD=22, AN=23. El único sujeto que no participó en estos análisis, perteneciente al grupo CN, fue descartado porque se descubrió que mordía su botella de agua adicional, dejando caer la sustancia y comprometiendo la precisión de la medición de su consumo.

Se calculó el consumo diario promedio de alcohol o agua adicional de la última semana de la etapa de restricción y se realizó una comparación del consumo neto (mL) de la sustancia entre los grupos.

El promedio de consumo de agua del bebedero permanente de cada sujeto de la última semana de la etapa de restricción se comparó con el consumo de alcohol y agua adicional para las 3 horas de acceso. Estos valores se utilizaron para calcular el índice de preferencia de consumo de acuerdo a la siguiente fórmula: índice de preferencia= consumo de alcohol (o agua adicional) / (consumo de alcohol + consumo de agua del bebedero principal). Un índice mayor a 0.5 se tomó como indicador de la existencia de preferencia.

Se realizó también un análisis de escalamiento como medida de conducta tipo adictiva, que se obtuvo comparando el consumo promedio de alcohol o agua adicional de todos los sujetos en cada una de las tres semanas de la etapa de restricción. Para esta medida se utilizó el consumo neto y la preferencia de consumo, buscando evaluar la posible

presencia del incremento progresivo del consumo de alcohol que caracteriza a la tolerancia.

Para cada sujeto se hizo una correlación entre el escalamiento y la anticipación. Para esto, se utilizó un índice de escalamiento, que para cada sujeto se obtuvo de la diferencia del consumo de la primera semana y la última semana (índice de escalamiento = consumo en la tercera semana - consumo en la primera semana).

### **Registro de actividad general**

Los sujetos se alojaron en cajas de acrílico transparentes colocadas en racks sonoamortiguados con cupo para 8 jaulas. Abajo de cada jaula se colocó una placa de metal con sensores de presión, que registran los cambios de presión que ejerce cada rata al realizar actividad general. Los movimientos de los sujetos fueron transformados a pulsos analógicos que fueron almacenados automáticamente en unidades de 1 minuto a lo largo de las 24 horas en un sistema computarizado basado en Matlab llamado SPAD9 (Omniaiva México SA de CV) para su posterior análisis.

Después de descartar los datos de los sensores defectuosos, la N utilizada para el registro de actividad en las etapas de línea base y restricción fue la siguiente: CD= 7, CN= 7, AD= 17, AN=18.

Para controlar la diferencia en la sensibilidad de detección de presión de los sensores, los datos individuales fueron normalizados como un porcentaje de la actividad diaria (100%). Para cada grupo se obtuvieron promedios y errores estándar de cada 15 min a lo largo de todos los días del protocolo y se elaboraron mapas de calor representativos de la actividad general de cada grupo.

Con la media de actividad por cada media hora, se generaron perfiles promedio de actividad para cada grupo para la línea base, y para la última semana de la etapa de acceso restringido al alcohol o a la botella adicional de agua.

De manera similar, se utilizaron perfiles de actividad para representar la actividad de anticipación en la fase de restricción, en donde sólo se tomaron en cuenta las medias cada 15 min de una hora previa a la llegada de la sustancia (ZT2 a ZT3 para los grupos AD y CD; y ZT14 a ZT15 para los grupos AN y CN), y esta actividad se comparó con las horas correspondientes de la línea base. Adicionalmente, se realizaron deltas de cambio de la actividad de la línea base a la fase de restricción en el punto temporal correspondiente a 15 previos al horario de acceso (ZT2.75 en CD y AD, o ZT14.75 en CN y AN), y se realizó una comparación entre grupos.

Para la actividad en abstinencia, se tomaron los datos del primer día de la fase, se generaron perfiles de actividad del mismo tipo a los antes descritos, y se compararon con los de la línea base. Posteriormente, con el fin de cuantificar las diferencias de actividad alrededor del horario de acceso, se sumaron las cuentas de actividad desde una hora antes hasta una hora después del mismo (ZT2 a ZT4 en CD y AD, o ZT14 a ZT16 en CN y AN) y se compararon entre la línea base y el primer día de la fase de abstinencia. Ya que no todos los sujetos se registraron durante la etapa de abstinencia, únicamente para los datos de actividad en abstinencia, se utilizó una n como la siguiente: CD=7, CN=7, AD=4, AN=4.

Para hacer correlaciones de la anticipación con las variables de adicción, en la tercera semana de la etapa de restricción se calculó para cada sujeto la intensidad de anticipación de los 15 y 30 min previos al acceso a alcohol o agua y se calculó la diferencia con el promedio de actividad en esa misma fase (el día para AD y la noche para AN); a este valor se le denominó “coeficiente de anticipación”. Así la formula para calcular este coeficiente fue:

-Para el coeficiente 15 minutos: Para AD, (Act en ZT2.75) – [Promedio de Act de ZT0 a ZT11.75 (día)]. Para AN, (Act en ZT14.75) – [Promedio de Act de ZT12 a ZT23.75 (noche)]. “Act” representa el número de cuentas de actividad promedio en la fase de restricción, registradas en un punto temporal particular (ZT), de cada sujeto.

-Para el coeficiente 30 minutos: Para AD, (Act en ZT2.5 + Act en ZT2.75) – [Promedio de Act de ZT0 a ZT11.75 (día)]. Para AN, (Act en ZT14.5 + Act en ZT14.75) – [Promedio de Act de ZT12 a ZT23.75 (noche)]. “Act” representa el número de cuentas de actividad promedio en la tercera semana de la fase de restricción, registradas en un punto temporal particular (ZT), de cada sujeto.

Considerando que las correlaciones solo realizaron con los sujetos de la última serie que participaron en todas las pruebas de conducta tipo adictiva, y descartando aquellas con un sensor de actividad defectuoso, solamente se consideró para esta medida una N de 4, tanto para el grupo AD como el AN.

### **Registro de temperatura corporal**

Cinco a siete días antes del inicio de la línea base, los sujetos fueron sometidos a una operación para implantar un sensor de temperatura iButton (iButton Sensor-Temperature Logger; Maxim Integrated Products, Dallas, Semiconductor, USA) en la cavidad intraperitoneal; estos sensores fueron programados para recolectar los datos de la temperatura corporal cada 30 minutos.

Para la implantación del sensor, los animales fueron anestesiados con una inyección intramuscular de Xilazina (Procin 0.01ml/100g) y Ketamina (Inoketam 0.02mL/100g). Se realizó una incisión en la cavidad abdominal de aproximadamente 2 cm para la inserción del sensor previamente esterilizado (en alcohol seguido de gentamicina). Los músculos anteriores abdominales fueron suturados con catgut, hilo absorbente, y la piel fue suturada con hilo seda (triple 000). Al finalizar la cirugía se limpió el área con un microbicida (isodine) y se dejó a los sujetos en sus cajas por un periodo de recuperación con observación frecuente durante 5 días.

Después de descartar los datos de los sensores defectuosos, y considerando que no se realizó esta medición en el grupo AN durante la primera serie del protocolo, la N utilizada para el registro de temperatura en las etapas de línea base y restricción fue la siguiente: CD= 8, CN=8, AD= 19, AN=14.

Todos los termosensores, se calibraron para dar una medición inicial para la línea base de  $37.7^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Con el promedio de cada condición se generaron mapas de calor de todo el proceso experimental. También se elaboraron perfiles de temperatura para la línea base, utilizada para representar el patrón normal de actividad general de los animales, y para la última semana de la etapa de restricción.

De manera similar, se realizó un análisis más fino de la temperatura anticipatoria, en donde sólo se tomaron en cuenta las dos horas previas a la llegada de la sustancia. Debido a que los valores de temperatura corporal son distintos de día y de noche y que se observaron diferencias en la regulación de temperatura entre los animales que tomaban alcohol vs los control, para determinar la intensidad de la anticipación en la fase de restricción, (dos horas previas a la llegada de la sustancia), se tomó como cero el valor de temperatura 2 horas antes del acceso programado y se calculó el delta de cambio hasta el momento de acceso a la sustancia correspondiente.

Se realizaron también perfiles de temperatura para el primer día de abstinencia, y se compararon con la línea base. Ya que no todos los sujetos pasaron a la tercera etapa, únicamente para el análisis de la temperatura en abstinencia, se utilizó una n como la siguiente: CD=8, CN=8, AD=6, AN=6.

### **Medición de consumo de alimento**

En el cuarto día de la tercera semana de la fase de restricción, se midió el consumo de alimento de un grupo de ratas. Ya que esta medición se realizó únicamente en la tercera serie del protocolo, la n utilizada para esta fue la siguiente: CD=8, CN=8, AD=8, AN=7.

A las 8 am en hora geográfica (equivalente a ZT0 para CD y AD, y a ZT12 para CN y AN) se dejaron 40 gramos de Chow en las cajas de cada sujeto. Un investigador entró a medir el alimento restante cada 3hrs hasta las 8 pm (equivalente a ZT12 para CD y AD, y a ZT0 para CN y AN). El alimento se dejó ahí por 12hrs y se volvió a medir a las 8am del día siguiente. Dado que los animales se encontraban en ciclos invertidos, es decir que

las 8 am geográficas se encendían las luces e iniciaba el día para CD y AD pero se apagaban e iniciaba la noche para CN y AN, esto resultó en que los grupos CD y AD tuvieron 4 mediciones para conocer el consumo de ZT0 a ZT12 (día), y una medición más para el consumo de ZT12 a ZT0 (noche), mientras que los grupos CN y AN tuvieron 1 medición en su día y 4 en su noche. Por esta razón, con el fin de descartar el efecto de la manipulación, sólo se realizaron comparaciones entre grupos con el mismo patrón de medición (CD vs AD y CN vs AN).

### **Prueba de atracón (binge) posterior a la abstinencia**

Después de la etapa de restricción siguió un periodo de 4 días sin acceso al alcohol o la botella adicional de agua. Al día 5, se dio libre acceso a 30 mL de alcohol o agua adicional en las mismas botellas, lugar y horario en que recibían la sustancia en la etapa anterior. Para esta prueba, el acceso duró solamente 1 hora, se mantuvo el acceso al agua regular y se registró la cantidad de líquidos ingeridos. La N utilizada para la prueba de atracón fue la siguiente: CD=8, CN=8, AD=18, AN=17.

El consumo en esta prueba será comparado con el consumo de cada sujeto durante la primera hora de acceso, que se midió previamente, en el día 5 de la tercera semana de la etapa de restricción. Con la comparación de estos valores se calculó el índice de cambio (índice de cambio = consumo en la prueba de atracón / consumo en la primera hora en la etapa de restricción).

### **Prueba de la caja luz-oscuridad**

Dado que la prueba de atracón requería un periodo de abstinencia posterior a la fase regular de consumo, las pruebas de esfuerzo por obtener la sustancia se realizaron en los dos días siguientes a esta. El primer día de estos se sometió a un grupo de ratas a la prueba de la caja-luz oscuridad. Ya que esta prueba se realizó únicamente en la tercera serie del protocolo, la n utilizada para esta fue la siguiente: CD=7, CN=8, AD=7, AN=7.

Para esta prueba se utilizó una caja de plástico (60cm x 40cm x 35cm) con una pared que divide la caja en dos compartimientos iguales. El compartimiento de oscuridad está cerrado y es negro, el compartimiento de luz es blanco, no está techado y está colocado bajo una lámpara de luz blanca. En el compartimiento de luz se encuentra una botella con gotero de 50 mL, llena con ALC10% (grupos experimentales) o agua (grupos control). La pared divisoria cuenta con una compuerta que permite pasar de una mitad a la otra.

El día de la prueba, los sujetos fueron llevados uno por uno al cuarto de observación, durante el horario en que normalmente tendrían acceso al alcohol o agua adicional. Cada sujeto fue colocado en el compartimiento de luz y se dejó ahí durante 30 segundos con la puerta cerrada, para permitir que la rata explorara y viera la botella. Se abrió la compuerta, permitiendo la entrada a ambas partes de la caja y el sujeto permaneció sin manipulaciones por 5 minutos, después de los cuales se dio por terminada la prueba y se regresó al sujeto a su caja regular. Se utilizó una cámara de video en un trípode para grabar al sujeto durante la prueba para su posterior análisis.

Se cuantificó el tiempo pasado en el compartimiento de luz, que se tomó en cuenta cuando la cabeza del sujeto pasaba la línea entre las dos mitades, y el tiempo de interacción con la botella, en donde se consideró el olfateo directo (con la nariz en dirección a la botella y a menos de 3 cm) y el contacto físico (incluyendo el contacto con la lengua). El tiempo en el compartimiento de luz fue transformado a un índice de preferencia por el compartimiento en luz utilizando la siguiente fórmula: índice de preferencia= tiempo en luz / tiempo total de la prueba.

Para evitar sesgos, se utilizó el promedio de los valores obtenidos por dos investigadores que cuantificaron los tiempos de manera independiente. Además, se utilizó una estrategia de doble ciego, es decir, los investigadores no conocían la condición a la que pertenecían los sujetos al momento de cuantificar los datos. Se obtuvo el promedio y error estándar de ambas mediciones para compararlas entre los grupos.

## **Prueba de la gota**

Al día siguiente de la prueba de la caja luz-oscuridad, al mismo grupo de ratas en el mismo horario, se les realizó otra prueba de esfuerzo por obtener la sustancia. Ya que esta prueba se realizó únicamente en la tercera serie del protocolo, la N utilizada para esta fue la siguiente: CD=8, CN=8, AD=8, AN=7.

La prueba consistió en colocar en la caja habitación de cada sujeto la botella en la que normalmente tenían acceso al alcohol o agua adicional, pero con únicamente una gota (1mL) de la sustancia. Se grabó el comportamiento de cada sujeto por 5 minutos para su posterior análisis y después se retiró la botella. Se evaluó cuanto tiempo persistía la rata lamiendo el bebedero tratando de obtener el líquido esperado (alcohol o agua). Se analizó el tiempo de contacto físico con el bebedero con el hocico o patas, incluyendo lamer el gotero de la botella; e interacción total, que incluye la interacción activa y el olfateo: con la nariz en dirección a la botella y a menos de 3 cm.

Se evaluó por dos observadores y a ciegas para evitar sesgos. Se comparó el promedio y error estándar de ambas medidas para compararlas entre los grupos.

## **Análisis estadístico**

Para los análisis de actividad y temperatura se utilizaron pruebas ANOVA de dos vías para medidas repetidas, realizando una prueba para cada grupo en que los factores a comparar fueron condición (LB vs tercera semana de restricción) y tiempo (cada 30 min de ZT 0 a ZT 24).

Para el análisis de los perfiles de actividad y temperatura en anticipación se siguió el mismo procedimiento, con la única diferencia de que el factor tiempo consistió en valores cada 15 min de ZT 1 a ZT 3 o de ZT 13 a ZT 15. Con los valores correspondientes a 15 minutos antes del horario de acceso, se realizaron deltas de cambio entre la línea base y la fase de restricción, y se compararon entre grupos mediante un ANOVA de dos vías para grupos independientes.

Los análisis de comparación de temperatura y actividad diurna y nocturna se realizaron a través de pruebas T de Student para muestras relacionadas, comparando en la línea base contra la fase de restricción el porcentaje de actividad o la temperatura promedio en el día y en la noche.

Debido a la disparidad en la N y la alta variabilidad en los datos por ser el registro de un solo día, no se realizó ninguna prueba estadística para comparar los perfiles de actividad y temperatura de la fase de abstinencia con los de la línea base. Sin embargo, sí se analizaron estas fases en la comparación de las sumas de actividad alrededor del horario de acceso, a través de pruebas T de Student para muestras relacionadas, excepto en el caso del grupo CN, donde se utilizó una prueba no paramétrica de Wilcoxon en su lugar, ya que sus datos no cumplían con el prerrequisito de normalidad, según la prueba de Shapiro-Wilk.

Los análisis de consumo de la sustancia, preferencia de consumo, prueba de atracción y pruebas de esfuerzo por obtener la sustancia se compararon entre grupos mediante pruebas ANOVA de dos vías para grupos independientes, donde se compararon los cuatro grupos mediante los factores sustancia (alcohol vs ctrl agua) y luz (día vs noche).

Los análisis de consumo de alimento se realizaron a través de un ANOVA mixto tomando en cuenta el horario de la medición o el día vs la noche (factor de medidas repetidas), para comparar entre grupos (factor de medidas independientes).

Además, para la preferencia de consumo y para el consumo relativo en la prueba de atracción, se realizaron pruebas T de Student para muestras relacionadas comparando el consumo de alcohol o agua adicional contra el consumo de agua regular (preferencia de consumo) o el consumo de la sustancia en binge contra el consumo en la primera hora en un día de acceso restringido (consumo relativo en atracción).

Para el análisis de escalamiento se utilizaron pruebas ANOVA de una vía para medidas repetidas comparando en cada grupo el consumo por semana (sem 1 vs sem 2 vs sem

3). Además, se realizó un análisis de regresión lineal simple para conocer el valor de la pendiente en cada grupo, indicando la velocidad en la que aumentó el consumo.

Finalmente, para relacionar los datos de anticipación y conducta tipo adictiva, se utilizó para cada grupo experimental una prueba de correlación con el fin de buscar una relación entre el coeficiente de anticipación en actividad y las 6 medidas principales utilizadas para los criterios de conducta tipo adictiva. Para este propósito se utilizó el coeficiente  $r$  de correlación de Pearson.

Para todas las pruebas ANOVA, las comparaciones múltiples (post hoc) se realizaron mediante la prueba de Sidak. Se consideró significativos los datos con un alfa menor a 0.05 en todos los análisis. Todos los resultados estadísticos, a excepción de las  $P$ , fueron redondeados a tres dígitos decimales.

Todas las pruebas estadísticas utilizadas han sido descritas por Daniel (1991) y Pérez-Tejada (2008), a excepción de la prueba de comparaciones múltiples de Sidak (Midway et al., 2020) y la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk (Pedrosa et al., 2015).

## RESULTADOS

### Consumo de alimento

El promedio de consumo de alimento durante 24 horas en la tercera semana de la fase de restricción, se comparó entre los grupos de control y los experimentales (CD vs AD y CN vs AN).

El grupo CD tuvo un consumo promedio de 5g de Chow (N=8, SEM=0.78) durante el día y de 17.5g (N=8, SEM=1.19) durante la noche, y el grupo AD consumió en promedio 5.5g (N=8, SEM=0.37) durante el día y 18.38g (N=8, SEM=0.82) durante la noche. El ANOVA de dos vías mixto encontró diferencias entre el día y la noche [ $F(1, 14) = 256, P < .001$ ], pero no entre grupos [ $F(1, 14) = 0.59, P > .05$ ] ni encontró una interacción entre ellos [ $F(1, 14) = 0.06, P > .05$ ]. (Fig 4A)

El análisis del consumo acumulado también mostró patrones muy similares entre los grupos. El ANOVA de dos vías mixto encontró una diferencia sólo en el tiempo [ $F(5, 70) = 516.7, P < 0.001$ ] y no entre grupos [ $F(1, 14) = 0.14, P > .05$ ], ni una interacción [ $F(5, 70) = 0.73, P > .05$ ]. (Fig 4C)

Los resultados fueron muy similares para los grupos CN y AN. El grupo CN consumió en promedio 3.75g de Chow (N=8, SEM=0.62) durante el día y 20.63g (N=8, SEM=0.88) durante la noche, mientras que el grupo AN registró un consumo de 4.14g (N=7, SEM=0.63) durante el día y de 20.43g (N=7, SEM=1.41) durante la noche. El ANOVA encontró diferencias entre el día y la noche [ $F(1, 13) = 451.1, P < .001$ ], pero no entre grupos [ $F(1, 13) = 0.01, P > .05$ ] ni una interacción entre ellos [ $F(1, 13) = 0.14, P > .05$ ]. (Fig 4B)

En el análisis del consumo acumulado, el ANOVA encontró una diferencia en el tiempo [ $F(5, 65) = 415, P < .001$ ] pero no entre grupos [ $F(1, 13) = 0.04, P > .05$ ], ni una interacción [ $F(5, 65) = 0.19, P > .05$ ]. (Fig 4D)

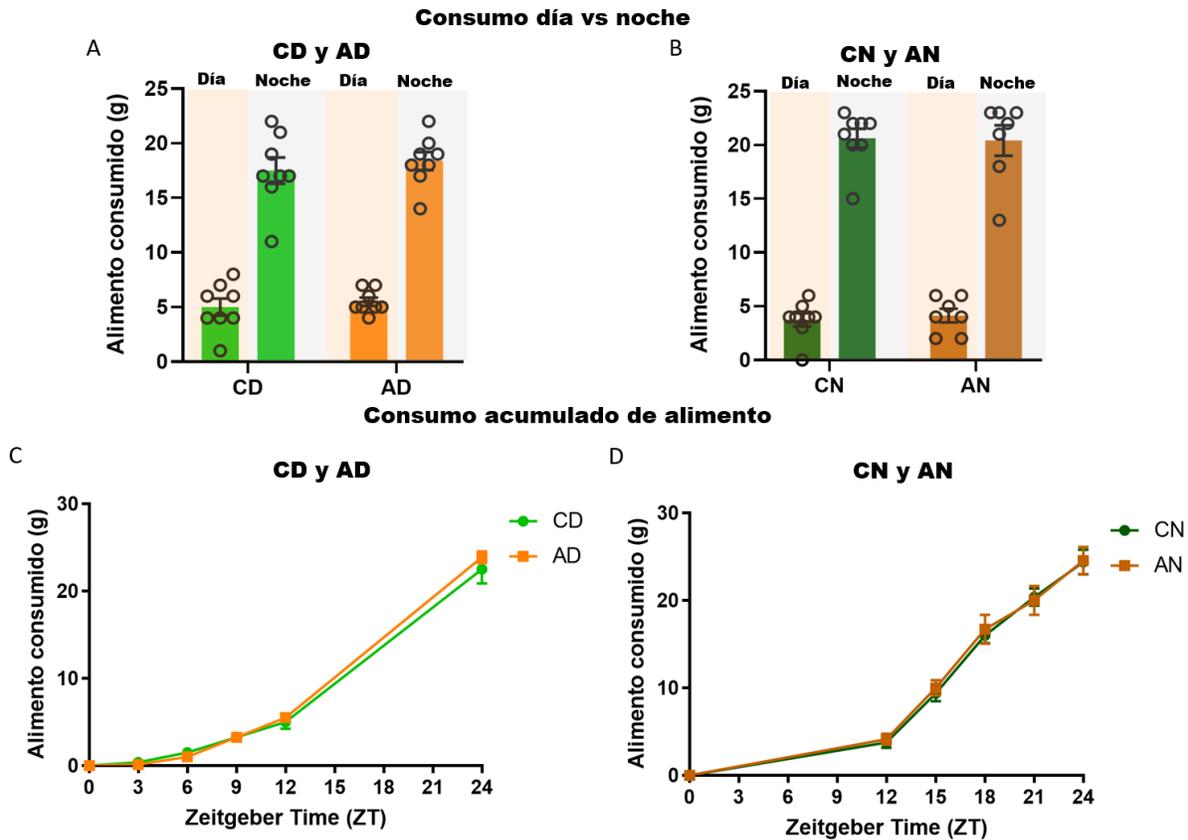


Figura 4. Consumo de alimento en 24 hrs. (A y B) Comparación del consumo diurno y nocturno entre los grupos control (CD= Control Día [n=8]; CN= Control Noche [n=8]) y experimentales (AD= Alcohol Día [n=8]; AN= Alcohol Noche [n=7]). (C y D) Consumo acumulado a través de las 24 hrs del día. En ningún caso se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Los círculos (o) representan los valores individuales de los sujetos. (*Zeitgeber Time*: horas a partir del encendido de las luces).

## Actividad general

### *Patrón diario de actividad general*

En la línea base y fase experimental los grupos CD (Fig 5 A y B) y CN (Fig 5 C y D) mostraron un patrón circadiano de actividad sincronizado al ciclo luz-oscuridad, con poco movimiento durante el día (ZT0-12, entre 13 y 20%) y la mayoría de la actividad durante la noche (ZT12-0, entre 80-87%). Este porcentaje no se modificó entre las 2 etapas experimentales (ver Fig 7A)

Durante la inducción y la fase de restricción se observó un aumento en las cuentas de actividad coincidiendo con la llegada del experimentador a colocar la botella adicional de agua, y otro pico de menor intensidad al llegar a retirar las botellas (ver flechas rojas en Fig 5 B y D). Estos incrementos se pueden visualizar como puntos naranjas a rojos en los mapas de actividad (Fig 5 A y C) y como picos de actividad diaria en los perfiles de actividad (Fig 5 B y D).

El ANOVA de dos vías reveló en el grupo CD que no hay diferencias en la condición entre la línea base y la fase de restricción [ $F(1, 6) = 0.02, P > .05$ ], pero sí en el cambio de actividad a lo largo del tiempo (día-noche) [ $F(47, 282) = 29.23, P < .001$ ] y una interacción entre ambos [ $F(47, 282) = 2.754, P < .001$ ]. Las comparaciones post hoc mostraron diferencias significativas en ZT 3, que coincide con el horario en que se colocaba la botella de agua adicional (Fig 5B).

En el grupo CN se encontraron diferencias entre la línea base y la fase de restricción [ $F(1, 6) = 9.247, P < .05$ ], en el cambio de actividad a través del tiempo [ $F(47, 282) = 37.23, P < .001$ ] y una interacción entre ellos [ $F(47, 282) = 4.057, P < .001$ ]. Las comparaciones post hoc mostraron diferencias significativas en ZT 15 y ZT 18, asociados al horario en que se colocaba y retiraba la botella de agua adicional, y en ZT 19.5, una hora y media posterior al retirado de las mismas (Fig 5D).

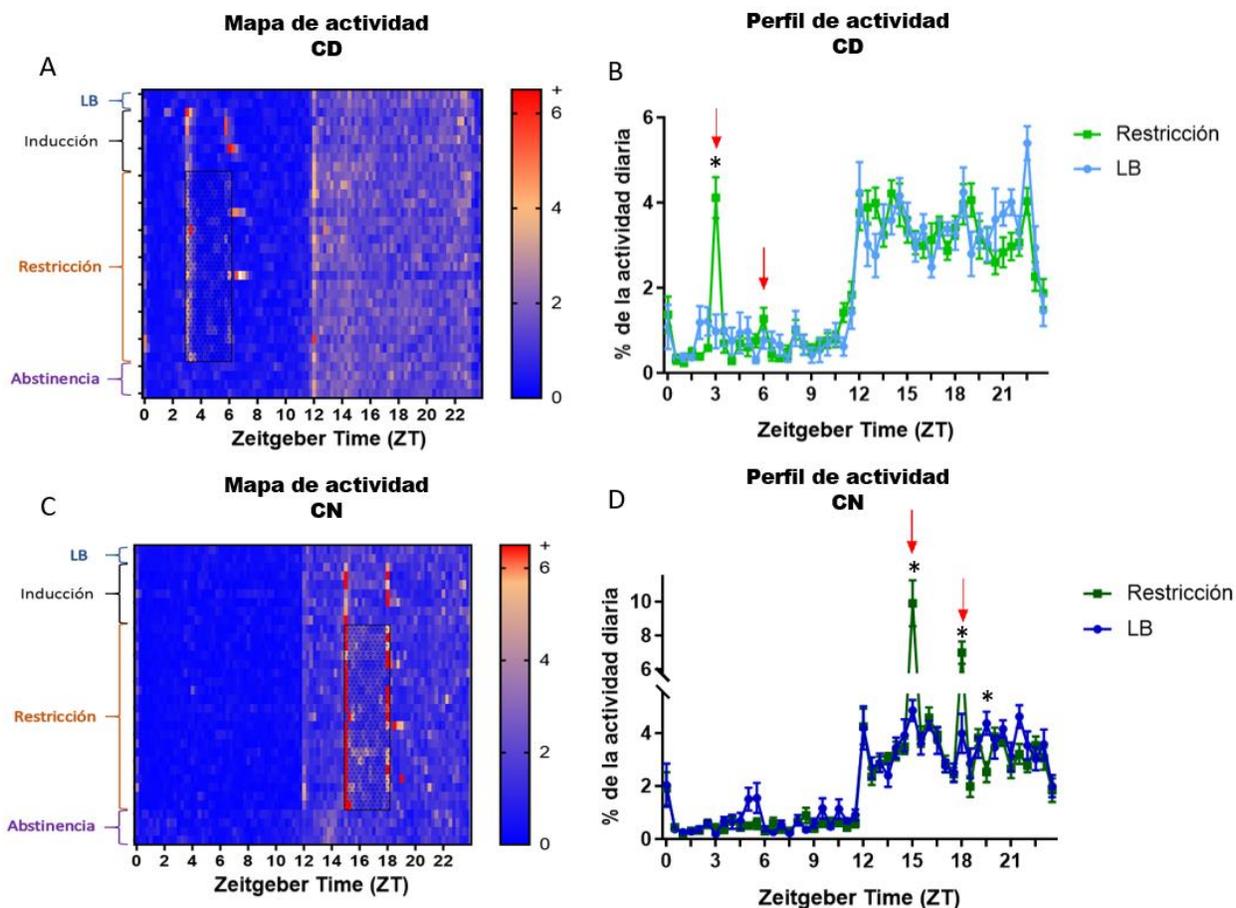


Figura 5. Actividad general de los grupos Control. (A y C) Mapas de calor de actividad promedio de los grupos CD (Control Día [n=7]) y CN (Control Noche [n=7]). Los rectángulos representan el horario de acceso a la botella de agua adicional. (B y D) Promedio de actividad en línea base (azul) y en la última semana de la fase de restricción (verde) de los grupos CD y CN. Las flechas representan el inicio y final del horario de acceso al agua adicional. Los asteriscos (\*) representan diferencias significativas ( $P < .05$ ) entre la línea base y la fase experimental. *Zeitgeber Time*: horas a partir del encendido de las luces.

Los grupos AD (Fig 6 A y B) y AN (Fig 6 C y D) también mostraron un patrón circadiano normal de actividad durante la línea base y las fases experimentales. En la línea base el grupo AD y AN mostraron baja actividad de día (entre 18.35% y 23%) y alta por la noche (82% a 75%). En la fase de exposición al alcohol, el grupo AD tuvo cambios no significativos en estos porcentajes, cambiando a 25.47% durante el día y a 74.53% durante la noche. Por su parte, en el grupo AN se fortaleció la actividad nocturna a

82.32% y la diurna disminuyó a 17.68%; esta diferencia fue significativa [ $t(17)=2.979$ ,  $P<.01$ ] (Ver Fig 7B).

Igual a como se observó con los controles, a partir de la inducción se presentaron, picos en las cuentas de actividad por la colocación y retiro de la botella de alcohol. Sin embargo y a diferencia de los grupos Control, durante la etapa de restricción, el aumento de actividad inició hasta 30 minutos antes del inicio y final del horario de acceso. Esto se puede observar en los mapas de calor como los puntos naranjas a rojos, que aparecen antes del rectángulo que indica el horario de acceso al alcohol (Fig 6 A y C) y en los picos de actividad diaria, que inician un punto temporal antes de las flechas que indican el horario de acceso al alcohol, en los perfiles de actividad (Fig 6 B y D).

El ANOVA de dos vías reveló en el grupo AD que no hay diferencias entre la línea base y la fase de restricción [ $F(1, 16) = 0.99$ ,  $P>.05$ ], pero sí en el cambio de actividad a través del tiempo [ $F(47, 752) = 40.59$ ,  $P<.001$ ] y una interacción entre ambos [ $F(47, 752) = 3.523$ ,  $P<.001$ ]. Las comparaciones post hoc mostraron diferencias significativas en ZT 2.5, 30 minutos antes del mismo y en ZT 3, correspondiente a la colocación de la botella de alcohol (Fig 6B).

En el grupo AN, no se encontraron diferencias entre la línea base y la fase de restricción [ $F(1, 17) = 0.02$ ,  $P>.05$ ], pero sí en el cambio de actividad a través del tiempo [ $F(47, 799) = 94.46$ ,  $P<.001$ ] y una interacción entre ambos [ $F(47, 799) = 5.092$ ,  $P<.001$ ]. Las comparaciones post hoc mostraron diferencias significativas en ZT 14.5 y ZT 17.5, correspondientes a 30 minutos previos a estos horarios, y en ZT 15 y ZT 18, asociados a la retirada de las botellas de alcohol, así como y en ZT 0, coincidente con el encendido de las luces (Fig 6D).

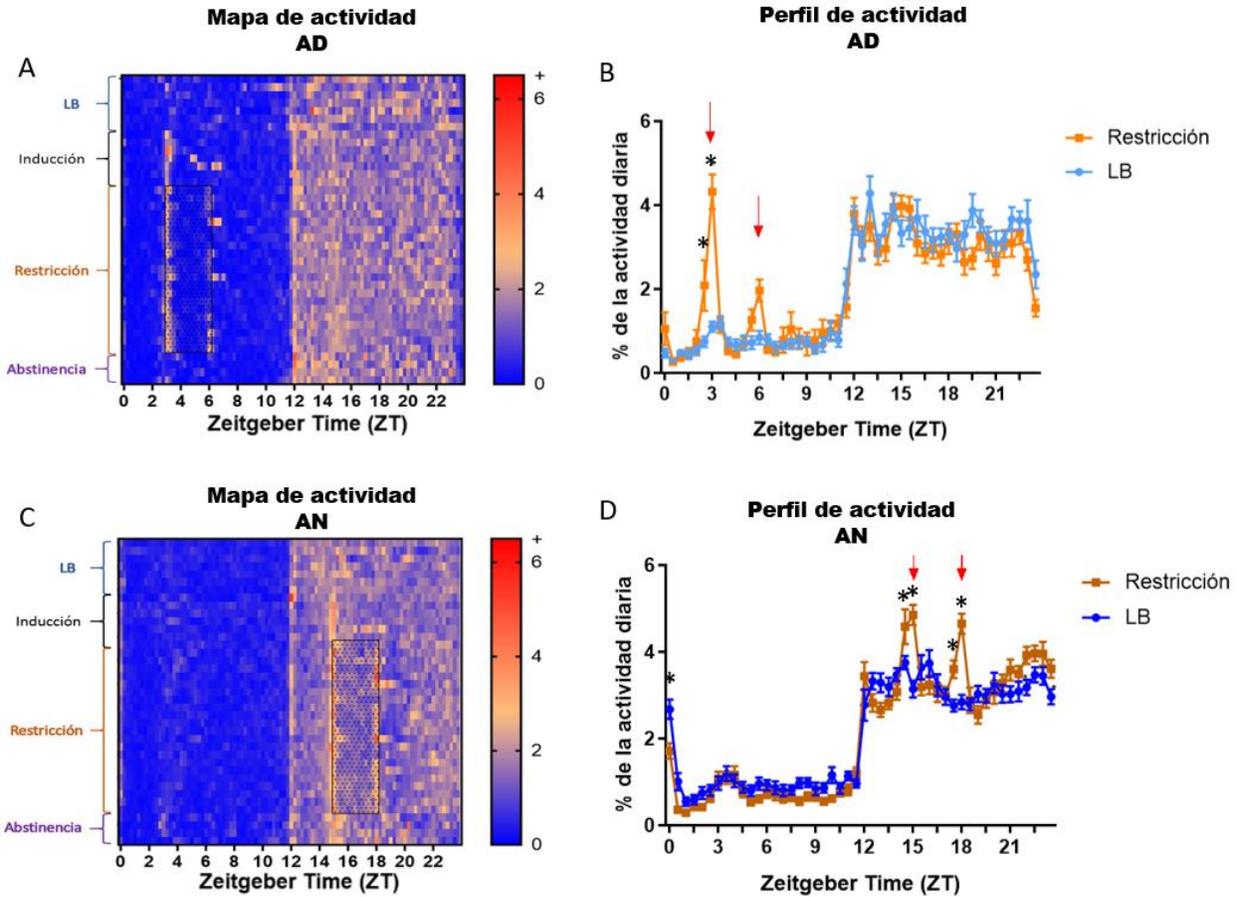


Figura 6. Actividad de los grupos expuestos a ALC10%. (A y C) Mapas de calor de actividad promedio de los grupos AD (Alcohol Día [n=17]) y AN (Alcohol Noche [n=18]). Los rectángulos representan el horario de acceso al alcohol en restricción. (B y D) Promedio de actividad en línea base y en la última semana de la fase de restricción de los grupos AD y AN. Las flechas representan el inicio y final del horario de acceso al alcohol. Los asteriscos (\*) representan diferencias significativas ( $P < .05$ ). *Zeitgeber Time*: horas a partir del encendido de las luces.

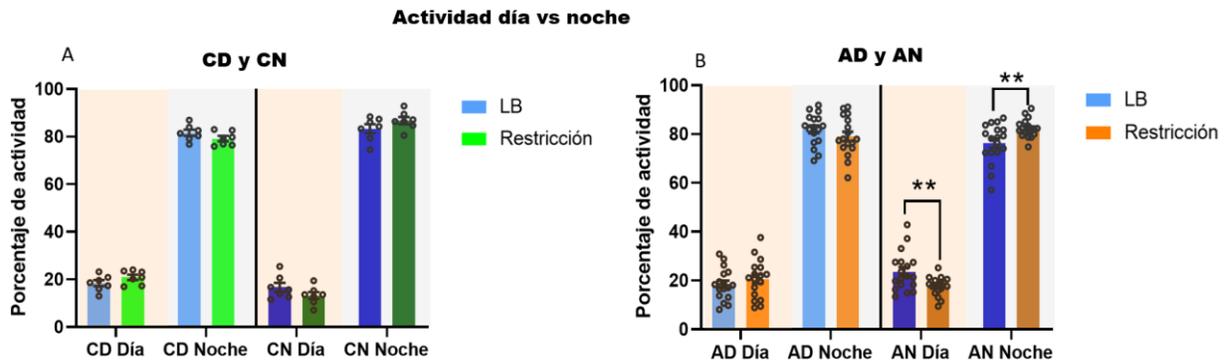


Figura 7. Actividad día vs noche. Porcentaje de actividad diurna y nocturna durante la línea base

(LB) y la fase de restricción de los grupos control (A) (CD= Control Día [n=7]; CN= Control Noche [n=7]) y experimentales (B) (AD= Alcohol Día [n=17]; AN= Alcohol Noche [n=18]). Los asteriscos (\*) representan diferencias significativas entre la LB y la fase de restricción (\*\*=P<.01). Los círculos (o) representan los valores individuales de los sujetos.

### *Actividad de anticipación*

El análisis de las dos horas previas al horario de acceso a la botella adicional de agua (grupos CD y CN) o a la botella de alcohol (grupos AD y AN) evidenció una activación en anticipación de 15 minutos antes del horario de acceso solamente para los grupos AD y AN.

El ANOVA de dos vías mostró para el grupo CD que no hay diferencias en la condición entre la línea base y la fase de restricción [F (1, 6) = 3.19, P>.05], pero sí en el cambio de actividad a través del tiempo [F (4, 24) = 13.38, P<.001] y una interacción entre ambos [F (4, 24) = 17.58, P<.001]. Las comparaciones post hoc no mostraron diferencias, salvo en ZT 3, que coincide con el horario en que se colocaba la botella de agua adicional (Fig 8A).

De manera similar, en el grupo CN se encontraron diferencias entre la línea base y la fase de restricción [F (1, 6) = 11.54, P<.05], en el cambio de actividad a través del tiempo [F (4, 24) = 1.11, P<.001] y una interacción entre ellos [F (4, 24) = 10.87, P<.001]. Las comparaciones post hoc mostraron no diferencias, excepto en ZT 15, correspondiente al horario en que se colocaba la botella de agua adicional (Fig 8B).

Por otro lado, el grupo AD mostró diferencias entre la línea base y la fase de restricción [F (1, 16) = 16.85, P<.001], en el cambio de actividad a través del tiempo [F (4, 64) = 24.94, P<.001] y una interacción entre ellos [F (4, 64) = 14.03, P<.001]. Además de en el horario en que se colocaba la botella de alcohol, las comparaciones post hoc también mostraron diferencias significativas en ZT 2.75, correspondiente a los 15 minutos previos al horario de acceso (Fig 8C).

Igualmente, en el grupo AN, se encontraron diferencias en condición entre la línea base y la fase de restricción [ $F(1, 17) = 10.78, P < .01$ ], en el cambio de actividad a través del tiempo [ $F(4, 68) = 14.91, P < .001$ ] y una interacción entre ambos [ $F(4, 68) = 12.85, P < .001$ ]. Al igual que en AD, las comparaciones post hoc mostraron diferencias significativas en el horario de llegada de la botella de alcohol, pero también en ZT 14.75, correspondiente a los 15 minutos previos al mismo (Fig 8D).

La diferencia entre los grupos CD y CN y los grupos AD y AN es la activación que ocurre 15 minutos antes del horario de acceso. Esta se evidenció con un delta de cambio entre línea base y la última semana de la fase de restricción, en el horario correspondiente a 15 minutos previos al horario de acceso (ZT2.75 para CD y AD y ZT14.75 para CN y AN). Un ANOVA de dos vías para grupos independientes reveló una diferencia en la variable agua adicional vs alcohol [ $F(1, 45) = 9.837, P < .01$ ], y no en día vs noche [ $F(1, 45) = 0.38, P > .05$ ] ni una interacción entre ellos [ $F(1, 45) = 0.01, P > .05$ ] (Ver Fig 9).

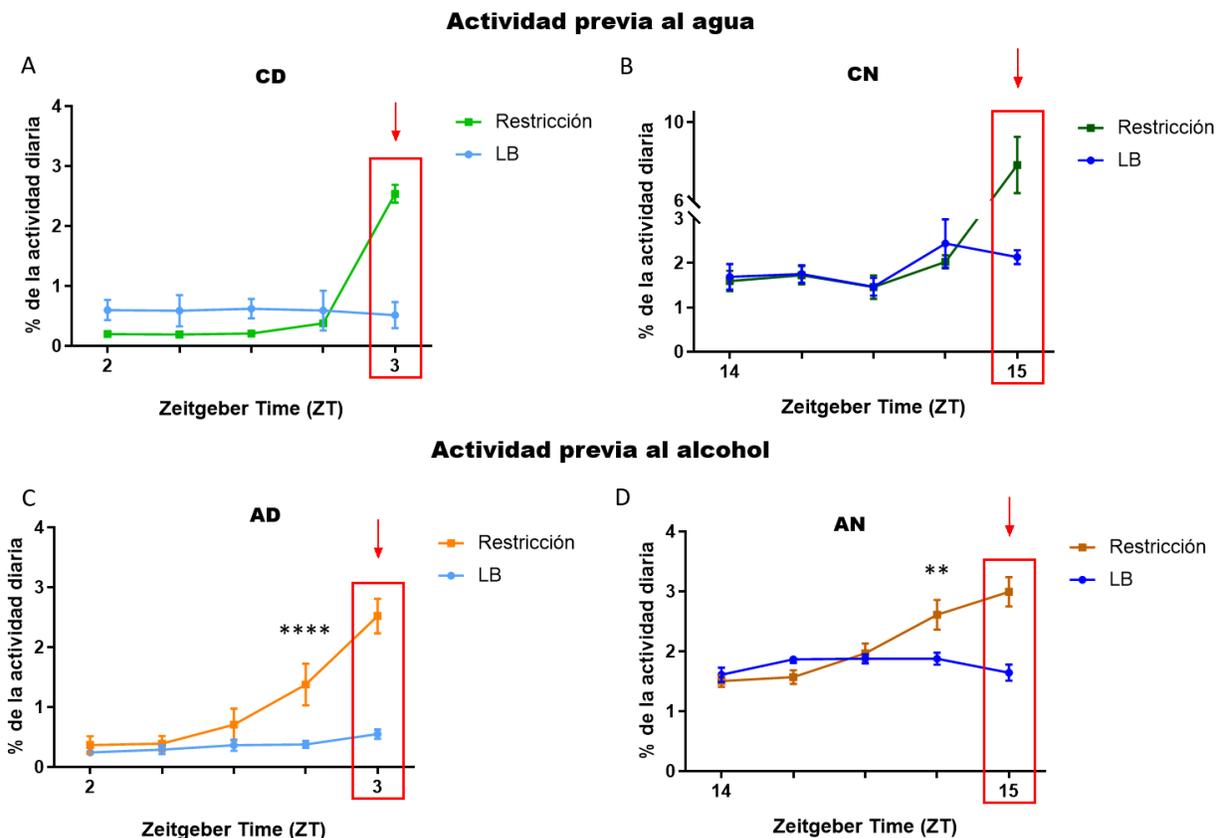


Figura 8. Actividad de anticipación al acceso al alcohol o a la botella adicional de agua. Promedio de actividad de ZT2-ZT3 (A y C) o ZT14-ZT15 (B y D) en la línea base (LB) y en la última semana de la fase de restricción de todos los grupos (CD= Control Día [n=7]; CN= Control Noche [n=7]; AD= Alcohol Día [n=17]; AN= Alcohol Noche [n=18]). Se muestran los puntos temporales en periodos de 15 minutos, de una hora previa al horario de acceso a la botella adicional de agua (A y B) o alcohol (C y D). Las flechas y el rectángulo rojo representan el artefacto asociado al momento en que se colocaban las botellas en la tapa de la jaula. Los asteriscos (\*) representan diferencias significativas con la línea base (\*\*=P<.01, \*\*\*\*=P<.0001). *Zeitgeber Time*: horas a partir del encendido de las luces.

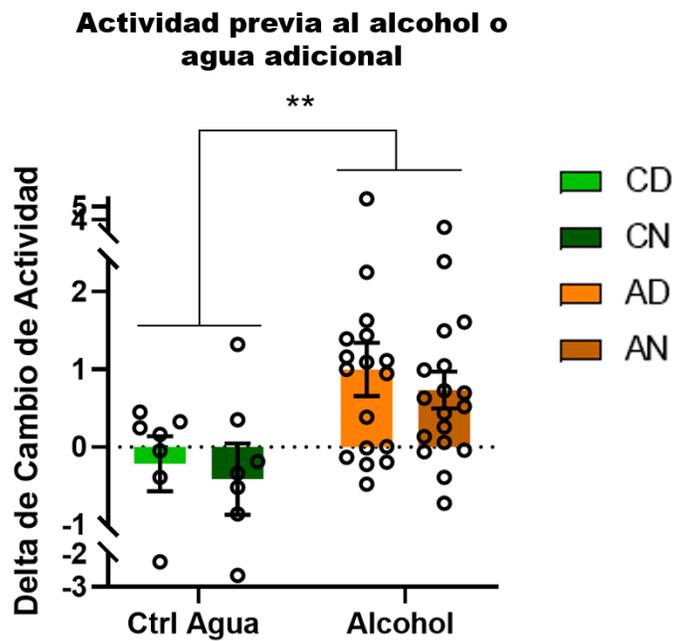


Figura 9. Comparación de la actividad de anticipación al acceso al alcohol o a la botella adicional de agua. Delta de cambio de actividad en ZT2.75 (CD y AD) o ZT14.75 (CN y AN) entre la línea base y la última semana de la fase de restricción. Los asteriscos (\*) representan diferencias significativas entre los grupos Ctrl Agua y los grupos Alcohol (\*\*=P<.01). Los círculos (o) representan los valores individuales de los sujetos. CD= Control Día [n=7]; CN= Control Noche [n=7]; AD= Alcohol Día [n=17]; AN= Alcohol Noche [n=18].

## Temperatura Corporal

### *Patrón diario de temperatura corporal*

Tanto en la línea base como en la fase experimental, los grupos CD (Fig 10 A y B) y CN (Fig 10 C y D) mostraron un patrón diario de temperatura corporal sincronizado a su ciclo luz-oscuridad, con temperaturas bajas durante el día (ZT0-12) y altas durante la noche (ZT12-0). El grupo CD tuvo en la línea base una temperatura promedio de 37.37°C (DE=0.084) durante el día y de 38.10°C (DE=0.086) durante la noche. En la fase de restricción, no presentó cambios significativos, promediando 37.38°C (DE=0.122) [t(7)=0.37, P>.05] en el día y 38.14°C (DE=0.072) [t(7)=1.60, P>.05] por la noche. De manera similar, el grupo CN tuvo temperaturas promedio de 37.3°C (DE=0.216) durante el día y de 37.92°C (DE=0.172) por la noche en la línea base, y estas también se mantuvieron similares en la fase de restricción, pasando a 37.18°C (DE=0.216) [t(7)=2.16, P>.05] en el día y a 37.99°C (DE=0.178) [t(7)=1.44, P>.05] en la noche (Ver Fig 12A).

El ANOVA de dos vías no encontró diferencias en la condición entre la línea base y la fase de restricción para el grupo CD [F (1, 7) = 1.21, P>.05], ni para el grupo CN [F (1, 7) = 0.32, P>.05] pero sí en el cambio de temperatura a través del tiempo (día-noche) [F (47, 329) = 56.79, P<.001; y F (47, 329) = 29.98, P<.001] (Fig 10 B y D). A partir de la inducción y hasta el final de la fase de restricción, se observó un breve aumento en temperatura, asociado a la llegada del experimentador para colocar la botella adicional de agua. Estos incrementos se pueden visualizar como cambios de color en los mapas de calor (Fig 10 A y C) y como picos de temperatura corporal diaria en los perfiles de temperatura (Fig 10 B y D)

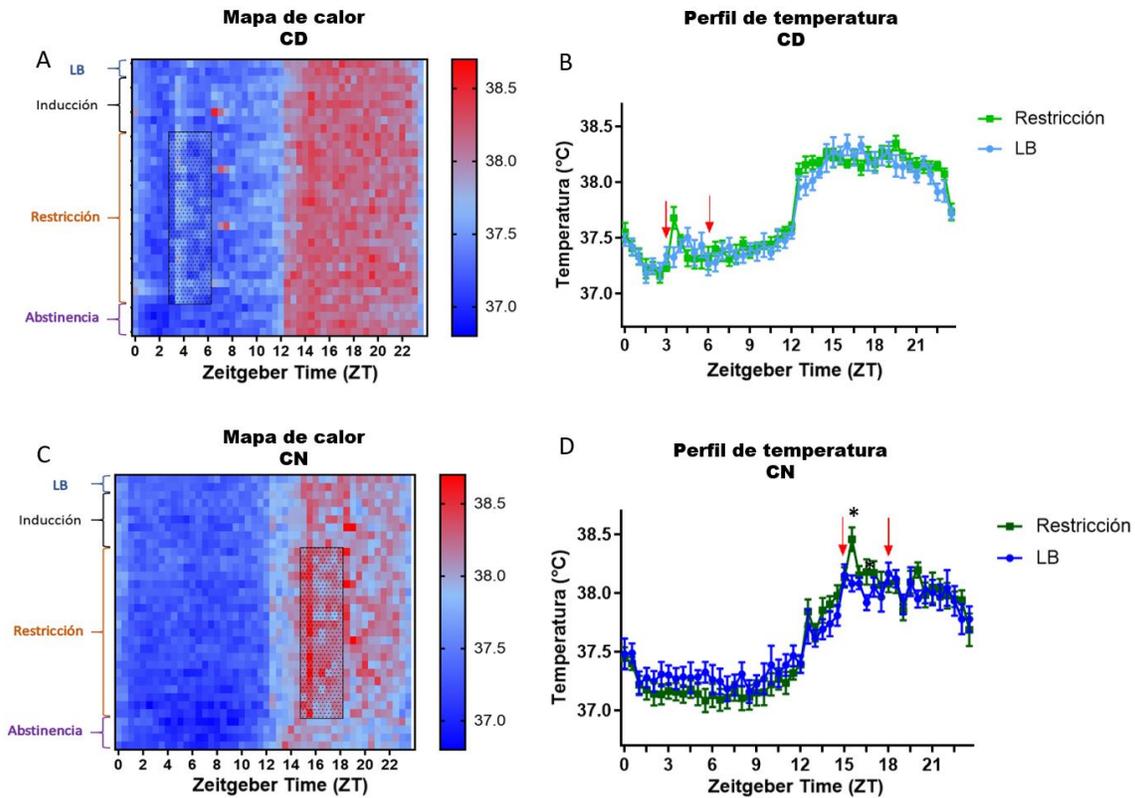


Figura 10. Temperatura corporal general de los grupos Control. (A y C) Mapas de calor de temperatura promedio de los grupos CD (Control Día [n=8]) y CN (Control Noche [n=8]). Los rectángulos representan el horario de acceso al agua sham en la fase de restricción. (B y D) Promedio de temperatura corporal en línea base (azul) y en la última semana de la fase de restricción (verde) de los grupos CD y CN. Las flechas representan el inicio y final del horario de acceso a la botella adicional de agua. Los asteriscos (\*) representan diferencias significativas ( $P < .05$ ). *Zeitgeber Time*: horas a partir del encendido de las luces.

Los grupos AD (Fig 11 A y B) y AN (Fig 11 C y D) mostraron un patrón diario de temperatura corporal sincronizado a su ciclo luz oscuridad durante la línea base, y un patrón similar pero con una disminución general de temperatura en las fases experimentales. Durante la línea base el grupo AD tuvo una temperatura promedio de  $37.45^{\circ}\text{C}$  ( $\text{DE}=0.176$ ) durante el día y de  $38.08^{\circ}\text{C}$  ( $\text{DE}=0.171$ ) por la noche. En la fase de restricción, se presentó una reducción solamente en el día, bajando a una temperatura promedio de  $37.34^{\circ}\text{C}$  ( $\text{DE}=0,127$ ) [ $t(18)=2.61$ ,  $P < .05$ ], mientras que en la noche se mantuvo en  $38.08^{\circ}\text{C}$  ( $\text{DE}=0,153$ ) [ $t(18)=0.64$ ,  $P > .05$ ]. Por su parte, el grupo AN mostró en la línea base una temperatura promedio de  $37.41^{\circ}\text{C}$  ( $\text{DE}=0.105$ ) en el día y de  $38.07^{\circ}\text{C}$  ( $\text{DE}=0.17$ ) en la noche. En la fase de restricción la temperatura promedio disminuyó

significativamente a 37.13°C (DE=0.120) durante el día [ $t(13)=7.23$ ,  $P<.001$ ] y a 37.93°C (DE=0.162) durante la noche [ $t(13)=3.452$ ,  $P<.01$ ] (Fig 12B).

Al igual que en los grupos control, se presentaron, a partir de la inducción, incrementos en la temperatura al inicio, y al final asociado con el acceso a la botella de alcohol, y hasta 30 minutos después. Esto se puede observar en los cambios de color en los mapas de calor (Fig 11 A y C) y como picos de temperatura corporal diaria en los perfiles de temperatura (Fig 11 B y D).

Para el grupo AD, el ANOVA de dos vías reveló que no hay diferencias entre la línea base y la fase de restricción [ $F(1, 18) = 4.33$ ,  $P>.05$ ], pero sí a lo largo del tiempo (día-noche) [ $F(47, 846) = 132.9$ ,  $P<.001$ ] y una interacción entre ambos [ $F(47, 846) = 2.838$ ,  $P<.001$ ]. Las comparaciones post hoc mostraron diferencias significativas en múltiples puntos de la fase de descanso: ZTs 1.5, 4.5, 5 y 5.5, resultado de una disminución en la temperatura corporal general (Fig 11B).

Para el grupo AN, se encontraron diferencias significativas entre la línea base y la fase de restricción [ $F(1, 13) = 35.41$ ,  $P<.001$ ], en el cambio de temperatura a través del tiempo [ $F(47, 611) = 114.0$ ,  $P<.001$ ], y para la interacción entre ambos [ $F(47, 611) = 3.894$ ,  $P<.001$ ]. Las comparaciones post hoc mostraron diferencias significativas múltiples puntos a través de todo el ciclo, resultado de una disminución en la temperatura corporal general; específicamente se encontraron diferencias de ZT 1.5 a ZT 12.5, en ZT 16, y en los ZTs 19, 19.5 y 20 (Fig 11D).

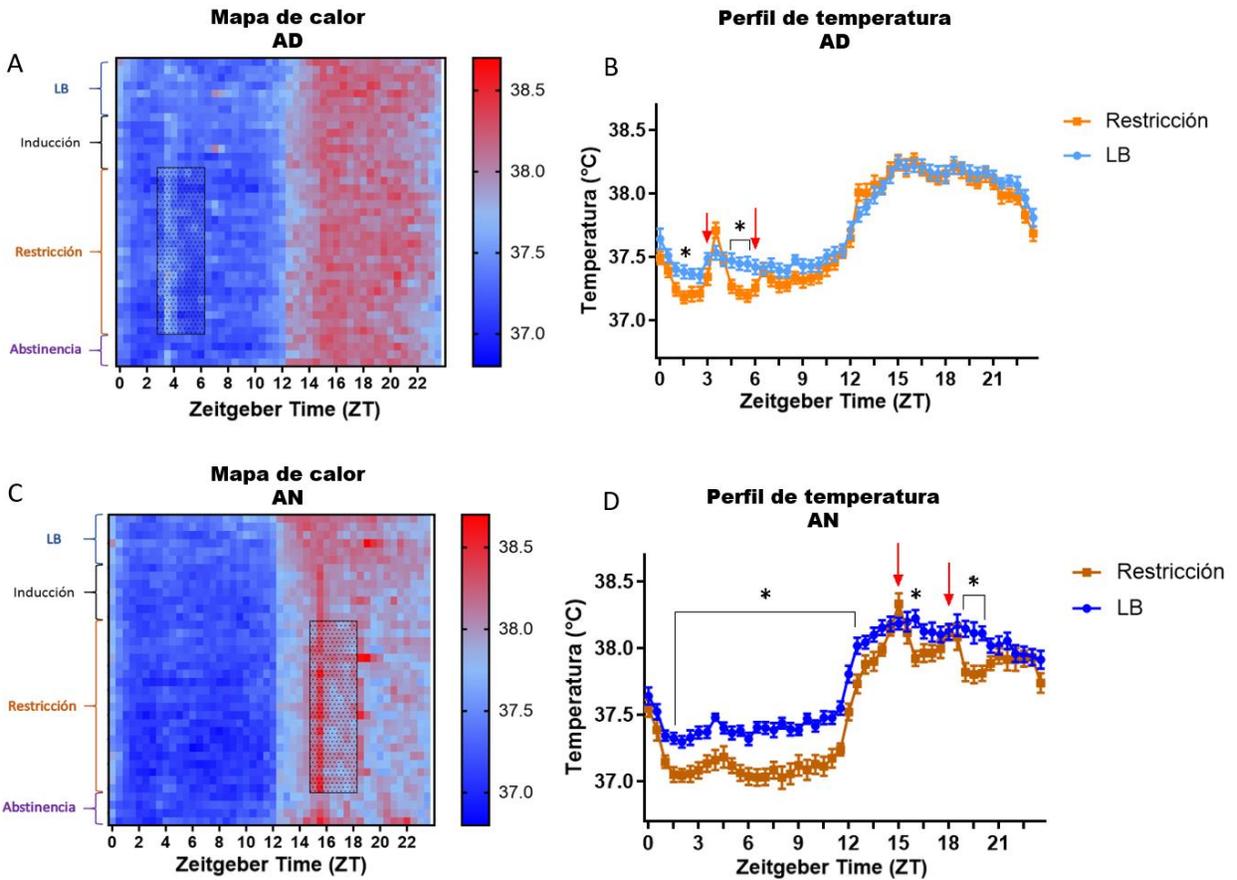


Figura 11. Temperatura corporal general de los grupos Experimentales. (A y C) Mapas de calor de temperatura promedio de los grupos AD (Alcohol Día [n=19]) y AN (Alcohol Noche [n=14]). Los rectángulos representan el horario de acceso al alcohol en la fase de restricción. (B y D) Promedio de temperatura corporal en línea base (azul) y en la última semana de la fase de restricción (naranja) de los grupos CD y CN. Las flechas representan el inicio y final del horario de acceso al alcohol. Los asteriscos (\*) representan diferencias significativas ( $P < .05$ ). *Zeitgeber Time*: horas a partir del encendido de las luces.

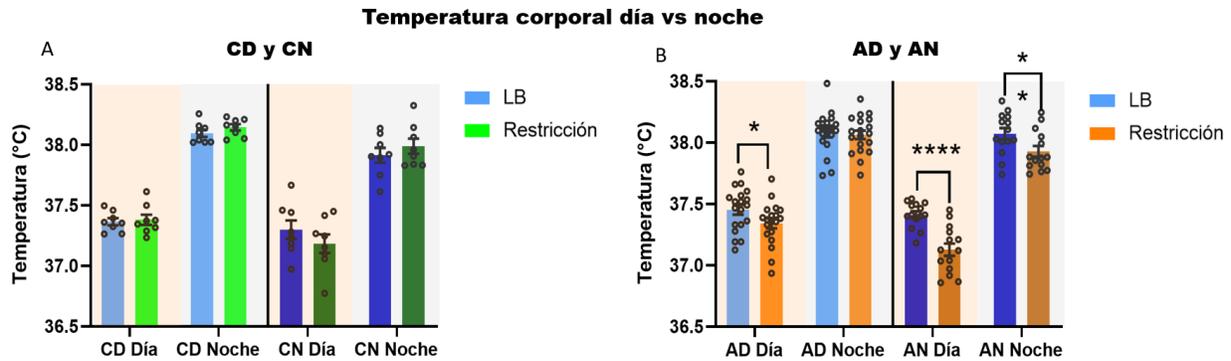


Figura 12. Temperatura corporal día vs noche. Promedio de temperatura corporal diurna y nocturna durante la línea base (LB) y la fase de restricción de los grupos control (A) (CD= Control Día [n=8]; CN= Control Noche [n=8]) y experimentales (B) (AD= Alcohol Día [n=19]; AN= Alcohol Noche [n=14]). Los asteriscos (\*) representan diferencias significativas entre la LB y la fase de restricción (\*=P<.05, \*\*=P<.01, \*\*\*\*=P<.0001). Los círculos (o) representan los valores individuales de los sujetos.

### *Respuesta de anticipación en la temperatura corporal*

El análisis de la hora previa al horario de acceso a la botella adicional de agua (grupos CD y CN) o a la botella de alcohol (grupos AD y AN) demostró que no hay incrementos significativos en la temperatura hasta después del horario de acceso, excepto en el grupo AN, que mostró un incremento que inicia media hora antes del horario de acceso, y se vuelve significativo para el momento en que recibe el alcohol (ZT 15).

Para el grupo CD, el ANOVA de dos vías no encontró diferencias en la condición entre la línea base y la fase de restricción [ $F(1, 7) = 0.23, P > .05$ ], ni en el cambio de temperatura a través del tiempo [ $F(2, 14) = 1.57, P > .05$ ], ni encontró una interacción entre ellos [ $F(2, 14) = 0.2, P > .05$ ]. (Fig 13A)

En el grupo CN tampoco se encontraron diferencias entre la línea base y la fase de restricción [ $F(1, 7) = 1.22, P > .05$ ], aunque sí en el cambio a través del tiempo [ $F(2, 14) = 34.32, P < .001$ ], y no se encontró una interacción [ $F(2, 14) = 2.36, P > .05$ ]. (Fig 13B)

De manera similar, para el grupo AD, no se encontraron diferencias en la condición entre la línea base y la fase de restricción [ $F(1, 18) = 0.1, P > .05$ ], pero sí en el cambio de

temperatura a través del tiempo [F (2, 36) = 12.81, P<.001], y no se encontró una interacción entre ambos [F (2, 36) = 0.05, P>.05]. (Fig 13C)

En el grupo AN, se encontraron diferencias tanto en condición entre la línea base y la fase de restricción [F (1, 13) = 12.56, P<.01], como en el cambio de temperatura a través del tiempo [F (2, 26) = 15.03, P<.001] y una interacción entre ambos [F (2, 26) = 9.415, P<.001]. La figura 13D muestra el incremento de temperatura que inicia en ZT 14.5, e progresa en ZT 15, que corresponde al horario de llegada de la botella de alcohol. Las comparaciones post hoc mostraron diferencias significativas en ZT 15.

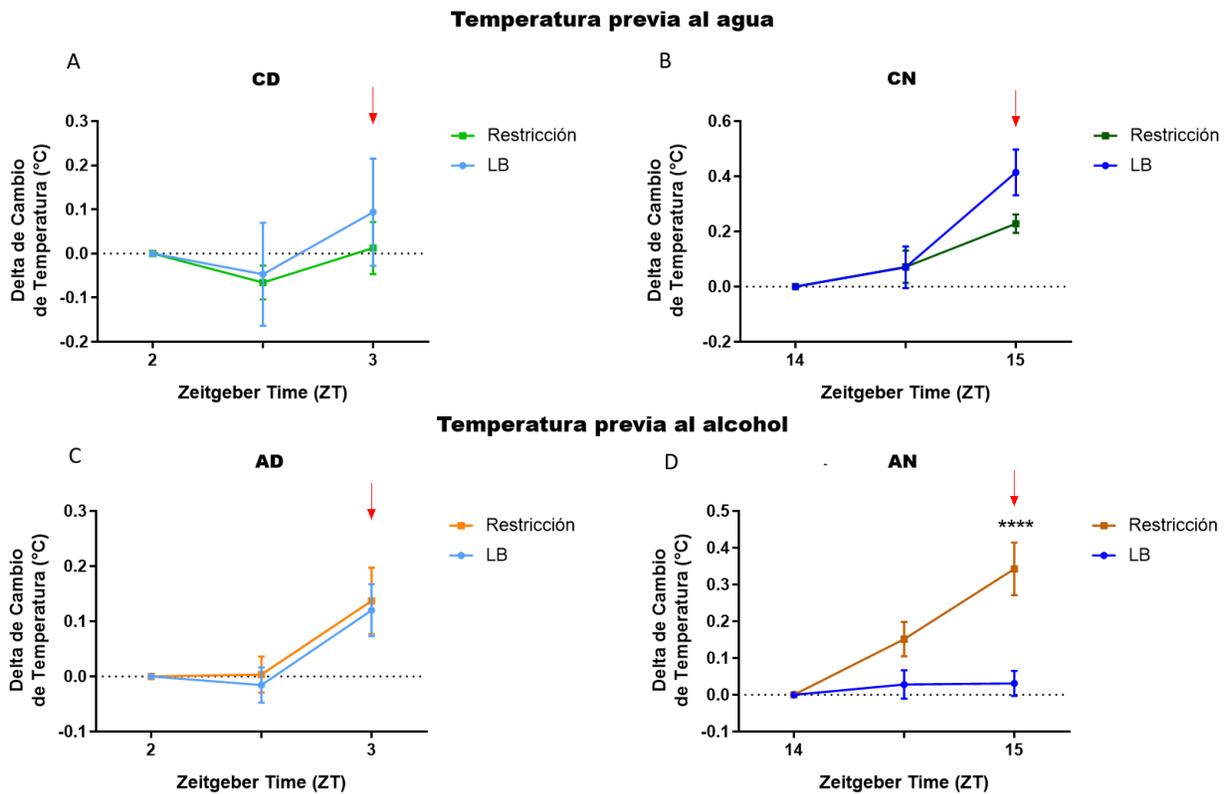


Figura 13. Temperatura en anticipación al acceso al alcohol o a la botella adicional de agua. Promedio de temperatura corporal en línea base y en la última semana de la fase de restricción de todos los grupos (CD= Control Día [n=8]; CN= Control Noche [n=8]; AD= Alcohol Día [n=19]; AN= Alcohol Noche [n=14]), en puntos temporales de periodos de 30 minutos de ZT2-ZT3 (A y C) o ZT14-ZT15 (B y D). El 0.0 (y la línea punteada) representa el valor de temperatura en el primer punto temporal (ZT2 o ZT14), los demás valores son los deltas de cambio calculados a partir de ese punto. Las flechas rojas representan el inicio de horario de acceso. Los asteriscos

(\*) representan diferencias significativas con respecto a la línea base (\*\*\*\*=P<.0001). *Zeitgeber Time*: horas a partir del encendido de las luces.

## Respuestas de actividad y temperatura en abstinencia

### Actividad general

El análisis del primer día de la fase de abstinencia, en donde las ratas permanecieron sin manipulaciones de ningún tipo, muestra que todos los grupos permanecen en un patrón circadiano similar al de la línea base.

En los grupos CD y CN (Fig 14 A y B), no se observa ningún cambio en el horario en el que previamente llegaba el experimentador a colocar la botella adicional de agua. Por el contrario, en los grupos AD y AN (Fig 14 C y D) se observa un aumento de actividad alrededor del horario en el que los sujetos solían recibir la botella de ALC10%.

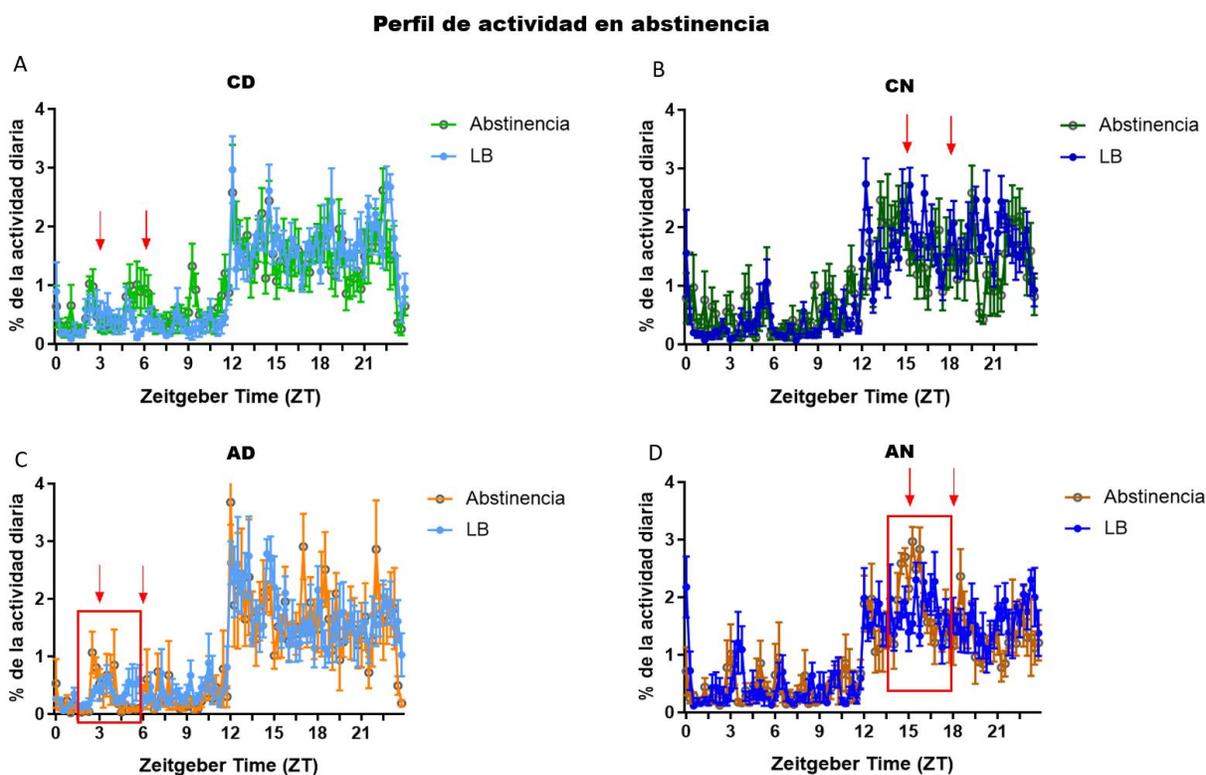


Figura 14. Actividad en abstinencia. Promedio de actividad en el primer día de abstinencia de todos los grupos (CD= Control Día [n=7]; CN= Control Noche [n=7]; AD= Alcohol Día [n=4]; AN= Alcohol Noche [n=4]). Las flechas representan el inicio y final del horario de acceso. Los rectángulos rojos señalan los aumentos de actividad alrededor del horario de acceso (C y D). *Zeitgeber Time*: horas a partir del encendido de las luces.

Para analizar este aumento, se cuantificó la suma de cuentas de actividad desde una hora antes hasta una hora después del horario de acceso (ZT2 a ZT4 o ZT14 a ZT16) y se comparó entre la línea base y el primer día de la fase de abstinencia con una prueba T de Student para muestras relacionadas, excepto para el grupo CN, en donde se usó la prueba no paramétrica de Wilcoxon porque no se encontró normalidad en los datos (Prueba de Shapiro-Wilk:  $W = 0.667$ ,  $P < .01$ ). Los resultados mostraron que no hay diferencias entre la línea base y la abstinencia para el grupo CD [ $t(6) = 0.35$ ,  $P > .05$ ], el grupo CN [ $W(7) = -14$ ,  $P > .05$ ], ni el grupo AD [ $t(3) = 1.57$ ,  $P > .05$ ], pero sí para el grupo AN [ $t(3) = 4.209$ ,  $P < .05$ ]. (Fig 15)

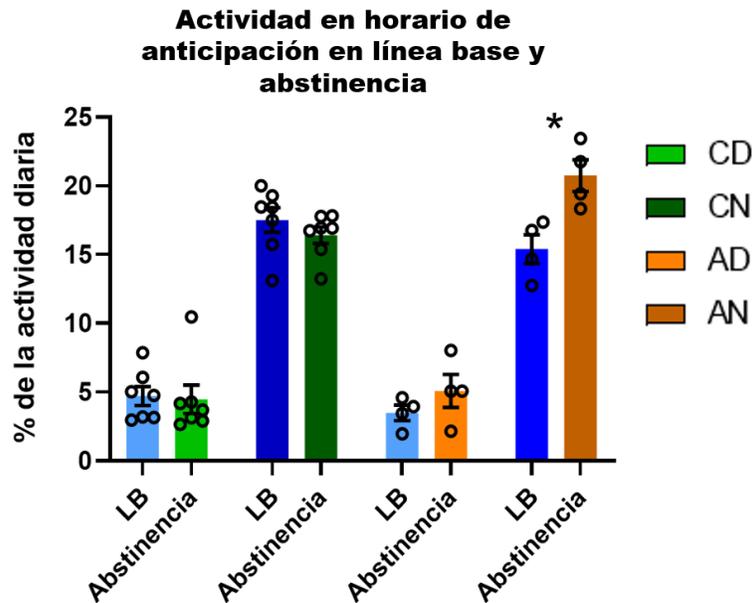


Figura 15. Actividad alrededor del horario de acceso en abstinencia. Suma de cuentas de actividad, normalizadas al porcentaje de su actividad diaria, de una hora antes a una hora después del horario de acceso a agua o alcohol (CD y AD: ZT2 a ZT4; CN y AN: ZT14 a ZT16), en la línea base (LB) y en el primer día de la fase de abstinencia. Los asteriscos (\*) representan diferencias significativas con respecto a la línea base (\*= $P < .05$ ). Los círculos (o) representan

los valores individuales de los sujetos. CD= Control Día [n=7]; CN= Control Noche [n=7]; AD= Alcohol Día [n=4]; AN= Alcohol Noche [n=4].

### Temperatura Corporal

Durante el primer día de esta fase, todos los grupos permanecieron en un patrón circadiano similar al de la línea base. En los grupos CD y CN (Fig 16 A y B), no se observan grandes diferencias entre la línea base y la abstinencia. En los grupos AD y AN se observa la persistencia de los cambios vistos en la fase de restricción (ver Fig 11); es decir, el grupo AD muestra una disminución de temperatura alrededor del horario de acceso, seguido de un aumento de temperatura posterior al mismo (Fig 16C), y el grupo AN muestra la hipotermia en múltiples puntos, y un incremento gradual que inicia antes del horario de acceso (Fig 16D).

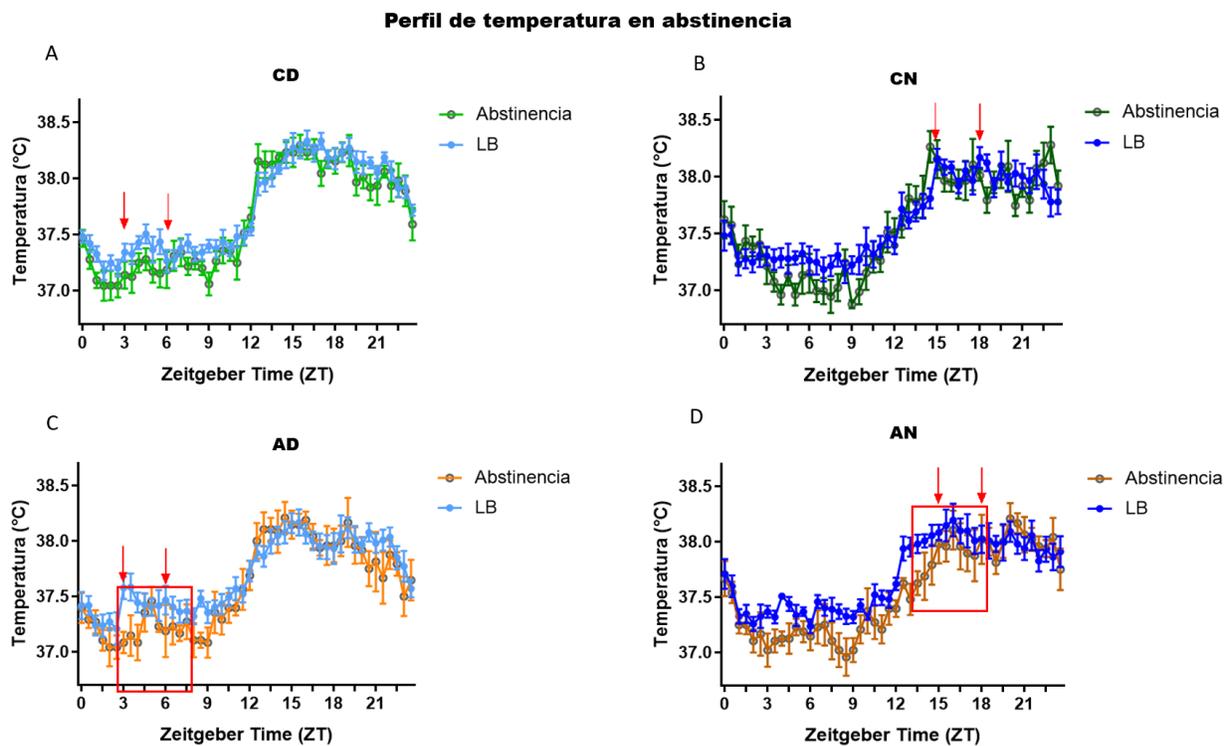


Figura 16. Temperatura en abstinencia. Promedio de temperatura corporal en el primer día de abstinencia de todos los grupos (CD= Control Día [n=8]; CN= Control Noche [n=8]; AD= Alcohol Día [n=6]; AN= Alcohol Noche [n=6]). Las flechas representan el inicio y final del horario de

acceso. Los rectángulos rojos señalan los aumentos de temperatura dentro o alrededor del horario de acceso (C y D). *Zeitgeber Time*: horas a partir del encendido de las luces.

## Consumo de alcohol o agua adicional

### *Consumo general*

Se comparó el promedio de consumo de agua adicional (CD y CN) o de alcohol (AD y AN) durante la tercera semana de la fase de restricción. El grupo CD tuvo un consumo promedio de 0.656 mL (N=8, DE=0.297) y el grupo CN de 3.107 mL (N=7, DE=3.341). El consumo promedio del grupo AD fue de 3.664 mL (N=22, DE=1.779) y el del grupo AN de 9.112 mL (N=23, DE=3.042).

El ANOVA de dos vías para grupos independientes encontró diferencias en la variable día vs noche [F (1, 56) = 29.01, P<.001] y en la variable agua adicional vs alcohol [F (1, 56) = 37,76, P<.001], así como una interacción entre ambas [F (1, 56) = 4.177, P<.05]. Las pruebas post-hoc se realizaron para comparar entre el consumo de alcohol y agua adicional, y se encontraron diferencias entre CD y AD y entre CN y AN (Fig 17A).

La preferencia de consumo de alcohol o agua de la botella adicional sobre agua de la botella *ad libitum* también se comparó en la semana 3. El ANOVA de dos vías no encontró diferencias en la variable día vs noche [F (1, 56) = 0.04, P>.05] pero sí en la variable agua adicional vs alcohol [F (1, 56) = 61.7, P<.001], y no encontró una interacción [F (1, 56) = 0.07, P>.05]. Las pruebas post-hoc mostraron diferencias entre CD y AD y entre CN y AN (Fig 17B).

Las pruebas T para muestras relacionadas mostraron en todos los grupos diferencias significativas entre el consumo de alcohol o agua de la botella adicional y el de agua de la botella *ad libitum*, pero de diferentes maneras. En los grupos CD y CN, el consumo de agua adicional (M=0.656, DE=0.297; M=3.107, DE=3.341) fue inferior al de agua *ad libitum* (M=2.271, DE=0.333; M=9.821, DE=1.542) [t(7)=10.52, P<.001; t(6)= 3.646, P<.05]. Mientras que en los grupos AD y AN, el consumo de ALC10% (M=3.664,

DE=1.779; M=9.112, DE=3.042) fue superior al de agua *ad libitum* (M=1.939, DE=0.781; M=5.017, DE=3.097) [ $t(21)=4.208$ ,  $P<.001$ ;  $t(22)= 3.494$ ,  $P<.01$ ].

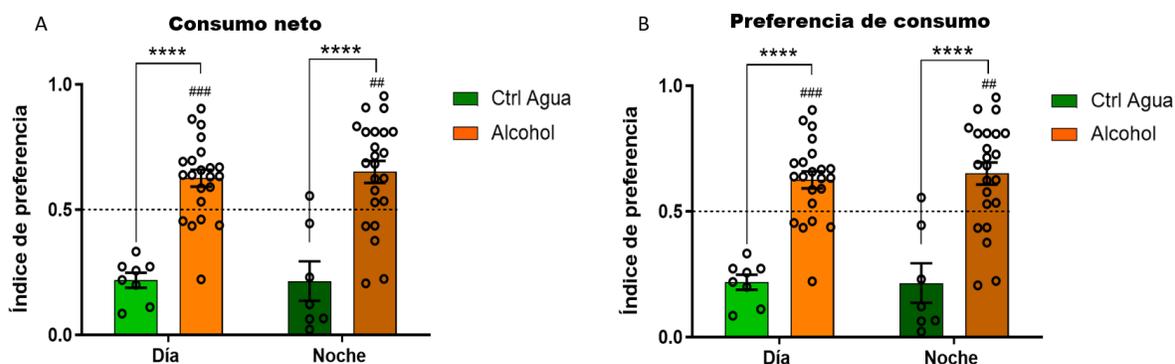


Figura 17. Consumo de alcohol o agua adicional. (A) Consumo neto promedio de alcohol o agua de la botella adicional en la semana 3. (B) Índice de preferencia de consumo de alcohol o agua de la botella adicional sobre agua de la botella *ad libitum*. La línea punteada representa una preferencia nula (0.5). Los asteriscos (\*) representan diferencias significativas entre los grupos Alcohol y Ctrl Agua (\*\*= $P<.01$ , \*\*\*= $P<.001$ , \*\*\*\*= $P<.0001$ ). Los gatos (#) representan una preferencia significativa del consumo de alcohol sobre el de agua *ad libitum* (##= $P<.01$ , ###= $P<.001$ ). Los círculos (o) representan los valores individuales de los sujetos. La N para esta medición fue la siguiente: Ctrl Día=8, Ctrl Noche=7, Alcohol Día=22, Alcohol Noche=23

### Escalamiento

En el análisis de escalamiento, los grupos CD y CN no demostraron diferencias importantes en su consumo de agua de la botella adicional a través de las semanas.

El grupo CD tuvo un consumo promedio de agua adicional de 1.25mL (DE=0.475) en la semana 1, que disminuyó a 0.9mL (DE=0.894) en la semana 2 y 0.656mL (DE=0.297) en la semana 3. No se encontró una pendiente de cambio significativa ( $Y=-0.297$ ,  $P>0.05$ ). El ANOVA de una vía para medidas repetidas no encontró diferencias entre las semanas [ $F(2, 14) = 3.03$ ,  $P>.05$ ]. (Fig 18A)

El grupo CN consumió en promedio 2.386mL (DE=1.444) en la semana 1, 2.029mL (DE=1.606) en la semana 2 y 3.107mL (DE=3.341) en la semana 3. Tampoco se encontró

una pendiente de cambio significativa ( $Y=0.361$ ,  $P>.05$ ), y el ANOVA tampoco encontró diferencias entre las semanas [ $F(2, 12) = 0.44$ ,  $P>.05$ ]. (Fig 18B)

En cambio, los grupos AD y AN sí mostraron un escalamiento en la cantidad de consumo de alcohol que presentaban cada semana.

El grupo AD tuvo un consumo promedio de ALC10% de 2.407 (DE=1.638) en la semana 1, este aumentó a 3.095mL (DE=1.717) en la semana 2 y a 3.402mL (DE=1.749) en la semana 3. La pendiente de 0.497 ( $\pm 0.261$ ) unidades por semana no fue significativo ( $P>.05$ ). El ANOVA encontró que estas cambios fueron significativos [ $F(2, 40) = 4.127$ ,  $P<.05$ ], y las comparaciones post-hoc de Sidak revelaron una diferencia entre la semana 1 y la semana 3 (Fig 18C)

En el grupo AN, el consumo pasó de 7.039 (DE=3.773) en la semana 1, a 8.709mL (DE=3.345) en la semana 2 y a 9.112mL (DE=3.042) en la semana 3. Se encontró una pendiente de incremento de 1.037 ( $\pm 0.499$ ) unidades por semana ( $P<.05$ ). El ANOVA encontró significativas estas diferencias [ $F(2, 44) = 7.844$ ,  $P<.01$ ], y las comparaciones post-hoc encontraron cambios entre la semana 1 y la semana 2, y entre la semana 1 y la semana 3 (Fig 18C).

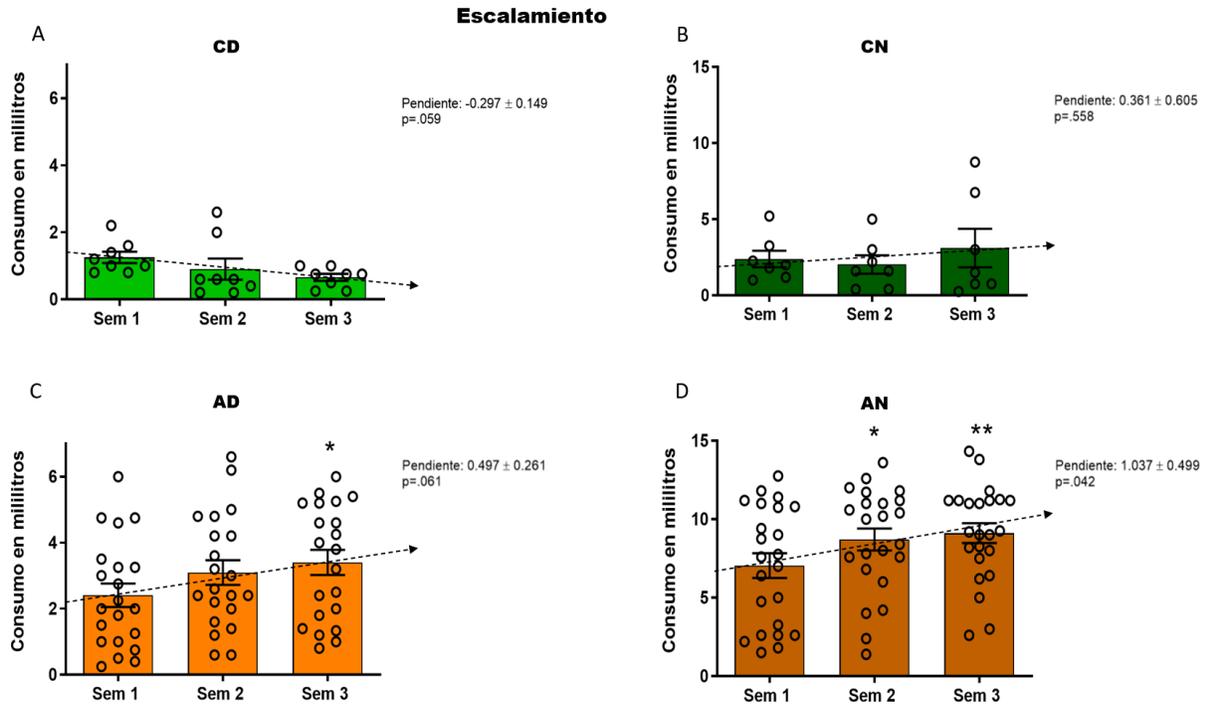


Figura 18. Escalamiento en el consumo. Consumo en mililitros de agua de la botella adicional (A y B) o de ALC10% (C y D) a través de las semanas en todos los grupos. La flecha punteada representa el valor de la pendiente. Los asteriscos (\*) representan diferencias significativas con respecto a la semana 1 (\*= $P < .05$ , \*\*= $P < .01$ ). Los círculos (o) representan los valores individuales de los sujetos. CD= Control Día [n=8]; CN= Control Noche [n=7]; AD= Alcohol Día [n=21]; AN= Alcohol Noche [n=23].

Adicionalmente, se cuantificó en todos los grupos el porcentaje de sujetos que incrementaron su consumo de la primera a tercera semana de la fase de restricción. Ningún sujeto aumentó su consumo en el grupo CD, y sólo 3 de 7 sujetos del grupo CN lo aumentaron, mientras que 14 de 21 sujetos de AD, y 17 de 23 sujetos de AN lo hicieron. El cuadro 1 presenta un resumen de los resultados.

Escalamiento	N	Sujetos que incrementaron	Porcentaje
CD	8	0	0
CN	7	3	42.85
AD	21	14	66.66
AN	23	17	73.91

Cuadro 1. Incidencia de escalamiento. Número y porcentaje de sujetos que incrementaron su consumo de alcohol o agua de la botella adicional, de la semana 1 a la semana 3. CD= Control Día, CN= Control Noche, AD= Alcohol Día, AN= Alcohol Noche.

### Prueba de atracón (Binge)

En la prueba de binge se comparó primero el consumo neto de agua de la botella adicional (CD y CN) o alcohol (AD y AN) durante la prueba. El ANOVA de dos vías para grupos independientes no encontró diferencias en la variable día vs noche [ $F(1, 46) = 3.1, P > .05$ ] pero sí en la variable agua adicional vs alcohol [ $F(1, 46) = 35.1, P < .001$ ], y no encontró una interacción [ $F(1, 46) = 1.4, P > .05$ ]. Las pruebas post-hoc compararon los grupos de una misma fase de luz, pero diferente sustancia consumida, y revelaron diferencias entre CD y AD y entre CN y AN (Fig 19A).

El consumo durante la prueba se comparó con el consumo durante la primera hora del horario de acceso restringido en un día de la tercera semana de la fase de restricción, dando como resultado un índice de cambio en el consumo entre ambas etapas (Fig 19B). El ANOVA de dos vías no encontró diferencias entre el día y la noche [ $F(1, 46) = 1.06, P > .05$ ] pero sí entre el consumo de agua adicional y alcohol [ $F(1, 46) = 5.125, P < .05$ ], y no encontró una interacción [ $F(1, 46) = 1.26, P > .05$ ]. Las pruebas post-hoc mostraron diferencias entre CD y AD.

Las pruebas T para muestras relacionadas se utilizaron para explorar si el consumo en binge era superior al de una hora en la fase de restricción, y no se encontró un incremento significativo en ninguno de los grupos. En el grupo CD, el consumo en binge ( $M=0.25, DE=0.463$ ) fue menor consumo en restricción ( $M=0.567, DE=0.296$ ) pero no significativamente [ $t(7) = 1.92, P > .05$ ]. En el grupo AD, el consumo en la prueba ( $M=2.889, DE=1.023$ ) fue similar al de restricción ( $M=3.315, DE=1.496$ ) [ $t(17) = 0.94,$

P>.05]. En el grupo CN, el consumo en binge (M=0.571, DE=0.534) fue menor al de restricción (M=2.766, DE=2.976) pero no significativamente [t(6) = 2.15, P>.05]. En el grupo AN, el consumo durante la prueba (M=4.529, DE=2.831) fue significativamente menor al consumo en la fase de restricción (M=7.271, DE=2.171) [t(16)=3.884, P<.01]. El consumo menor o similar durante la prueba de binge es evidente como índices de cambio inferiores o similares a 1.0 en la Fig 19B.

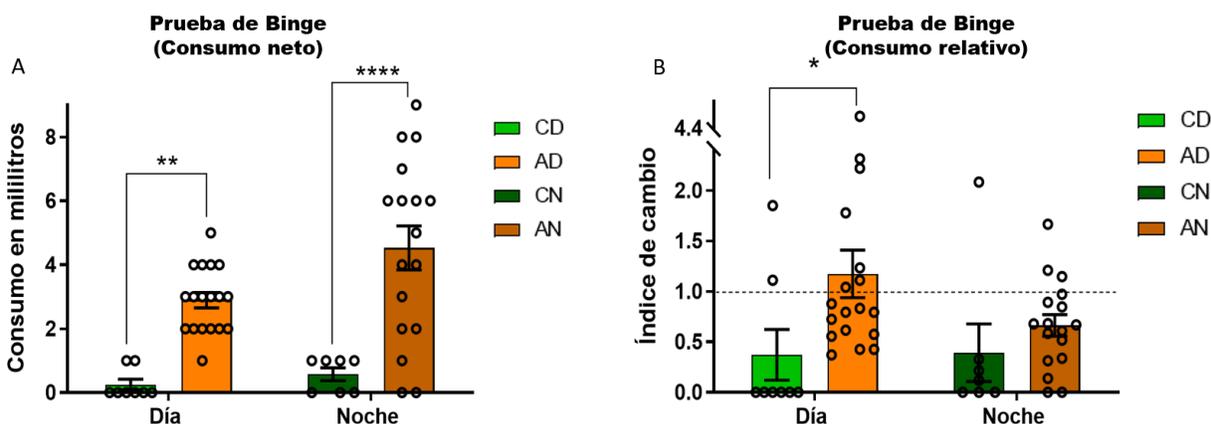


Figura 19. Consumo durante la prueba de Binge. (A) Consumo neto promedio de alcohol o agua de la botella adicional durante la prueba de Binge. (B) Índice de cambio de consumo de alcohol o agua de la botella adicional entre la prueba de Binge y la primera hora del día 5 de la tercera semana de la fase de restricción. La línea punteada representa un cambio nulo (1.0). Los asteriscos (\*) representan diferencias significativas entre los grupos Alcohol y Ctrl Agua (\*=P<.05, \*\*=P<.01, \*\*\*\*=P<.0001). Ningún grupo tuvo un incremento significativo en su consumo en la prueba de Binge. Los círculos (o) representan los valores individuales de los sujetos. CD= Control Día [n=8]; CN= Control Noche [n=8]; AD= Alcohol Día [n=18]; AN= Alcohol Noche [n=17].

## Pruebas de esfuerzo

### *Prueba de la caja luz-oscuridad*

En la prueba de la caja luz-oscuridad, el tiempo pasado en el compartimento de luz se comparó con el tiempo total de la prueba para generar un índice de preferencia (segundos en luz/300) que se comparó entre los grupos. El grupo CD tuvo un índice medio de 0.218 (DE=0.154) y el grupo CN de 0.259 (DE=0.128), mientras que el grupo

AD promedió un índice de 0.391 (DE=0.159) y el grupo AN de 0.316 (DE=0.152). El ANOVA de dos vías para grupos independientes no encontró diferencias entre el consumo en el día y en la noche [F (1, 25) = 0.09, P>.05] pero sí entre el consumo de agua adicional y el de alcohol [F (1, 25) = 4.39, P<.05], y no encontró una interacción entre ambos [F (1, 25) = 1.11, P>.05]. (Fig 20A)

El tiempo de interacción con el bebedero en el compartimento de luz se comparó entre grupos. El grupo CD tuvo un tiempo promedio de interacción de 3.739 segundos (DE=3.981) y el grupo CN de 6.391 segundos (DE=4.041), el grupo AD promedió 9.587 segundos (DE=5.938) y el grupo AN 4.3 segundos (DE=3.571). El ANOVA de dos vías no encontró diferencias entre el día y la noche [F (1, 25) = 0.63, P>.05] ni entre el consumo de agua adicional y el de alcohol [F (1, 25) = 1.28, P>.05], aunque encontró una interacción entre ambos [F (1, 25) = 5.723, P<.05]. Las comparaciones post hoc revelaron la diferencia entre el grupo CD y el grupo AD. (Fig 20B)

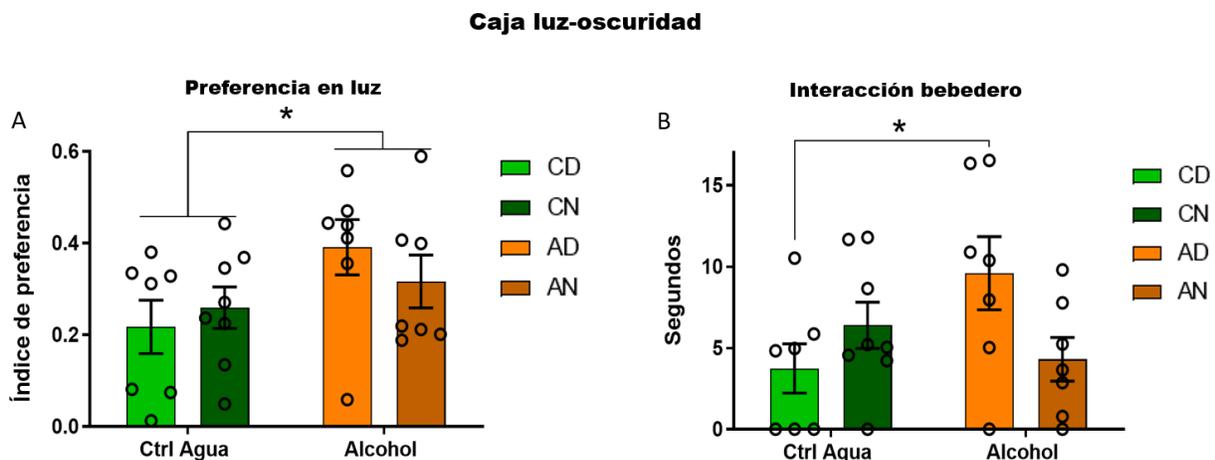


Figura 20. Prueba de la caja luz-oscuridad. (A) Índice de preferencia promedio del compartimento de luz sobre el compartimento de oscuridad. (B) Tiempo promedio en segundos de interacción con el bebedero durante la prueba. Los asteriscos (\*) representan diferencias significativas entre los grupos (P<.05). Los círculos (o) representan los valores individuales de los sujetos. CD= Control Día [n=7]; CN= Control Noche [n=8]; AD= Alcohol Día [n=7]; AN= Alcohol Noche [n=7].

## Prueba de la gota

Para la prueba de la gota, se analizó primero el tiempo promedio de contacto físico directo con la botella, el cual fue de 15.19 segundos (DE=6.472) para el grupo CD y de 10.99 segundos (DE=7.009) para el grupo CN, mientras que el grupo AD tuvo un tiempo promedio de 18.92 segundos (DE=12.14) y el grupo AN de 24.15 segundos (DE=3.933). El ANOVA de dos vías no encontró diferencias por el consumo en el día y en la noche [F (1, 27) = 0.03, P>.05] pero sí entre el consumo de agua adicional y el de alcohol [F (1, 27) = 8.436, P<.01], y no encontró una interacción entre ellos [F (1, 27) = 2.63, P>.05]. (Fig 21A)

Posteriormente se sumó el tiempo de olfateo directo, dando como resultado un tiempo de interacción total con el bebedero. El grupo CD tuvo un tiempo promedio de 5.436 segundos (DE=5.555) y el grupo CN de 2.008 segundos (DE=2.393), por su parte, el grupo AD promedió 8.763 segundos (DE=9.403) y el grupo AN 11.78 segundos (DE=5.245). El ANOVA de dos vías no encontró diferencias entre el día y en la noche [F (1, 27) = 0.01, P>.05] pero sí entre el consumo de agua adicional y el de alcohol [F (1, 27) = 8.599, P<.01], y no encontró una interacción entre ellos [F (1, 27) = 2.08, P>.05]. (Fig 21B)

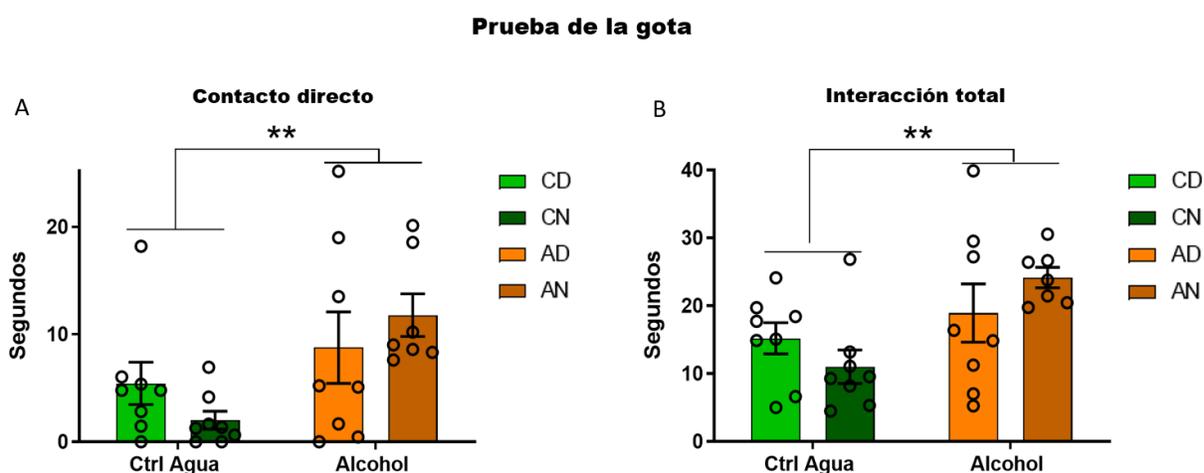


Figura 21. Prueba de la gota. (A) Tiempo promedio de contacto directo, con las patas o el hocico, con el bebedero durante la prueba (B) Tiempo promedio de contacto u olfateo directo del bebedero durante la prueba. Los asteriscos (\*) representan diferencias significativas entre los

grupos Ctrl Agua y los grupos Alcohol (\*\*=P<.01). Los círculos (o) representan los valores individuales de los sujetos. CD= Control Día [n=8]; CN= Control Noche [n=8]; AD= Alcohol Día [n=8]; AN= Alcohol Noche [n=7].

### Correlaciones anticipación - conducta tipo adictiva

Todas las medidas de conducta tipo adictiva se compararon con el coeficiente de anticipación en actividad, para buscar una relación entre los niveles de anticipación y los de adicción. Las correlaciones de Pearson mostraron tendencias altas en el grupo AN, y bajas en el grupo AD, pero no arrojaron asociaciones significativas en ninguna de las medidas, para ninguno de los grupos. (Fig 22)

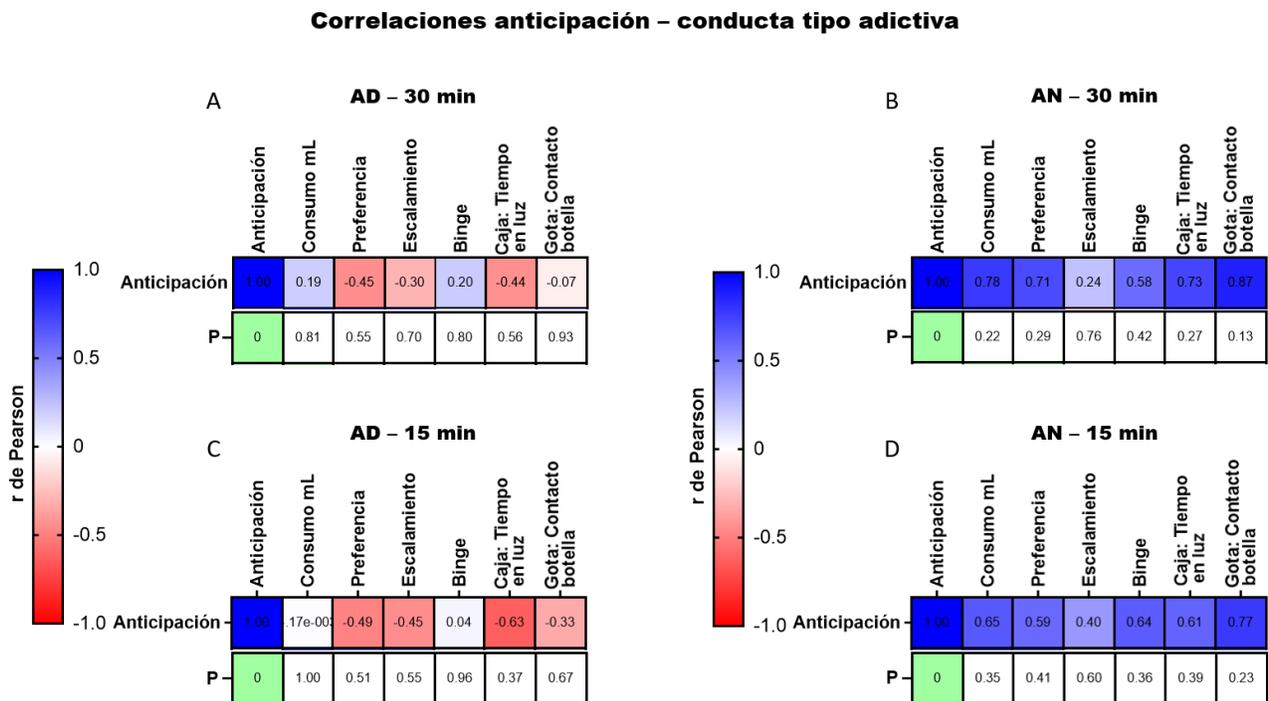


Figura 22. Correlaciones anticipación - conducta tipo adictiva. Correlaciones de Pearson entre el coeficiente de anticipación de actividad y las distintas medidas de conducta tipo adictiva, en los grupos Alcohol Día (AD, n=4) (A y C) y Alcohol Noche (AN, n=4) (C y D). Las filas superiores muestran el valor del coeficiente r, donde un color azul simboliza un coeficiente cercano a 1, y el color rojo uno cercano a -1. Las filas inferiores representan la P de cada correlación; ninguna correlación fue significativa 0.05, la P de 0 pertenece a la correlación de anticipación consigo misma.



## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos indican que el acceso restringido en un periodo circadiano y predecible, puede generar conductas de anticipación al horario de acceso al alcohol. También se comprobó que el acceso restringido estimula un incremento en el consumo del alcohol, y una serie de conductas similares a las que, en humanos, se consideran parte de un trastorno por consumo de sustancias. Ambos resultados se observaron independientemente de si el consumo del alcohol se daba en el día o en la noche.

### **El acceso restringido al alcohol genera anticipación circadiana**

#### *Actividad General*

Todos los grupos registraron patrones de actividad sincronizados a su ciclo luz oscuridad. La única diferencia discernible entre la línea base y la fase de restricción fue el incremento de actividad en el horario de acceso a la sustancia. Estos incrementos en actividad podrían ser suficientes para explicar cualquier cambio entre el porcentaje de actividad diurna y nocturna, aunque este porcentaje sólo se vio afectado significativamente en el grupo que recibía el alcohol de noche.

Asociado al momento de colocar las botellas de alcohol en las rejillas de las jaulas, se observó un pico de actividad que pudo estar provocado por a) la activación de las ratas además de (b) la presencia del investigador, que puede alterar a las ratas ocasionando que su movimiento general incremente, y (c) el movimiento de los racks y el cambio de botellas que generan una presión directa sobre los sensores de movimiento, Esto último también podría explicar por qué el artefacto es superior en el horario de llegada de la sustancia que en el de salida: la presión a los sensores es mayor cuando el experimentador tiene que insertar una botella de alcohol a la caja, que cuando tiene que retirarla. También es posible que los animales ya no se encuentren tan alterados al retirar la sustancia como estaban al introducirla, ya sea porque (a) el horario en que se remueve la botella coincide con la mitad de la fase de actividad o de descanso, y podrían estar menos estimuladas que al inicio de dichas fases, o, en el caso de los

grupos experimentales, (b) porque el efecto depresor del alcohol aumentó su umbral de estimulación.

Previo al artefacto causado por el movimiento de las botellas, en los grupos experimentales, a diferencia de los controles, se registró actividad anticipatoria, previa a la llegada del experimentador. Esto concuerda con lo que sucede en protocolos de acceso restringido al alimento (Mistlberger, 2009) y a otras drogas de abuso (Gillman et al., 2019). Y coincide con los estudios de Morgansten y cols. (2012), que encontraron un incremento en las conductas de búsqueda y exploración previo a la llegada diaria del alcohol al inicio de la noche. Estos resultados confirman la idea de que el sistema circadiano es susceptible a ser sincronizado por estímulos reforzantes o hedónicos (Escobar et al., 2011).

La anticipación por sólo 15 minutos refleja una estimación temporal muy precisa, ya se ha observado en protocolos de anticipación a un estímulo con alto valor hedónico, como el chocolate (Mendoza et al., 2005). En protocolos de anticipación a otras drogas, el tiempo de actividad anticipatoria varía, pero suele ser de al menos una hora previa al acceso (Gillman et al., 2009, 2013; Juárez-Portilla et al., 2018). Esta breve anticipación es diferente a lo reportado en protocolos de anticipación al alimento, donde la actividad inicia hasta 3 horas previas a la disponibilidad del estímulo y va asociada directamente con el estado de hambre que establece la privación prolongada de alimento (Mistlberger, 1994). Esta anticipación implica el desarrollo de activación conductual y conductas de búsqueda, que podrían ser reflejo de un incremento en el *craving*, que constituye una parte importante del proceso de adicción (Koob & Volkow, 2016; Tamura et al., 2021). Ya se ha utilizado la actividad anticipatoria como una medida de *craving* en el consumo frecuente de un estímulo apetecible (Muñoz-Escobar et al., 2019). Esto implica que el desarrollo de conductas anticipatorias podría favorecer el desarrollo de la adicción.

Aunque el enfoque del estudio es la anticipación al acceso al alcohol, es interesante que, en el grupo AN, también hubo una leve anticipación al horario de salida del

alcohol. Dado que los sujetos control (sin acceso al alcohol) no la presentaron, es probable que esta activación sea una señal de inquietud por el retiro de la sustancia de abuso.

### *Temperatura corporal*

En los grupos control, la temperatura no se vio afectada por las manipulaciones, excepto por un incremento repentino en la temperatura después del horario de acceso al agua. Este aumento podría ser consecuencia directa del aumento de actividad general ocasionado por la entrada de los experimentadores. En el grupo AD se presentó el mismo pico de temperatura después del horario de acceso, pero también mostró una hipotermia significativa antes y después de ese pico. Finalmente, el grupo AN presentó un incremento en temperatura que inició media hora antes de la llegada del alcohol, y se volvió significativo en el horario de acceso, además de una hipotermia mucho más larga, antes y después de ese pico. Es decir que sólo el grupo AN mostró un patrón de anticipación.

En los estudios de acceso restringido al alimento, se ha reportado un incremento en la temperatura corporal previo al horario de alimentación asociado a la activación conductual (Davidson & Stephan, 1999). Por otro lado, en protocolo de anticipación a un estímulo apetitoso (chocolate) (Blancas et al., 2014; Muñoz-Escobar et al., 2019) se reportaron efectos similares a los del grupo AN, con una hipotermia seguida de un aumento de temperatura previos a la llegada del estímulo.

La anticipación al alimento involucra un estado metabólico negativo, mientras que la del chocolate tiene como única motivación el valor hedónico del estímulo, por lo que tiene sentido que existan diferencias en la manera que tienen de expresar anticipación. Lo encontrado en este estudio es más parecido a la anticipación al chocolate, tanto en la motivación por obtener el estímulo (por valor hedónico, no por necesidad calórica), como en los cambios fisiológicos y conductuales en anticipación a su llegada (actividad anticipatoria de corta duración y una hipotermia seguida de hipertermia previas al

horario de acceso). Hasta donde sabemos, no se ha estudiado el efecto anticipatorio de la temperatura en protocolos de acceso restringido a otras drogas de abuso.

Es posible que el efecto circadiano en el día en el grupo AD haya sido suficiente para generar la disminución de temperatura, pero no un aumento posterior medible, mientras que el efecto nocturno en AN haya sido mayor, permitiendo observar el efecto de disminución y aumento de temperatura corporal en anticipación a la llegada del alcohol, como sucede con el chocolate (Blancas et al., 2014; Muñoz-Escobar et al., 2019).

Es importante considerar también la posibilidad de que el alcohol, y no su efecto circadiano, sea el responsable de este patrón de disminución temperatura. Estudios previos han descrito que el alcohol puede generar por sí mismo una hipotermia y desregulación de temperatura en ratas (Baird et al., 1998; Kalant & Lê, 1983). Esta disminución es más fuerte cuando el consumo se da en las primeras horas de la fase de oscuridad (Baird et al., 1998, Damaggio & Gorman, 2014b). Esto coincide con los resultados del grupo AN, cuya temperatura bajó significativamente más que la del grupo AD.

#### *Respuestas de actividad y temperatura en abstinencia*

Durante la fase de abstinencia, los patrones de los grupos control se revirtieron a los que tenían en la línea base; el pico repentino de actividad en el horario exacto de acceso a la botella adicional de agua desapareció, así como el pico de temperatura que le precedía. Esto confirmó que parte de la activación observada en estos grupos eran un artefacto derivado de la entrada del experimentador, y no una consecuencia del acceso restringido al agua.

Por el contrario, los grupos experimentales mantuvieron un algunos de los cambios observados en su fase de restricción. El grupo AD mostró picos de actividad previos al horario de acceso, aunque su incremento no fue significativo, y mantuvo el patrón de hipotermia seguida por hipertermia después del horario de acceso. El grupo AN tuvo un aumento significativo de actividad previo y alrededor del horario en que solía recibir el

alcohol, y una hipotermia seguida de un incremento gradual de temperatura en anticipación al horario de acceso.

La persistencia de estos incrementos, en ausencia total de cualquier estímulo en ese horario, son evidencia de una sincronización circadiana al alcohol, particularmente en el grupo de consumo nocturno. Esto concuerda con lo observado al dejar en abstinencia a un roedor en sincronización al alimento (Mistlberger, 2009).

La persistencia de la actividad anticipatoria también se ha reportado por Gillman y cols. en protocolos de administración circadiana de otras drogas de abuso, como el fentanilo (2009) y la nicotina (2013)

### **El acceso restringido al alcohol genera conductas tipo adictivas**

Las mediciones de consumo y las pruebas de esfuerzo confirmaron que las ratas sujetas al protocolo de acceso restringido al alcohol presentaron conductas similares a las propuestas para determinar conductas adictivas en animales experimentales.

#### *Consumo de alcohol o agua adicional*

El consumo de alcohol fue superior al consumo de agua de la segunda botella de los grupos controles. Más importante es que la preferencia de alcohol sobre agua fue superior a 0.5 en los grupos experimentales; es decir que, para la tercera semana del protocolo, los sujetos preferían consumir de la botella alcohol que de su botella regular de agua. Es claro que este efecto se debe a la sustancia consumida y no a las características de la segunda botella, ya que los grupos control prefirieron beber de su botella regular.

Es probable que las diferencias encontradas entre los grupos de día y noche en las medidas de consumo se deban a que las ratas son nocturnas y están despiertas y consumiendo más líquidos y alimentos en esta fase. Es por eso que, a pesar de que los

grupos CN y AN consumen más cantidad de sustancia que sus contrapartes, la preferencia de consumo es similar en los grupos diurnos y nocturnos.

El escalamiento a través del tiempo en la cantidad de líquido consumido sólo fue encontrado en los grupos que consumieron alcohol. Este incremento progresivo se observa también en humanos con TCS, y se considera una evidencia del desarrollo de tolerancia a la sustancia (APA, 2013). Por esta razón, este patrón de consumo se ha utilizado como medida de adicción en modelos animales (Ahmed, 2011; Planeta, 2013; Vanderschuren & Ahmed, 2021).

### *Pruebas de esfuerzo*

Para medir el esfuerzo por consumir una sustancia a pesar de las consecuencias, generalmente se utilizan pruebas donde el consumo de la sustancia está pareado a un estímulo aversivo físico, como un choque eléctrico, y se evalúa si el consumo continúa aún en esas condiciones (Deroche-Gamonet et al., 2004; Vanderschuren & Ahmed, 2021). En este estudio se utilizó la prueba de la caja luz-oscuridad como una alternativa que utiliza la aversión natural de las ratas a una luz intensa y espacio abierto, en lugar de un castigo físico severo (Teegarden & Bale, 2007)

La desventaja de esta prueba es que, al tener que ser corta para que los animales no se aclimaten al ambiente aversivo, el tiempo no es suficiente para que se de un consumo medible de la sustancia; en 5 minutos, las ratas a menudo consumen tan poco, que una gota de alcohol cayendo de la botella representaría un error significativo. Por esta razón se midió el tiempo que los sujetos pasaron en el compartimento de luz, que es lo que generalmente se mide en esta prueba (Bourin & Hascoët, 2003; Teegarden & Bale, 2007).

Los sujetos que consumían alcohol (AD y AN) pasaron un porcentaje más alto de su tiempo en el compartimento de luz de la caja que aquellos que consumían agua (CD y CN). Esto sugiere que el consumo de alcohol los motivó a acercarse a la botella a

pesar de la aversión de la luz intensa y el espacio abierto, que indica una motivación intensa que lleva a realizar un esfuerzo a pesar de las consecuencias negativas.

La prueba de la gota buscó medir conductas similares a la dificultad para detener el consumo en humanos. Los sujetos que consumían alcohol interactuaron por más tiempo con su bebedero que los que consumían agua, a pesar de que los bebederos no contenían alcohol. Esto es indicativo de que el consumo de alcohol los llevó a una dificultad por detener su conducta de consumo, a pesar de la falta de recompensa.

### *Prueba de atracón (binge)*

En la prueba de binge, un primer análisis mostró que las ratas de los grupos experimentales (AD y AN) tomaron mucho más alcohol durante la prueba de lo que tomaron las controles (CD y CN) de agua de la botella adicional. Esto confirmó la preferencia de consumo de alcohol sobre agua. En un análisis posterior, se comparó el consumo durante la prueba con el consumo regular de la fase de restricción, para saber si se presentó un atracón en el que el consumo haya aumentado por el periodo de abstinencia. La prueba no promovió, en ninguno de los grupos, un consumo de la sustancia superior a su consumo regular, por lo que no puede considerarse un episodio de atracón (Perello et al., 2014). Una posible explicación a este resultado es que, si se dejaron pasar demasiados días de abstinencia, pudo haber un proceso de extinción a la conducta de consumo, por lo que los sujetos ya no buscaban beber el alcohol. Sin embargo, se ha encontrado que el *craving* puede permanecer, e incluso incrementar, después de periodos de abstinencia de hasta 30 días (Grimm et al., 2011). Aunque esto se investigó en abstinencia a la sacarosa, es poco probable que una abstinencia al alcohol tan corta como la del presente estudio (4 días) sea suficiente para generar la extinción al consumo.

### **Correlación entre la anticipación y las conductas tipo adictivas**

No se encontró ninguna relación directa entre los sujetos que anticipan más y los que tienen más conductas adictivas. El protocolo genera tanto anticipación circadiana como

conductas tipo adictivas, pero lo hace de manera independiente y a distintos grados en cada sujeto. Esto podría significar que la anticipación a la sustancia no promueve la adicción, ni viceversa. Sin embargo, considerando que los análisis mostraron tendencias de correlaciones altas en el grupo AN, y bajas en el grupo AD, también es posible que la relación se vuelva más clara con una N mayor, o en ratas con mayor consumo y/o mayor nivel de adicción.

## CONCLUSIONES

Con este estudio se probó, en primer lugar, que es posible desarrollar anticipación al acceso diario de alcohol, que esta anticipación es de carácter circadiano. En segundo término, se comprobó que el mismo acceso diario y programado al alcohol es suficiente para generar algunas de las conductas que caracterizan al TCA. Por último, se probó que este fenómeno se observa independientemente de si el consumo se da en el día o en la noche, aunque en algunos aspectos se intensifica cuando se da en la fase de actividad (noche en ratas).

La anticipación circadiana implica un incremento en el *craving* diariamente antes del horario de consumo. Sin embargo, la anticipación no demostró ser un predictor de otras conductas tipo adictivas en este estudio, por lo que permanece en duda si existe una relación entre el desarrollo de estos dos factores. Los resultados de este estudio ofrecen un avance en la exploración de la posibilidad de que el aumento en el deseo por consumir alcohol, y las conductas de búsqueda del mismo, incrementen el consumo de alcohol y el desarrollo del trastorno por consumo de sustancias. En el futuro, un protocolo más largo que permita un mayor incremento progresivo de consumo de alcohol podría revelar resultados no vistos en este estudio.

Adicionalmente, los resultados de este estudio abren la puerta a nuevas vías de investigación sobre el fenómeno aún incomprendido de anticipación circadiana a la alimentación y otras conductas motivadas. Futuros estudios podrían explorar las relaciones conductuales y fisiológicas entre la actividad previa al consumo de alcohol y la FAA (actividad anticipatoria al alimento). Esto ayudaría a comprender de mejor manera el fenómeno de la anticipación circadiana, así como a dilucidar los mecanismos neuronales que la subyacen.

### ***Limitaciones y sugerencias***

La principal limitación del estudio es que sólo duró tres semanas. Es posible que el consumo, preferencia y medidas de conducta adictiva hubieran seguido creciendo con el tiempo de consumo, y esto podría haber esclarecido una correlación entre la anticipación y la conducta tipo adictiva. Las repeticiones desiguales del protocolo también llevaron a tener Ns diferentes en cada medida; en particular, en las correlaciones, la baja N pudo haber sido un factor en los resultados obtenidos.

Además de extender el tiempo y la N del protocolo, proponemos que en futuros estudios se compare el desarrollo de consumo y conductas tipo adictivas en sujetos que anticipan al alcohol (acceso restringido programado) y sujetos que no lo hacen (acceso aleatorio), para explorar la relación entre la anticipación y el desarrollo de la adicción. La indagación sobre esta posible relación nos ayudará a entender de mejor manera el problema del consumo de alcohol en el ser humano.

## REFERENCIAS

- Airagnes, G., Ducoutumany, G., Laffy-Beaufils, B., Le Faou, A. L., & Limosin, F. (2019). Alcohol withdrawal syndrome management: Is there anything new? *Revue de Medecine Interne*, 40(6), 373–379. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2019.02.001>
- Asociación Americana de Psiquiatría (2013), *Guía de consulta de los criterios diagnósticos del DSM 5*. Arlington, VA, Asociación Americana de Psiquiatría.
- Ahmed, S. H. (2011). Escalation of drug use. En *Animal models of drug addiction, neuro methods* (ed. Olmstead MC), Vol. 53, pp. 267–292. Humana, New York
- Ángeles-Castellanos, M., Aguilar-Roblero, R., & Escobar, C. (2004). c-Fos expression in hypothalamic nuclei of food-entrained rats. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 286(1 55-1), 158–165. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00216.2003>
- Ángeles-Castellanos, M., Mendoza, J., & Escobar, C. (2007). Restricted feeding schedules phase shift daily rhythms of c-Fos and protein Per1 immunoreactivity in corticolimbic regions in rats. *Neuroscience*, 144(1), 344–355. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.08.064>
- Attilia, F., Perciballi, R., Rotondo, C., Capriglione, I. D. A., Iannuzzi, S., Attilia, M. L., Coriale, G., Vitali, M., Cereatti, F., Fiore, M., Ceccanti, M., Study, I., & Crarl, G. (2018). Alcohol withdrawal syndrome: diagnostic and therapeutic methods. *Rivista di Psichiatria*. 53(3), 118–122.
- Baird, T. J., Briscoe, R. J., Vallett, M., Vanecek, S. A., Holloway, F. A., & Gauvin, D. V. (1998). Phase-response curve for ethanol: Alterations in circadian rhythms of temperature and activity in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 61(3), 303–315. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(98\)00111-7](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(98)00111-7)

- Bhadra, U., Thakkar, N., Das, P., & Pal, M. (2017). Evolution of circadian rhythms : from bacteria to human. *Sleep Medicine*, 35, 49–61. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2017.04.008>
- Blancas, A., González-García, S. D., Rodríguez, K., & Escobar, C. (2014). Progressive anticipation in behavior and brain activation of rats exposed to scheduled daily palatable food. *Neuroscience*, 281, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.09.036>
- Bourin, M., & Hascoët, M. (2003). The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*, 463(1–3), 55–65. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01274-3](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01274-3)
- Broadwater, M., Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2013). Effects of voluntary access to sweetened ethanol during adolescence on intake in adulthood. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 37(6), 1048–1055. <https://doi.org/10.1111/acer.12049.Effects>
- Buhr, E. D., & Takahashi, J. S. (2013). Molecular components of the mammalian circadian clock. *HHMI*, 217, 3–27.
- Buijs, R. M., Escobar, C., & Swaab, D. F. (2013). The circadian system and the balance of the autonomic nervous system. In *Handbook of Clinical Neurology* (1st ed., Vol. 117). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53491-0.00015-8>
- Caba, M., & Gonza, G. (2009). The rabbit pup , a natural model of nursing-anticipatory activity. *European Journal of Neuroscience*, 30(June), 1697–1706. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06964.x>
- Chen, C. P., Kuhn, P., Advis, J. P., & Sarkar, D. K. (2004). Chronic ethanol consumption impairs the circadian rhythm of pro-opiomelanocortin and period genes mRNA expression in the hypothalamus of the male rat. *Journal of*

Neurochemistry, 88(6), 1547–1554. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02300.x>

Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas, Organización de los Estados Americanos. (2019). Informe sobre el Consumo de Drogas en las Américas 2019. OEA

Crabbe, J. C., Harris, R. A., & Koob, G. F. (2011). Preclinical studies of alcohol binge drinking. *Ann N Y Acad Sci.*, 1216, 24–40. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05895.x>.Preclinical

Crabbe, J. C., Phillips, T. J., & Belknap, J. K. (2010). The Complexity of Alcohol Drinking: Studies in Rodent Genetic Models. *Behavioral Genetics*, 40(6), 737–750. <https://doi.org/10.1007/s10519-010-9371-z>.The

Crawley, J., & Goodwin, F. K. (1980). Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 13(2), 167–170. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(80\)90067-2](https://doi.org/10.1016/0091-3057(80)90067-2)

Damaggio, A. S., & Gorman, M. R. (2014a). Circadian phase determines effects of repeated ethanol vapor exposure and withdrawal on body temperature and activity rhythms of male mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 38(3), 879–888. <https://doi.org/10.1111/acer.12297>

Damaggio, A. S., & Gorman, M. R. (2014b). The circadian timing system in ethanol consumption and dependence. *Behavioral Neuroscience*, 128(3), 371–386. <https://doi.org/10.1037/a0036408>

Danel, T., Jeanson, R., & Touitou, Y. (2003). Temporal Pattern in Consumption of the First Drink of the Day in Alcohol-Dependent Persons. 20(6), 1093–1102.

- Daniel, W. W. (1991). *Bioestadística Base para el análisis de las Ciencias De La Salud*. Limusa Wiley
- Davidson, A. J. (2009). Lesion studies targeting food-anticipatory activity. *European Journal of Neuroscience*, 30(9), 1658–1664. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06961.x>
- Davidson, A. J., & Stephan, F. K. (1999). Feeding-entrained circadian rhythms in hypophysectomized rats with suprachiasmatic nucleus lesions. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 277(5 46-5). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1999.277.5.r1376>
- De, I. H., & Henrik, O. (2019). Differentiating external zeitgeber impact on peripheral circadian clock resetting. *Nature Scientific Reports*, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56323-z>
- De Jong, J. W., Vanderschuren, L. J. M. J., & Adan, R. A. H. (2012). Towards an animal model of food addiction. *Obesity Facts*, 5(2), 180–195. <https://doi.org/10.1159/000338292>
- Deroche-Gamonet, V., Belin, D., & Piazza, P. V. (2004). Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science*, 305(5686), 1014–1017. <https://doi.org/10.1126/science.1099020>
- Di Chiara, G. (1995). The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation. *Drug and Alcohol Dependence*, 38(2), 95–137. [https://doi.org/10.1016/0376-8716\(95\)01118-l](https://doi.org/10.1016/0376-8716(95)01118-l)
- Dibner, C., & Schibler, U. (2015). Circadian timing of metabolism in animal models and humans. *Journal of Internal Medicine*, 513–527. <https://doi.org/10.1111/joim.12347>

- El-Guebaly, N. (1987). Alcohol, Alcoholism, and Biological Rhythms. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 11(2), 139–143. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1987.tb01277.x>
- Elvig, S. K., McGinn, M. A., Smith, C., Arends, M. A., Koob, G. F., & Vendruscolo, L. F. (2021). Tolerance to alcohol: A critical yet understudied factor in alcohol addiction. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 204(October 2020), 173155. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2021.173155>
- Escobar, C., Cailotto, C., Angeles-Castellanos, M., Delgado, R. S., & Buijs, R. M. (2009). Peripheral oscillators: The driving force for food-anticipatory activity. *European Journal of Neuroscience*, 30(9), 1665–1675. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06972.x>
- Escobar, C., Salgado, R., Rodriguez, K., Blancas Vázquez, A. S., Angeles-Castellanos, M., & Buijs, R. M. (2011). Scheduled meals and scheduled palatable snacks synchronize circadian rhythms: Consequences for ingestive behavior. *Physiology and Behavior*, 104(4), 555–561. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.05.001>
- Files, F. J., Lewis, R. S., & Samson, H. H. (1993). Ethanol self-administration by alcohol-nonpreferring (NP) rats in a continuous access situation. *Alcohol*, 10(2), 139–144. [https://doi.org/10.1016/0741-8329\(93\)90093-4](https://doi.org/10.1016/0741-8329(93)90093-4)
- Gallistel, C. R., & Gibbon, J. (2000). Time , Rate , and Conditioning. *Psychological Review*, 107(2), 289–344.
- Garbusow, M., Sebold, M., Beck, A., & Heinz, A. (2014). Too difficult to stop: Mechanisms facilitating relapse in alcohol dependence. *Neuropsychobiology*, 70(2), 103–110. <https://doi.org/10.1159/000362838>

- García Pardo, M. P., Roger Sánchez, C., Enrique de la Rubia Ortí, J., & Asunción Aguilar Calpe, M. (2017). Animal Models of Drug Addiction. *Adicciones*, 29(4), 278–292. <https://doi.org/10.20882/adicciones.862>
- Gauvin, D. V., Baird, T. J., Vanecek, S. A., Briscoe, R. J., Vallett, M., & Holloway, F. A. (1997). Effects of time-of-day and photoperiod phase shifts on voluntary ethanol consumption in rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 21(5), 817–825. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1997.tb03845.x>
- Gillman, A. G., Kosobud, A. E. K., & Timberlake, W. (2008). Pre- and post-nicotine circadian activity rhythms can be differentiated by a paired environmental cue. *Physiology and Behavior*, 93(1–2), 337–350. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.09.013>
- Gillman, A. G., Leffel, J. K., Kosobud, A. E. K., & Timberlake, W. (2009). Fentanyl, but not haloperidol, entrains persisting circadian activity episodes when administered at 24- and 31-h intervals. *Behavioural Brain Research*, 205(1), 102–114. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.07.002>
- Gillman, A. G., Leffel, J. K., Kosobud, A. E. K., & Timberlake, W. (2013). Behavioral characteristics and pharmacological manipulations of a nicotine-entrainable circadian oscillator. *Chronobiology International*, 30(7), 855–869. <https://doi.org/10.3109/07420528.2013.782314>
- Gillman, A. G., Rebec, G. V., Pecoraro, N. C., & Kosobud, A. E. K. (2019). Circadian entrainment by food and drugs of abuse. *Behavioural Processes*, 165(February), 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2019.05.017>
- Grimm, J. W., Barnes, J., North, K., Collins, S., & Weber, R. (2011). A general method for evaluating incubation of sucrose craving in rats. *Journal of Visualized Experiments*, 57, 1–7. <https://doi.org/10.3791/3335>

- Hahn, J. D., Fink, G., Kruk, M. R., & Stanley, B. G. (2019). Editorial: Current Views of Hypothalamic Contributions to the Control of Motivated Behaviors. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 13(August), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnsys.2019.00032>
- Hasler, B. P., & Clark, D. B. (2013). Circadian Misalignment, Reward-Related Brain Function, and Adolescent Alcohol Involvement. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 37(4), 558–565. <https://doi.org/10.1111/acer.12003>
- Hisler, G. C., Rothenberger, S. D., Clark, D. B., & Hasler, B. P. (2021). Is There a 24 Hour Rhythm in Alcohol Craving and Does it Vary by Sleep/Circadian Timing? *Chronobiology International*, 38(1), 109–121. <https://doi.org/10.1080/07420528.2020.1838532>
- Hsu, C. T., Dollár, P., Chang, D., & Steele, A. D. (2010). Daily timed sexual interaction induces moderate anticipatory activity in mice. *PLoS ONE*, 5(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015429>
- Huang, M. C., Ho, C. W., Chen, C. H., Liu, S. C., Chen, C. C., & Leu, S. J. (2010). Reduced expression of circadian clock genes in male alcoholic patients. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 34(11), 1899–1904. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2010.01278.x>
- Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Instituto Nacional de Salud Pública, Comisión Nacional Contra las Adicciones & Secretaría de Salud. (2017). Encuesta nacional de consumo de drogas, alcohol y tabaco ENCODAT 2016-2017: Reporte alcohol. INPRF
- Juárez-Portilla, C., Pitter, M., Kim, R. D., Patel, P. Y., Ledesma, R. A., LeSauter, J., & Silver, R. (2018). Brain activity during methamphetamine anticipation in a non-invasive self-administration paradigm in mice. *ENeuro*, 5(2). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0433-17.2018>

- Kalant, H., & Lê, A. D. (1983). Effects of ethanol on thermoregulation. *Pharmacology and Therapeutics*, 23(3), 313–364. [https://doi.org/10.1016/0163-7258\(83\)90018-9](https://doi.org/10.1016/0163-7258(83)90018-9)
- Kamada, T., & Hata, T. (2021). Striatal dopamine D1 receptors control motivation to respond, but not interval timing, during the timing task. *Learning and Memory*, 28(1), 24–29. <https://doi.org/10.1101/LM.052266.120>
- Katner, S. N., Kerr, T. M., & Weiss, F. (1996). Ethanol anticipation enhances dopamine efflux in the nucleus accumbens of alcohol-preferring (P) but not Wistar rats. *Behavioural Pharmacology*, 7(7), 669–674.
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2016). Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *The Lancet Psychiatry*, 3(8), 760–773. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00104-8)
- Kosobud, A. E. K., Pecoraro, N. C., Rebec, G. V., & Timberlake, W. (1998). Circadian activity precedes daily methamphetamine injections in the rat. *Neuroscience Letters*, 250(2), 99–102. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)00439-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00439-X)
- Kuntsche E., Müller S. (2012). Why Do Young People Start Drinking? Motives for First-Time Alcohol Consumption and Links to Risky Drinking in Early Adolescence. *Eur Addict Res* 2012;18:34-39. doi: 10.1159/000333036
- Littleton, J. (1998). Neurochemical mechanisms underlying alcohol withdrawal. *Alcohol Health and Research World*, 22(1), 13–24.
- Logan, R. W., Williams III, W. P., & McClung, C. A. (2014). Circadian rhythms and addiction: Mechanistic insights and future directions. *Behavioral Neuroscience*, 128(3), 387–412. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.08.138>

- Marchant, N. J., Campbell, E. J., & Kaganovsky, K. (2018). Punishment of alcohol-reinforced responding in alcohol preferring P rats reveals a bimodal population: Implications for models of compulsive drug seeking Nathan. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 87(A), 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.07.020>.Punishment
- Melendez, R. I., Rodd-Henricks, Z. A., Engleman, E. A., Li, T. K., McBride, W. J., & Murphy, J. M. (2002). Microdialysis of dopamine in the nucleus accumbens of alcohol-preferring (P) rats during anticipation and operant self-administration of ethanol. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 26(3), 318–325. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2002.tb02540.x>
- Mendoza, J., Angeles-Castellanos, M., & Escobar, C. (2005). Entrainment by a palatable meal induces food-anticipatory activity and c-Fos expression in reward-related areas of the brain. *Neuroscience*, 133(1), 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.01.064>
- Midway, S., Robertson, M., Flinn, S., & Kaller, M. (2020). Comparing multiple comparisons: practical guidance for choosing the best multiple comparisons test. *PeerJ*, 8, 1–26. <https://doi.org/10.7717/peerj.10387>
- Mistlberger, R. E. (1992). Anticipatory activity rhythms under daily schedules of water access in the rat. *Journal of Biological Rhythms*, 7(2), 149–160.
- Mistlberger, R. E. (1994). Circadian food-anticipatory activity: Formal models and physiological mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 18(2), 171–195. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(94\)90023-X](https://doi.org/10.1016/0149-7634(94)90023-X)
- Mistlberger, R. E. (2009). Food-anticipatory circadian rhythms: Concepts and methods. *European Journal of Neuroscience*, 30(9), 1718–1729. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06965.x>

- Mistlberger, R. E. (2011). Neurobiology of food anticipatory circadian rhythms. *Physiology and Behavior*, 104(4), 535–545. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.04.015>
- Mistlberger, R. E., & Mumby, D. G. (1992). The limbic system and food-anticipatory circadian rhythms in the rat: ablation and dopamine blocking studies. *Behavioural Brain Research*, 47(2), 159–168. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(05\)80122-6](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(05)80122-6)
- Morganstern, I., Liang, S., Ye, Z., Karatayev, O., & Leibowitz, S. F. (2012). Disturbances in behavior and cortical enkephalin gene expression during the anticipation of ethanol in rats characterized as high drinkers. *Alcohol*, 46(6), 559–568. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2012.05.003>
- Muñoz-Escobar, G., Guerrero-Vargas, N. N., & Escobar, C. (2019). Random access to palatable food stimulates similar addiction-like responses as a fixed schedule, but only a fixed schedule elicits anticipatory activation. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54540-0>
- Oleson, E. B., Cachope, R., Fitoussi, A., Tsutsui, K., Wu, S., Gallegos, J. A., & Cheer, J. F. (2014). Cannabinoid receptor activation shifts temporally engendered patterns of dopamine release. *Neuropsychopharmacology*, 39(6), 1441–1452. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.340>
- Pedrosa, I., Juarros-Basterretxea, J., Robles-Fernández, A., Basteiro, J., & García-Cueto, E. (2015). Pruebas de bondad de ajuste en distribuciones simétricas, ¿qué estadístico utilizar? *Universitas Psychologica*, 14(1), 245–254. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.upsy13-5.pbad>
- Pendergast, J. S., & Yamazaki, S. (2018). The Mysterious Food-Entrainable Oscillator: Insights from Mutant and Engineered Mouse Models. *Journal of Biological Rhythms*, 33(5), 458–474. <https://doi.org/10.1177/0748730418789043>

- Perello, M., Valdivia, S., Romero, G. G., & Raingo, J. (2014). Considerations about rodent models of binge eating episodes. *Frontiers in Psychology*, 5(APR), 1–4. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.00372>
- Pérez-Tejada, H. E. (2008). *Estadística para las ciencias sociales, del comportamiento y de la salud (3a edición)*. Cengage Learning Editores
- Petersen, C. C., & Mistlberger, R. E. (2017). Interval Timing Is Preserved Despite Circadian Desynchrony in Rats: Constant Light and Heavy Water Studies. *Journal of Biological Rhythms*, 32(4), 295–308. <https://doi.org/10.1177/0748730417716231>
- Planeta, C. S. (2013). Animal models of alcohol and drug dependence. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 35(SUPPL.2), 140–146. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2013-1149>
- Ramalho, R. (2020). Alcohol consumption and alcohol-related problems during the COVID-19 pandemic: a narrative review. *Australasian Psychiatry*, 28(5), 524–526. <https://doi.org/10.1177/1039856220943024>
- Reséndiz-Flores, M., & Escobar, C. (2019). Circadian disruption favors alcohol consumption and differential  $\Delta$ FosB accumulation in Corticolimbic structures. *Addiction Biology*, 24(6), 1179–1190. <https://doi.org/10.1111/adb.12674>
- Rhodes, J. S., Best, K., Belknap, J. K., Finn, D. A., & Crabbe, J. C. (2005). Evaluation of a simple model of ethanol drinking to intoxication in C57BL/6J mice. *Physiology and Behavior*, 84(1), 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.10.007>
- Richter, C. P., & Campbell, K. H. (1940). Alcohol taste thresholds and concentrations of solution preferred by rats. *Science*, 91(2369), 507–508.

- Rodríguez De Fonseca, F., & Navarro, M. (1998). Role of the limbic system in dependence on drugs. *Annals of Medicine*, 30(4), 397–405. <https://doi.org/10.3109/07853899809029940>
- Rosenwasser, A. M., Clark, J. W., Fixaris, M. C., Belanger, G. V., & Foster, J. A. (2010). Effects of repeated light-dark phase shifts on voluntary ethanol and water intake in male and female Fischer and Lewis rats. *Alcohol*, 44(3), 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2010.03.002>
- Sabino, V., Kwak, J., Rice, K. C., & Cottone, P. (2013). Pharmacological Characterization of the 20% Alcohol Intermittent Access Model in Sardinian Alcohol-Preferring Rats: A Model of Binge-Like Drinking. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 37(4), 635–643. <https://doi.org/10.1111/acer.12008>
- Shibata, S., Minamoto, Y., Ono, M., & Watanabe, S. (1994). Aging impairs methamphetamine-induced free-running and anticipatory locomotor activity rhythms in rats. *Neuroscience Letters*, 172, 107–110.
- Shimmura, T., & Yoshimura, T. (2006). Circadian clock determines the timing of rooster crowing. *CURBIO*, 23(6), R231–R233. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.02.015>
- Simms, J. A., Steensland, P., Medina, B., Abernathy, K. E., Chandler, L. J., Wise, R., & Bartlett, S. E. (2008). Intermittent access to 20% ethanol induces high ethanol consumption in Long-Evans and Wistar rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 32(10), 1816–1823. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00753.x>
- Smit, K., Voogt, C., Otten, R., Kleinjan, M., & Kuntsche, E. (2022). Why adolescents engage in early alcohol use: A study of drinking motives. *Experimental and*

Clinical Psychopharmacology, 30(1), 73–81.  
<https://doi.org/10.1037/pha0000383>

Sollars, P. J., & Pickard, G. E. (2015). The Neurobiology of Circadian Rhythms. *Psychiatric Clinics of North America*, 38(4), 645–665.  
<https://doi.org/10.1016/j.psc.2015.07.003>

Stephan, F. K., Swann, J. M., & Sisk, C. L. (1979). Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic lesions. *Behavioral and Neural Biology*, 25(4), 545–554. [https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(79\)90332-7](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(79)90332-7)

Stephan, F. K., & Zucker, I. (1972). Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(6), 1583–1586.

Tamura, E. K., Oliveira-Silva, K. S., Ferreira-Moraes, F. A., Marinho, E. A. V., & Guerrero-Vargas, N. N. (2021). Circadian rhythms and substance use disorders: A bidirectional relationship. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 201(January), 173105. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2021.173105>

Teegarden, S. L., & Bale, T. L. (2007). Decreases in Dietary Preference Produce Increased Emotionality and Risk for Dietary Relapse. *Biological Psychiatry*, 61(9), 1021–1029. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.09.032>

Tonon, A. C., Pilz, L. K., Markus, R. P., Hidalgo, M. P., & Elisabetsky, E. (2021). Melatonin and Depression: A Translational Perspective From Animal Models to Clinical Studies. *Frontiers in Psychiatry*, 12(April), 1–13.  
<https://doi.org/10.3389/fpsy.2021.638981>

- Turton, S., & Lingford-Hughes, A. (2020). Neurobiology and principles of addiction and tolerance. *Medicine (United Kingdom)*, 48(12), 749–753. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2020.09.012>
- United Nations Office on Drugs and Crime (2021). *World Drug Report 2021*. United Nations Publications, Sales No. E.21.XI.8
- Vanderschuren, L. J. M. J., & Ahmed, S. H. (2021). Animal Models of the Behavioral Symptoms of Substance Use Disorders. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 11(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011932>
- Vanderschuren, L. J. M. J., Minnaard, A. M., Smeets, J. A., & Lesscher, H. M. (2017). Punishment models of addictive behavior. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 13, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2016.10.007>
- Volkow, N. D., & Morales, M. (2015). The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. *Cell*, 162(4), 712–725. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.046>
- Volkow, N. D., Wang, G.-J., Fowler, J. S., & Tomasi, D. (2012). Addiction Circuitry in the Human Brain. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 52, 321–336. <https://doi.org/10.1176/appi.focus.130306>
- Volkow, N. D., Wise, R. A., & Baler, R. (2017). The dopamine motive system: Implications for drug and food addiction. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(12), 741–752. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.130>
- White, W., Feldon, J., Heidbreder, C. A., & White, I. M. (2000). Effects of administering cocaine at the same versus varying times of day on circadian activity patterns and sensitization in rats. *Behavioral Neuroscience*, 114(5), 972–982. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.114.5.972>

World Health Organization (2018). *Global Status Report on Alcohol and Health 2018*. Geneva.

Yang, H., de Jong, J. W., Tak, Y. E., Peck, J., Bateup, H. S., & Lammel, S. (2018). Nucleus Accumbens Subnuclei Regulate Motivated Behavior via Direct Inhibition and Disinhibition of VTA Dopamine Subpopulations. *Neuron*, 97(2), 434-449.e4. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.12.022>

Zhabenko, N., Wojnar, M., & Brower, K. J. (2012). Prevalence and Correlates of Insomnia in a Polish Sample of Alcohol-Dependent Patients. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 36(9), 1600–1607. <https://doi.org/10.1038/s41395-018-0061-4>.h ed. Arlington, VA: American Psychiatric Publishing. 2013

Zou, Z., Wang, H., Uquillas, F. d'Oleire, Wang, X., Ding, J., & Chen, H. (2017). Definition of substance and non-substance addiction. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1010, 21–41. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-5562-1>