



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA (INB)

**FENOTIPO MORFOLÓGICO CEREBRAL POR RESONANCIA MAGNÉTICA DE UN
MODELO DE ALCOHOLISMO EN RATAS**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
DIEGO ANGELES VALDEZ

TUTOR:
DR. EDUARDO ADRIÁN GARZA VILLARREAL
LAB. NACIONAL DE IMAGENOLÓGÍA POR RESONANCIA MAGNÉTICA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA (UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. SARAEL ALCAUTER SOLÓRZANO
DEPTO. DE NEUROBIOLOGÍA CONDUCTUAL Y COGNITIVA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA (UNAM)

DRA. LIZBETH NARANJO ALBARRÁN
DEPTO. DE MATEMÁTICAS
FACULTAD DE CIENCIAS (UNAM)

JURIQUILLA, QUERÉTARO, MAYO DEL 2021



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.

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del comité Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Diego Angeles Valdez, cuyo título es “Fenotipo morfológico cerebral por resonancia magnética de un modelo de alcoholismo en ratas” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente:

Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova

Secretario:

Dr. Eduardo Adrián Garza Villarreal

Vocal:

Dr. Alonso Ramírez Manzanares

Suplente:

Dra. Wendy Portillo Martínez

Suplente:

Dr. Sarael Alcauter Solórzano

Aprobado por el comité académico

Dra. Maricela Luna Muñoz
Coordinadora del programa de Maestría en Ciencias
(Neurobiología)

*A mi familia,
por su esfuerzo, sacrificio y apoyo incondicional*

Agradecimientos

El resultado de este proyecto fue posible gracias a todo esfuerzo, apoyo y cariño de muchas personas que aprecio y estimo. Agradezco a todos aquellos que estuvieron conmigo, apoyándome de manera incondicional.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme conocimiento, humildad, pero, sobre todo, por la formación a nivel profesional. Al Instituto de Neurobiología por su excelencia y calidad de instalaciones. Agradezco al Laboratorio Universitario de Bioterio, a cargo de MVZ. José Martín García Servín, Dra. Alejandra Castilla León y la Dra. María A. Carbajo Mata, el Laboratorio Nacional enfocado en Imagenología por Resonancia Magnética (LANIREM) en donde funge como responsable el Dr. Luis Concha Loyola y al apoyo del Dr. Juan José Ortíz Retana, agradecer el soporte técnico de Luis Aguilar, Alejandro De León, Carlos Flores y Jair García del Laboratorio Nacional de Visualización Científica Avanzada (LAVIS). Así agradecer de forma encarecida al Laboratorio D12 a la Dra. María Magdalena Giordano Noyola y a Soledad Mendoza Trejo y al Laboratorio C25 al Dr. Fernando Barrios Álvarez, Dr. Sarael Alcauter Solórzano, al Dr. Luis Concha Loyola y al Dr. Hiram Luna Munguía, por todo el apoyo brindado.

Agradezco a todos los profesores por todo el conocimiento brindado y por todas las asesorías en innumerables situaciones.

Agradezco, sin palabras al Dr. Eduardo A. Garza-Villarreal, mi tutor principal, por seguir ayudándome a crecer en el campo de la investigación, por todos sus consejos profesionales y personales, paciencia y por todas sus enseñanzas, ha sido más que una guía en este proceso de transición.

A mi comité tutorial, el Dr. Sarael Alcauter Solórzano y la Dra. Lizbeth Naranjo Albarrán, así como a mi jurado de tesis a la Dra. Verónica Rodríguez Córdova, Dra. Wendy Portillo Martínez

y a D.Sc. Alonso Ramírez Manzanares le agradezco todo su tiempo, sugerencias y por el interés prestado al proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por permitirme realizar la maestría y por su gran apoyo (N.º 1003596).

Felicito a todo el apoyo administrativo de la misma unidad, en específico a la Dra. Nuri Aranda López y Ma. Carmen Mendoza López.

Gracias a mi familia, principalmente a mis papás: a mi mamá Lidia Valdez y a mi papá Mario Angeles por todo el amor, apoyo y por creer en mi haciendo que mis sueños se vuelvan metas, a mi hermana Jessica Angeles porque me ha apoyado innumerables veces sin importar nada. Agradezco al PSILANTRO LAB y a cada uno de los integrantes del mismo, gracias por las enseñanzas y motivación en mi labor del día a día, pero quisiera agradecer en específico a mi compañera y amiga Alejandra López.

A mis amistades que han estado conmigo sin importar las circunstancias y la distancia, los cuales día con día han marcado mi vida, con vivencias y experiencia. Gracias por compartir momentos conmigo: Eli Valles (Nymeria y Lady) por todos sus consejos y por estar conmigo durante proceso, a Edna Navarrete, Luis Ángel Trujillo, Erika González, Alejandra Garay, Jalil Rasgado, Martín Macías (Fiador de cervezas), el buen Maya, Luis Zarate, Andrea Flores y a una mujer maravillosa, con la que tuve la fortuna de compartir de mi vida Jimena Covarrubias. A mis goldos de ciencia Said Jiménez y Josué Mendoza, que siempre están conmigo, aconsejándome y cuidándome, gracias por todas las alegrías, tristezas y grandes momentos, los aprecio mucho, sin ellos nada sería igual.

Resumen

El trastorno por consumo de alcohol (AUD) es un trastorno neuropsiquiátrico complejo, el cual presenta alteraciones conductuales, neurobiológicas y psicosociales. El desarrollo del AUD se caracteriza en tres etapas: atracón/intoxicación, abstinencia/efectos negativos y preocupación/anticipación. A pesar de que estas etapas se han estudiado en humanos y animales, faltan por conocer los cambios neuroadaptativos que se producen en el cerebro durante cada etapa y entender cómo se genera el AUD. Los modelos preclínicos de la AUD nos ayudan a modelar estas etapas y, en combinación con las técnicas de neuroimagen in vivo (i.e., estudios longitudinales), podrían proporcionar una mejor comprensión de los cambios neuroadaptativos en AUD. En este estudio, utilizamos el modelo de Acceso Intermitente al Etanol de 2 Botellas a Elección (IA2BC) en ratas Wistar, $n = 29$ (16 hembras), con un peso de 160 g (~7 semanas de edad- 45 días postnatales correspondientes a la adolescencia). Los animales tenían acceso ad-libitum a comida estándar de laboratorio y agua. Se realizó un estudio de resonancia magnética (MRI) basal, y posteriormente se asignaron 22 ratas al grupo de EtOH y 7 al grupo de control. El grupo de EtOH recibió acceso continuo de etanol al 20% en un ciclo invertido luz/oscuridad de 12 horas durante 45 días. La primera adquisición de MRI fue en la línea de base, y la segunda adquisición de RMN fue después de terminar las 20 sesiones (P90) de ingesta de etanol.

Utilizamos la morfometría basada en la deformación para crear mapas jacobianos por sujeto y punto de tiempo utilizando una herramienta DBM de dos niveles usando una plantilla y parcelación de atlas de rata Fisher, se implementó un modelo de efectos mixtos, se comparó el efecto dentro de los sujetos de la resonancia basal versus las 20 sesiones de alcohol. La ingesta principal de alcohol (g/Kg/24h) fue de 1.90 ± 2.08 (media/sd). Se encontró cambios estructurales locales después de 20 sesiones de consumo de alcohol en varias regiones del cerebro, tálamo y corteza cerebral mostraron una reducción mientras que el giro dentado y el caudado-putamen mostraron un aumento local. Para encontrar el fenotipo morfológico cerebral asociado al consumo de alcohol, se crearon dos clases (alto consumo / bajo consumo) y se implementó un modelo de regresión logística bayesiana para determinar la morfología cerebral asociada a alto consumo de alcohol. Podría decirse que estos resultados son cambios estructurales neuroadaptativos relacionados con el consumo crónico de alcohol sin embargo, son resultados no corregidos por múltiples comparaciones.

Abstract

Alcohol use disorder (AUD) is a complex neuropsychiatric disorder that combines behavioral, neurobiological, and psychosocial alterations. The development of AUD has been characterized as a three-stage cycle: binge/intoxication, withdrawal/negative affect, and preoccupation/anticipation. Although these stages have been studied in humans and animals, there is still missing knowledge of the neuroadaptive changes happening across the brain during each stage. Knowledge of these changes would possibly help us understand how AUD is established. Preclinical models of AUD are key to model these stages, and in combination with longitudinal in vivo neuroimaging, could provide a better understanding of the neuroadaptive changes in AUD. In this study, we used the Intermittent-Access Ethanol 2-Bottle-Choice Drinking Paradigm in $n=29$ (16 female), Wistar rats, starting at a weight of 160 g (~7weeks old–45 days post-natal corresponding to adolescence). Animals had ad-libitum access to standard laboratory chow and water. After the baseline MRI scans, 22 rats were assigned to the EtOH group and 7 to the Control group. EtOH group underwent a modified version of the Wise pre-clinical AUD model where, briefly, rats received continuous access to 20% ethanol on a 12-hour reversed light/dark cycle for 45 days. The first acquisition was at baseline, and the second MRI acquisition was after finishing the 20 sessions (45 days, P90) of ethanol intake.

We used deformation-based morphometry to create Jacobian maps per subject and time point using a Two Level DBM tool using a Fisher rat atlas template and parcellation, with mixed model GLM, we compared the within-subjects effect of baseline versus 20 sessions of intermittent alcohol. The main alcohol intake (g/Kg/24h) was 1.90 ± 2.08 (mean/sd). For the group x session interaction. we found local volume changes after 20 sessions of voluntary alcohol consumption in rats, thalamus, cerebral cortex showed reduction while Dentate Gyrus and Caudate-Putamen showed an increase. In order to find the brain morphological phenotype associated with alcohol consumption, two classes were created (high consumption / low consumption). Finally, a Bayesian logistic regression model was used to determine the brain morphology associated with alcohol consumption. These changes may arguably be neuroadaptive structural changes related to chronic alcohol use, however, the results are not corrected for multiple comparisons.

Contenido

pág.

Capítulo 1

Introducción ----- 11

Capítulo 2

Marco Teórico ----- 13

Justificación ----- 37

Pregunta de investigación ----- 38

Objetivos ----- 38

Hipótesis ----- 38

Capítulo 3

Método ----- 39

Capítulo 4

Análisis de datos ----- 43

Capítulo 5

Resultados ----- 46

Capítulo 6

Discusión ----- 55

Limitaciones ----- 57

Conclusión ----- 60

Material suplementario ----- 61

Referencias ----- 62

Contenido de Tablas y Figuras

Figuras

Figura 1. Etapas de la adicción asociados con el trastorno por consumo de sustancias.

Figura 2. Diseño experimental.

Figura 4. Preferencia del consumo de alcohol.

Figura 5. Deformaciones cerebrales locales.

Figura 6. Clasificación del consumo de alcohol.

Figura 7. Principales métricas de consumo de alcohol

Figura 8. Intervalos de credibilidad.

Tablas

Tabla 1. Ciclo de la adicción.

Tabla 2. Investigaciones sobre el consumo de alcohol.

Tabla 3. Características de los modelos piloto de alcohol.

Tabla 4. Resultados globales de los modelos piloto.

Tabla 5. Resultados globales del modelo de alcohol.

Tabla 6. Comparaciones globales del modelo de alcohol.

Tabla 7. Cambios cerebrales locales.

Tabla 8. Resultados globales del modelo de alcohol.

Abreviaturas

AA: Ratas Alko.
AD: Difusividad axial.
ADE: Efecto de privación de alcohol.
AIE: Modelo Intermitente de alcohol en adolescentes.
AMG: Amígdala.
AUD: Trastorno por consumo de Alcohol.
BAL: Niveles de alcohol en sangre.
BEC: Concentración de alcohol en sangre.
BNST: Núcleo Basal de la Estría Terminal.
CAA: Acceso Continuo al Alcohol.
CeA: Amígdala Central.
CF: Conectividad Funcional.
Cli: Núcleo lineal caudal.
CP: Caudado-Putamen.
CRF: Factor liberador de Corticotropina.
DBM: Deformación Basada en Morfometría.
DI: Índice de Discriminación.
DID: Modelos de alcohol en la oscuridad.
DKI: Imagen de Difusión Curtosis.
dIPFC: Corteza Prefrontal dorsolateral.
DSM: Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales.
DTI: Imagen de Tensor de Difusión.
ENCODAT: Encuesta Nacional de Alcohol y Tabaco.
EtOH: Etanol.
FA: Factor de anisotropía.
fda: Función de Distribución Acumulada.
GFAP: Proteína ácida fibrilar glial.
GLM: Modelo Lineal General.
HE: Hematoxilina-eosina.
Hippo: Hipocampo.
IA2BC: Modelo de Acceso Intermitente de Alcohol a dos Botellas.
IDPs: Fenotipo Derivado de Imagen.
Ins: Ínsula.
MD: Difusión Media.
MK: Curtosis media.
MRI: Resonancia Magnética Funcional.
NAc: Núcleo accumbens.
NMDA: N-Metil D Aspartato.
NOR: Reconocimiento de objeto novedoso.
OFC: Corteza Orbitofrontal.
SUD: Trastornos de uso por sustancias.
Thal: Tálamo.
vmPFC: Corteza Prefrontal ventromedial.
VTA: Área Ventral Tegmental.

Capítulo 1

Introducción

La Encuesta Nacional de Consumo de Drogas Alcohol y Tabaco (ENCODAT) menciona el consumo de drogas como un problema a nivel mundial, así como un desafío para entender lo que antecede al consumo, abuso y dependencia de sustancias. En México, el consumo de alcohol reportó un aumento en las prevalencias respecto con las dos últimas encuestas. En población general de 18 a los 65 años, la prevalencia de “*consumo de alguna vez en la vida*” fue de 64.9% en el 2002 e incrementó a 71.3%, en el 2011, así mismo, también se observó un incremento de 5.1% en la prevalencia de “*consumo de alcohol durante el último año*” (INPREM, 2017), esto indica que el consumo de alcohol es un problema de salud pública que ha ido creciendo en los últimos años, afectando a diferentes grupos de poblaciones.

La investigación en el consumo de sustancias muestra que las drogas de abuso ejercen efectos reforzantes al inicio de este, ya que activan circuitos de recompensa en el cerebro durante su consumo voluntario, de la misma manera se ha observado que su uso repetitivo tiene un impacto en la función cerebral afectando principalmente la capacidad de ejercer autocontrol sobre la conducta de consumo y provocando que el cerebro sea más sensible a estrés y estados de ánimo negativos. Por consiguiente, se ha propuesto que vulnerabilidades genéticas, el estrés crónico, la presencia de enfermedades psiquiátricas, así como el abuso de drogas durante la adolescencia, incrementan la probabilidad de desarrollar trastorno por consumo de sustancias (Volkow & Morales, 2015).

Dentro del estudio de los trastornos por consumo de sustancias, el trastorno por consumo de alcohol (AUD por sus siglas en inglés), presenta altas prevalencias a nivel Nacional e internacional, siendo este un trastorno neuropsiquiátrico complejo, el cual se caracteriza por alteraciones conductuales, neurobiológicas y de aspectos psicosociales, sin embargo, no todos los usuarios consumidores de alcohol desarrollan AUD, esto sugiere que podría haber factores genéticos y/o ambientales que pueden predisponer su consumo (Noronha et al., 2014).

En consecuencia, los estudios sobre el abuso de alcohol se han enfocado en entender las bases neurobiológicas y la progresión patológica de su consumo en humanos y en modelos animales (Gilpin & Koob, 2008), no obstante, las investigaciones en humanos no permiten estudiar la progresión crónica del consumo de alcohol, por esta razón el uso de modelos animales nos brindan ventajas al estudiar trastornos neuropsiquiátricos como AUD, a pesar de ello, modelar este trastorno en animales representa un gran desafío, debido a que requieren de una definición precisa de los componentes del trastorno por consumo de alcohol (Goltseker et al., 2019).

La presente investigación pretende encontrar marcadores cerebrales asociados al consumo de alcohol en un modelo de alcoholismo en rata Wistar, usando la imagen por resonancia magnética e implementar basados en una perspectiva Bayesiana con la finalidad de asociar fenotipo morfológico cerebral con un alto consumo de alcohol.

Capítulo 2

Marco Teórico

Trastornos por consumo de sustancias

Los trastornos por consumo de sustancias (SUD, por sus siglas en inglés) son referidos en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-V) como una variedad de alteraciones producidas por el consumo de sustancias o drogas de abuso, en las que se incluye el alcohol, la marihuana, la cocaína, el tabaco, entre otras (American Psychiatric Association, 2013). Estos trastornos presentan síntomas fisiológicos, entre los que se encuentran: náuseas, vómitos, temblores, etc. y el individuo continúa consumiendo la sustancia a pesar de experimentar estas consecuencias negativas. En muchos casos existe una comorbilidad entre los trastornos por el uso de sustancias y los trastornos psiquiátricos o de personalidad (Lo Coco et al., 2019), lo cual dificulta su estudio.

Las definiciones asociadas al consumo de sustancias son un tema controversial, debido a que se abordan conceptualmente de diferentes maneras, en la literatura, se usan los siguientes términos: trastorno por consumo de sustancias, adicción o dependencia a sustancias. Esto ha generado poca contundencia en los resultados (Gipson et al., 2014), por ende, algunos autores han propuesto usar el término “adicción” como sinónimo de los trastornos por consumo de sustancias (SUD, por sus siglas en inglés).

La adicción a las drogas puede definirse como un trastorno con recaídas crónicas, caracterizado por la compulsión de buscar y consumir la droga, así como aparición de un estado emocional negativo como es disforia, ansiedad e irritabilidad (Koob et al., 2016). Desde una perspectiva del diagnóstico clínico, el término adicción ahora está abarcado por el término trastornos por uso de sustancias, además, el uso ocasional, uso a largo plazo, son valorados en la definición de SUD en grado leve, moderado y grave (Pando-Naude et al., 2021; Volkow et al., 2019).

En la actualidad, se han propuesto modelos teóricos basados en el consumo de sustancias, desde el punto de vista neurobiológico y se han complementado con diferentes circuitos de neurotransmisores (Uhl et al., 2019; Volkow et al., 2019), los cuales se abordarán posteriormente desde la perspectiva del consumo de alcohol.

Trastorno por consumo de alcohol

El trastorno por consumo de alcohol (AUD, por sus siglas en inglés) es una enfermedad cerebral recurrente y crónica, la cual presenta una incapacidad para detener o controlar el consumo de alcohol a pesar de las consecuencias adversas a nivel salud, social y laboral (Uhl et al., 2019). El AUD se puede valorar de leve, moderado y grave, dependiendo de la presencia y severidad de los síntomas. El AUD es caracterizado por: (i) Búsqueda compulsiva y el consumo de alcohol, (ii) Pérdida de control durante la ingesta durante la ingesta de alcohol y (iii) Presencia de estados emocionales negativos (disforia, ansiedad o irritabilidad) (Noronha et al., 2014), adicionalmente se presentan estados de ansia (craving) y síndrome de abstinencia (Goltseker et al., 2019; Koob & Le Moal, 2001).

La cuarta edición del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-IV), describió dos trastornos relacionados con el consumo de alcohol: el abuso de alcohol y la dependencia al alcohol, con criterios específicos (American Psychological Association, 2002). Por su parte, el DSM-V integra el abuso y la dependencia de alcohol en un solo trastorno denominado trastorno por consumo de alcohol (American Psychiatric Association, 2013). A continuación, se presentan los criterios que se utilizan para diagnosticar el trastorno por consumo de alcohol en humanos:

A) Un modelo problemático de consumo de alcohol que provoca un deterioro o malestar clínicamente significativo y que se manifiesta al menos por dos de los hechos siguientes en un plazo de 12 meses:

- 1 Se consume alcohol con frecuencia en cantidades superiores (5 copas o más para hombres y 4 copas o más para mujeres).
- 2 Existe un deseo persistente o esfuerzos fracasados de abandonar o controlar el consumo de alcohol.
- 3 Se invierte mucho 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.

5 Consumo recurrente de alcohol que lleva al incumplimiento de los deberes fundamentales en el trabajo, la escuela o el hogar.

6 Consumo continuado de alcohol a pesar de sufrir problemas sociales (violencia o incumplimiento de responsabilidades laborales) o interpersonales persistentes o recurrentes, provocados o exacerbados por los efectos del alcohol.

7 El consumo de alcohol provoca el abandono o la reducción de importantes actividades sociales, profesionales o de ocio.

8 Consumo recurrente de alcohol en situaciones en las que provoca un riesgo físico.

9 Se continúa con el consumo de alcohol a pesar de saber que se sufre un problema físico o psicológico persistente o recurrente probablemente causado o exacerbado por el alcohol.

10 Tolerancia, definida por alguno de los siguientes hechos:

10.a Una necesidad de consumir cantidades cada vez mayores de alcohol para conseguir la intoxicación o el efecto deseado.

10.b Un efecto notablemente reducido tras el consumo continuado de la misma cantidad de alcohol.

11 Abstinencia, manifestada por alguno de los siguientes hechos:

11.a Presencia del síndrome de abstinencia característico del alcohol.

11.b Se consume alcohol (o alguna sustancia muy similar, como un benzodiazepina) para aliviar o evitar los síntomas de abstinencia.

Mecanismo de acción del alcohol

El consumo de alcohol tiene efectos fisiológicos y conductuales en función de la dosis consumida, en bajas dosis se presenta ansiólisis, relajación muscular, analgesia y sedación, mientras que en dosis altas se produce un estado de intoxicación en el que hay presencia de euforia, aumento de anestesia y se puede experimentar una alteración temporal de la coordinación, el juicio y la memoria (Banerjee, 2014; Noronha et al., 2014). El alcohol etílico o etanol ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$) es tóxico para los tejidos corporales, produce alteraciones en diversos sistemas como, el sistema cardiovascular, el digestivo, el musculoesquelético, en el sistema nervioso central (SNC), etc. En este último, el etanol genera una depresión profunda

de las funciones neuronales, disminuyendo el metabolismo de la glucosa en todo el cerebro humano (Erdozain & Callado, 2014).

Neurotransmisores

Detrás de los cambios cerebrales y neuroadaptaciones producto del alcohol, se encuentran los circuitos de recompensa y estrés del cerebro. Un circuito neuronal se compone de una serie de neuronas que se envían señales electroquímicas entre sí. Una neurona activada envía moléculas de señalización llamadas neurotransmisores a través del circuito neural que se unen a moléculas específicas llamadas receptores (Manzo-Avalos & Saavedra-Molina, 2010). Dependiendo del circuito involucrado, la unión de estos neurotransmisores puede hacer que las señales excitadoras o inhibitoras pasen más a lo largo del circuito. El alcohol afecta varios sistemas de neurotransmisores, entre las más relevantes se encuentran: el dopaminérgico, serotoninérgico, GABAérgico y del glutamato (Banerjee et al., 2014; Noronha et al., 2014)

GABA

GABA es el principal neurotransmisor inhibitor en el cerebro. Se conocen dos subtipos de receptores a GABA, llamados GABA_A y GABA_B. El alcohol aumenta la actividad de GABAérgica en el cerebro mediante dos mecanismos, (i) puede actuar sobre la neurona liberadora de GABA (a nivel, presináptico) causando un aumento en la liberación de GABA; (2) puede actuar sobre la neurona receptora de señales (a nivel, postsináptico) que facilita la actividad del receptor GABA_A. Asimismo, se ha encontrado que durante la exposición aguda y/o crónica al alcohol se da un incremento de la actividad GABA en el cerebro (Noronha et al., 2014). El consumo de alcohol es suprimido por compuestos que interfieren con las acciones del receptor GABA_A (es decir, los antagonistas del receptor GABA_A), así como compuestos que estimulan la Receptor GABA_B (agonistas GABA_B) en el núcleo accumbens, pallidum ventral, núcleo del lecho de la estría terminalis y amígdala (Wilkie et al ., 2007).

Glutamato

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del cerebro, ejerce sus efectos a través de varios tipos de receptores ionotrópicos (activados por ligando i.e., NMDA, AMPA y Kainato)

y metabotrópicos (ocho receptores de mGluR) (Rojas & Neri, 2017) En contraposición del GABA, el alcohol inhibe la actividad de glutamato en el cerebro, esto ocurre porque durante la exposición aguda al alcohol se genera una caída de los niveles extracelulares de glutamato, principalmente en el estriado (NAc) (Sanna et al., 2004) La transmisión de señales mediada por glutamato se suprime en el núcleo central de la amígdala después de la administración aguda y es un efecto que aumenta después de la exposición crónica al alcohol. (Roberto et al., 2012). Los sistemas de glutamato participan en el reforzamiento agudo del alcohol, esto es comprobado ya que se puede imitar el efecto con antagonistas del receptor de NMDA (3), asimismo los receptores NMDA involucrados en el alcoholismo participan en la reorganización neuronal que probablemente contribuye a la hiperexcitabilidad y el deseo durante la abstinencia del alcohol. [29]

Dopamina

La dopamina es un neurotransmisor, se clasifica como catecolamina (una clase de molécula que sirven como neurotransmisor y/o hormona). Se conocen cinco receptores dopaminérgicos: D1 (relacionado con un efecto activador del adenilato ciclasa), D2 (relacionado con un efecto inhibidor del adenilato ciclasa), D3, D4 y D5, principalmente los receptores D1 y D2 se encuentra involucrado en mecanismo de recompensa en el cerebro y por lo tanto influye el desarrollo y recaída de la dependencia al alcohol (Banerjee, 2014)

La neurotransmisión de dopamina está involucrada en la regulación de los paradigmas de autoadministración de fármacos de refuerzo en modelos murinos. La proyección de dopamina desde el Área Ventral Tegmental (VTA) hasta el núcleo accumbens (NAc) ha sido identificada como un sustrato crítico para la expresión del refuerzo farmacológico, a su vez la neurotransmisión de la dopamina se relaciona con la motivación de incentivos medioambientales en periodos de intoxicación aguda y en la anticipación de disponibilidad del alcohol. Sin embargo, las lesiones del sistema mesolímbico no eliminan por completo el reforzamiento al consumo del alcohol, lo que indica que la dopamina es un componente importante, pero no esencial, en el reforzamiento (Gilpin & Koob, 2008). Finalmente, también se ha encontrado que durante periodos de abstinencia al alcohol se produce una disminución de dopamina en el NAc, esta disminución contribuye a los síntomas negativos en la abstinencia y la recaída de alcohol (Melis et al., 2005; Volkow et al., 2007).

Serotonina

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) es un neurotransmisor que se produce en las neuronas en los núcleos del rafe, a la fecha, actualmente, no existe un receptor único a serotonina, se han descrito familia de receptores (5HT₁, 5HT₂) y otros receptores (i.e, 5HT₃, 5HT₄, 5HT₅, 5HT₆, 5HT₇) con funciones específicas en las áreas pre y postsinápticas (Banerjee et al., 2014). En aspectos generales, La serotonina (5-HT) contribuye a un estado de ánimo positivo durante la intoxicación, es decir, la transmisión de 5-HT aumenta después de la administración aguda de alcohol, mientras que hay una disminución de ésta en períodos de abstinencia y en recaídas, en específico la activación de los receptores 5-HT_{2C} o 5-HT_{1A} y la inhibición de 5-HT₃, en hipocampo, amígdala y corteza, se han relacionado con una disminución en el consumo de alcohol (Costardi et al., 2015), por lo cual, se considera que la función y la localización de diferentes tipos de receptores de serotonina participan en la modulación del consumo del alcohol.

Farmacocinética

Los efectos del alcohol en varios tejidos dependen de su concentración en la sangre, una vez que el etanol es consumido de forma oral, es absorbido fácilmente por el tracto gastrointestinal; la absorción tiene lugar por difusión pasiva a través de la pared del estómago (~20%), el ritmo de absorción se acelera proporcionalmente al aumento de la concentración alcohol ingerido, siendo el 80% restante absorbido a través del duodeno y la pared del intestino delgado (Norberg et al., 2003). La absorción del alcohol ocurre principalmente en el intestino delgado, el ritmo de absorción se acelera proporcionalmente al aumento de la concentración alcohol ingerido. Una vez absorbido se distribuye por todo el organismo, su metabolismo principalmente se realiza en el hígado. La eliminación del etanol absorbido se produce principalmente a través del metabolismo (95-98%), y pequeñas fracciones de la dosis administrada se excretan sin cambios en el aliento (0,7%), el sudor (0,1%) y la orina (0,3%) (Holford et al., 1987). Este proceso, se retomará en el apartado de mecanismos de daño (Manzo-Avalos & Saavedra-Molina, 2010).

Farmacodinamia

El etanol es un fármaco depresor no selectivo del Sistema Nervioso Central, el cual potencia los efectos inhibitorios del ácido gamma aminobutírico (GABA) en el Sistema Nervioso Central e inhibe al receptor NMDA de aspartato-glutamato y reduce por lo tanto la actividad glutamatérgica, las interacciones con otros neurotransmisores como serotonina y dopamina, mismos que se describen a continuación. En cuanto a las acciones farmacológicas, el etanol produce un fenómeno de inhibición de inhibiciones con euforia, elevación del tono vital, mejoría superficial de la asociación de ideas, disminución del autocontrol y de la autocrítica, reducción de la visión, incoordinación muscular y alteraciones de los reflejos, disminución de la sensación de fatiga, disminución del umbral convulsivo. (Manzo-Avalos & Saavedra-Molina, 2010).

Mecanismos de daño

Para hablar de los mecanismos de daño del alcohol, es importante recordar que la mitocondria es un orgánulo contenido en una membrada, este orgánulo se encarga de la producción del suministro celular conocido como Adenosin Trifosfato (ATP), el cual se utiliza como fuente de energía. El alcohol es metabolizado a acetaldehído por la enzima citosólica alcohol deshidrogenasa (ADH), posteriormente, el aldehído deshidrogenasa 2 mitocondrial (ALDH2) convierte el acetaldehído en acetato. Cuando esta enzima no funciona correctamente, el acetaldehído aumenta y daña los complejos de transporte de electrones (i.e., compelo I- IV), lo que conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), afectando la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa lo cual perturba la síntesis de ATP. Adicionalmente, el estrés oxidativo afecta la permeabilidad de las membranas mitocondriales externa / interna promoviendo la apertura del poro de transición de permeabilidad (PTP), cuando la transición de la permeabilidad mitocondrial es extensa, promueve la inflamación mitocondrial y permite la liberación del citocromo (Cyt c), la activación de la caspasa y la fragmentación del ADN, lo que conduce a la muerte celular programada o apoptosis, existe evidencia considerable de que la exposición crónica al alcohol aumenta la susceptibilidad de las células a sufrir apoptosis para ello, es importante comprender el papel de las mitocondrias durante el consumo de alcohol y el metabolismo en el consumo crónico de alcohol. (Manzo-Avalos & Saavedra-Molina, 2010). Por ello, se ha planteado la hipótesis de que, tras la ingesta

crónica de alcohol, el cerebro comienza a utilizar acetato en lugar de glucosa como fuente de energía (Agarwal, 2001), y el acetaldehído acumulado ejerce sus efectos tóxicos al inhibir las reacciones y funciones mitocondriales.

Actualmente los análisis post-mortem (i.e., histología) nos permiten identificar daños celulares asociados a alteraciones genéticas, trastornos neuropsiquiátricos y/o daño resultante de las neurotoxinas (Lerch et al., 2010), en esta última, la consideración de la neurotoxicidad alcohólica plantea la cuestión: ¿Los daños cerebrales observados posterior al consumo de alcohol son debidos al alcohol en si, como neurotoxina o particulares de las deficiencias metabólicas que se generan? (Noronha et al., 2014).

La comprensión de la neurobiología de la adicción se ha estudiado a través del estudio de modelos animales y, recientemente con la implementación de estudios de imágenes cerebrales en personas con adicción (Shippenberg et al., 2002). Aunque ningún modelo animal de adicción emula completamente la condición humana, estos modelos nos permiten el entendimiento de signos y síntomas asociados con la condición psicopatológica (Volkow et al., 2016). El enfoque de la neurobiología de la adicción tiene énfasis en los mecanismos de recompensa aguda, hábitos compulsivos, déficits en la recompensa, estrés y efectos negativos durante la etapa de abstinencia (Uhl et al., 2019).

Recientemente se ha hipotetizado que el SUD está compuesto de un ciclo de tres etapas o fases (Volkow et al., 2016; Volkow et al., 2019) las cuales se pueden abordar humanos y pueden compararse en modelos animales. No obstante, nos acotaremos a hablar de las fases del ciclo de la adicción desde el consumo de alcohol (Noronha et al., 2014), véase en Figura 1., y en complemento a su descripción, se integra el papel de algunos neurotransmisores, los cuales se han propuesto como serie de circuitos cerebrales asociados al consumo de sustancias. En la Tabla 1 se muestran las áreas cerebrales relacionadas con el ciclo de la adicción, los neurotransmisores y moduladores (Koob & Volkow, 2016).

A Intoxicación / atracón

La etapa de Intoxicación / atracón se asocia con los efectos reforzantes de la droga, incrementando la liberación de neurotransmisores, principalmente dopamina y péptidos opioides en el núcleo accumbens (NAc), el estriado dorsal y ventral referencia. En esta misma

etapa, el factor liberador de corticotropina (CRF) y las dinorfinas activan el Área Ventral Tegmental (VTA), el NAc y la corteza prefrontal para iniciar la activación de los sistemas de estrés a nivel cerebral (Koob & Le Moal, 1997; Wise, 2009).

En la etapa de intoxicación / atracón, se fortalecen las señales de reforzamiento entre la exposición a la droga y la activación de los receptores D1, principalmente en el NAc, creando una fuerte motivación para la obtención de la recompensa (circuitos 1-4), la activación del estriado ventral que conduce al reclutamiento de vías tálamo-corticales, lo que se asocia con la habituación de la respuesta y se hipotetiza que desencadena lo que se supone que subyace a la respuesta compulsiva a las drogas (circuitos 3 y 4) (Volkow et al., 2016),

B Abstinencia / efectos negativos

La abstinencia se asocia con estados emocionales negativos y con la activación de sistemas de estrés en la amígdala y el NAc, proyectando al hipotálamo y al tronco encefálico, adicionalmente los núcleos de la amígdala liberan CRF, norepinefrina y dinorfinas asociados al reforzamiento negativo, en otras palabras, se mantiene el consumo de alcohol, para reducir los efectos negativos (Baker et al., 2004; G. Koob & Le Moal, 2001).

Por otro lado, en la etapa de abstinencia/efectos negativos, la disminución en la activación del sistema de recompensa influye en cambios bioquímicos a largo plazo que contribuyen al síndrome clínico de abstinencia aguda y abstinencia prolongada (circuito 5). Los circuitos 6-8 se asocian al desarrollo de estados emocionales negativos durante la abstinencia aguda y la abstinencia prolongada, los cuales activan sistemas de estrés en el cerebro como CRF, noradrenérgico y opioide (dinorfinas) en la amígdala extendida. Existe la hipótesis de que otro circuito que involucra a la habénula lateral, modula los estados aversivos mediante una disminución de la actividad dopaminérgica en el VTA (circuito 9) (Hikosaka, 2010) . Existen una serie de neurotransmisores que actúan en oposición a los sistemas de estrés cerebral, los cuales incluyen al neuropéptido Y, la nociceptina y los endocannabinoides, los cuales se han relacionado con la vulnerabilidad del desarrollo de la adicción (circuitos 10 y 11).

C Preocupación / anticipación

En la fase de preocupación / anticipación se integran diferentes funciones, el reforzador condicionado en la amígdala basolateral, el procesamiento contextual en el hipocampo y la medición del control ejecutivo (representación de contingencias y consecuencias), así como la

valoración de estados subjetivos como las ansias en la corteza prefrontal, en esta etapa también se ha observado un incremento en la percepción de los estados interno negativos del cuerpo (interocepción) asociados con la ínsula, los cuales están probablemente relacionados con las recaídas. Por otra parte, el glutamato se ha involucrado en estados de ansia ubicado en regiones frontales y en la amígdala basolateral las cuales proyectan al estriado ventral, por último, la presencia de CRF y de dinorfinas en la corteza cerebral explican los déficits cognitivos asociados al consumo de alcohol entre los que se encuentran, alteraciones en el proceso de memoria y de funciones ejecutivas (Noronha et al., 2014; Tiffany et al., 2000).

Por último, en la etapa de preocupación/ anticipación se sugiere que la corteza prefrontal juega un papel en la regulación de saliencia de incentivos y en la conducta condicionada debido a las conexiones que presenta con el núcleo caudado y el estriado ventral (circuito 12 y 13). Los circuitos 14 y 15 se encuentran asociados con la reincidencia del consumo de la droga, en donde se involucran proyecciones glutamatérgicas de la corteza prefrontal hacia el NAc, posteriormente, se reactivan los mecanismos de respuesta al estrés inducidos por los sistemas noradrenérgicos y CRF en el núcleo central de la amígdala y en el BNST correspondiendo a los circuitos 16 y 17, en el último circuito se observa una relación entre la función interoceptiva de la ínsula con las ansias, ya que integra información del sistema autónomo y visceral implicados en la emoción, la motivación y la toma de decisiones (circuito 18) (Koob & Volkow, 2016).

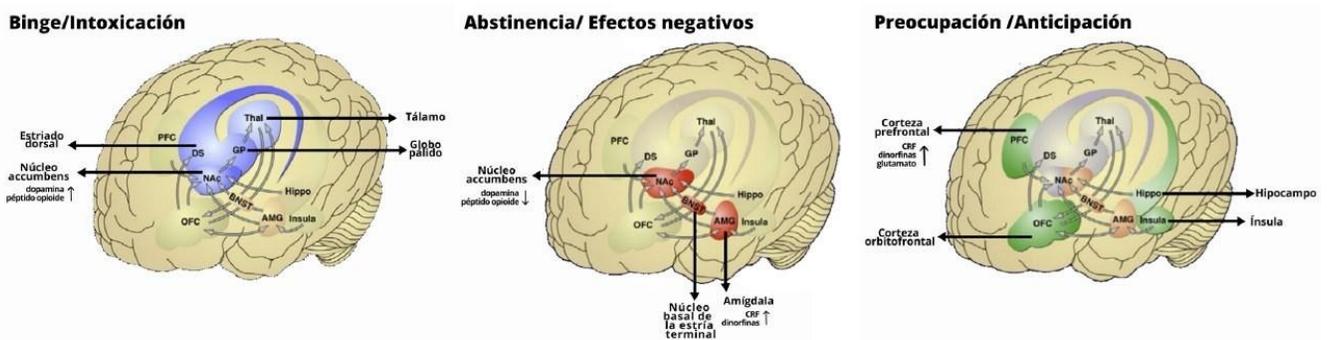


Figura 1. Etapas de la adicción asociados con el trastorno por consumo de sustancias. Corteza prefrontal: CP, estriado dorsal: DS, núcleo accumbens: NAc, corteza orbitofrontal: OFC, tálamo: Thal, globo pálido: GP, núcleo basal de la estría terminal: BNST, amígdala: AMG, hipocampo: Hippo. Imagen adaptada de *Neurobiology of alcohol dependence* (p.25), por Antonio Noronha, 2014, Elsevier.

| Etapa | Área | Homólogo en rata | Circuitos | Neurotransmisor | Función |
|-----------------------------------|---|----------------------------|--|--|--|
| Intoxicación/ atracción | Estriado dorsal (DS) | CPu (caudado-putamen) | Circuito 3 Circuito 4 | ↑Dopamina ↑Glutamato | Respuesta habituada |
| | Globo pálido (GP) | GP* | | | |
| | Tálamo | Tálamo* | | | |
| | Área Ventral Tegmental (VTA) | VTA | Circuito 1 Circuito 2 | ↑Glutamato ↑GABA | |
| Abstinencia/ efectos negativos | Núcleo Accumbens | NAC* | Circuito 8 | ↑Dinorfinas | Incentivo a la acción |
| | Núcleo basal de la estría terminal (BNST) | BNST* | Circuito 7 | ↑Noradrenalina | Estrés |
| | Núcleo central de la amígdala (CeA) | CeA | Circuito 6 Circuito 10 Circuito 11 | ↑CRF ↓Neuropéptido Y ↓Endocannabinoide | Estados afectivos |
| | Área Ventral Tegmental (VTA) | VTA | Circuito 5 | ↑CRF | |
| | Habénula | Núcleo habenuar lateral | Circuito 9 | ?Acetilcolina | |
| Preocupación/ Anticipación | Corteza del Cíngulo Anterior (ACC) | ACC | | | Valor de estímulo acción / costo |
| | Corteza Prefrontal dorsolateral (dIPFC) | Corteza prelímbica (PL)* | Circuito 12 Circuito 13 | ↑Glutamato ↑GABA | Anticipación/ contexto de disponibilidad |
| | Corteza Prefrontal ventromedial (vmPFC) | Corteza infralímbica (IL)* | | | Inhibición de la acción y control de la emoción |
| | Corteza Orbitofrontal (OFC) | OFC * | | | Valoración de resultados y valor subjetivo del fármaco |
| | Hipocampo (HPC) | Hipocampo:CA1, GD* | Circuito 14 | ↑Glutamato | Contexto externo |
| | Ínsula (Ins) | Ínsula | Circuito 18 | ↑CRF | Contexto interno |
| | Amígdala basolateral | Amígdala | Circuito 15 | ↑Glutamato | |
| | Núcleo basal de la estría terminal (BNST) | BNST* | Circuito 16 Circuito 17 | ↑CRF ? Noradrenalina | |

Tabla 1. Ciclo de la adicción.

Compilación de las tres etapas del ciclo de la adicción, con los principales neurotransmisores asociados, áreas cerebrales en humanos y su homólogo en ratas.

* Áreas homólogas que se encuentran en el atlas de Fisher, <https://www.nearlab.xyz/fischer344atlas>.

Modelos de alcohol

Los modelos en murinos se utilizan hoy en día para el estudio de trastornos médicos y/o psiquiátricos, permiten al experimentador tener un mejor control sobre los experimentos y reducir variables extrañas (comorbilidades, medicación, contexto social, etc.), al mismo tiempo que nos permite investigar fenómenos desde un punto de vista conductual, neuroquímico y neurofisiológico. Estas ventajas facilitan el estudio de trastornos neuropsiquiátricos como el trastorno por consumo de alcohol (Cicero, 1979; Kuhn et al., 2019).

Mediante el uso de modelos animales se han podido definir el consumo compulsivo de alcohol de diversas maneras: el consumo frente al castigo, consumo a mayor carga de trabajo (programa de reforzamientos) y modelos de resistencia a la extinción asociado a modelos de tolerancia. En algunos modelos se emplean otros mecanismos para inducir un consumo compulsivo de alcohol, como el uso de endulzantes (Ji et al., 2008), modelos basados en el acceso intermitente de alcohol durante el ciclo oscuridad (Simms et al., 2008) y otros que generan dependencia al alcohol como inhalación de vapor de alcohol (Gilpin & Koob, 2008; Vendruscolo & Roberts, 2014), infusión intragástrica o dieta líquida de alcohol (Fidler et al., 2012) . En la literatura se han descrito diversos modelos pre-clínicos para evaluar el AUD en roedores (Crabbe, 2016; Hopf & Lesscher, 2014; Simms et al., 2008; Wolffgramm & Heyne, 1991), se ha observado que los roedores consumen más alcohol voluntariamente en modelos de acceso intermitente de alcohol (IAA) o privaciones repetidas de alcohol versus con los modelos de acceso continuo al alcohol (CAA) (Cippitelli et al., 2012; Sabino et al., 2013) . El modelo de acceso intermitente de alcohol es uno de los modelos más usados en la literatura, para generar consumo crónico de alcohol, el cual es descrito a continuación.

Modelo de Acceso Intermitente de alcohol

El modelo de consumo intermitente de alcohol a 2 botellas de elección (IA2BC, por sus siglas en inglés), fue establecido por Wise, en este modelo, las ratas tienen acceso al alcohol durante tres sesiones de 24 horas por semana (lunes, miércoles y viernes), a cada rata se le proporciona una botella de etanol al 20% V/V y una botella de H₂O (Wise, 1973).

Después de 24 horas, la botella de etanol es remplazada por dos botellas de H₂O (martes, jueves y sábado), el domingo, las ratas tienen acceso *ad libitum* de agua en dos botellas (Simms et al., 2008). Se ha demostrado que en el modelo IA2BC en condiciones de consumo nocturno, las ratas muestran un mayor patrón de consumo, lo cual sigue una excelente combinación para investigar el consumo de alcohol (Holgate et al., 2017), por lo cual, nosotros hemos decidido implementar este modelo para el presente estudio, los procedimientos detallados de este, se encuentra en el apartado de método.

Vulnerabilidades de AUD y pruebas conductuales

Diversas investigaciones se enfocan en encontrar la vulnerabilidad del trastorno por consumo de alcohol mediante estudios genéticos, moleculares, farmacológicos y ambientales asociados con sistemas neuronales. En AUD, se han planteado diversos factores que pueden predisponer al desarrollo de dicho trastorno, principalmente la ingesta de alcohol y la ansiedad, por ejemplo, consumidores de bajos niveles de alcohol presentan menos alteraciones cerebrales versus consumidores altos (Wscieklica et al., 2019), así mismo, se ha observado que la ansiedad preexistente es más susceptible a consumir alcohol (Jadhav et al., 2017). En la actualidad no se conoce con certeza si estos rasgos predicen la vulnerabilidad de AUD o si son cambios inducidos por el consumo prolongado de alcohol (Belin-Rauscent et al., 2016) .

En humanos, el consumo de alcohol a largo plazo induce adaptaciones neuronales asociadas con la pérdida de control, el consumo compulsivo y estados emocionales negativos (Koob, 2011; Koob & Volkow, 2016), es aquí donde la caracterización de la condición clínica de AUD se ha vuelto todo un reto para su estudio, para ello se han propuesto una serie de procedimientos que buscan modelar de mejor manera el consumo de alcohol al intentar caracterizarlos. Se han desarrollado diversos procedimientos para modelar rasgos del consumo de alcohol en roedores (Skóra et al., 2020) , por ejemplo, la creación de diferentes cepas de ratas y ratones con predisposición genética al consumo de alcohol, han ayudado a dilucidar varios aspectos de la neurobiología del AUD (McBride et al., 2014), no obstante, otro abordaje se ha orientado hacia el estudio de modelos pre-clínicos que imitan más de cerca la complejidad de los comportamientos adictivos del alcohol en humanos, caracterizando múltiples aspectos que

definen AUD, entre los que se encuentran: búsqueda compulsiva de alcohol y la incapacidad de abstenerse de su uso a pesar de las consecuencias negativas, estos modelos proporcionan nuevas ideas sobre la vulnerabilidad individual en el comportamiento adictivo (Giuliano et al., 2018; Radke et al., 2017), y se basan en diversas medidas y/o parámetros de comportamiento, las cuales se describen a continuación.

En los modelos IA2BC y los modelos de alcohol en oscuridad (DID, por sus siglas en inglés) son los únicos dos modelos de consumo voluntario que pueden ocasionar niveles moderados o altos en el consumo de etanol en roedores (Holgate et al., 2017), de la misma manera, las investigaciones de Simms extendieron este trabajo encontrando que el modelo IA2BC podía usarse para lograr que las ratas consumieran 20% de alcohol en niveles altos (5~6 g/Kg/24h), también observó que aproximadamente el 30% de las ratas llegan a concentraciones de alcohol en sangre (BEC, por sus siglas en inglés) de alrededor de 90-100 mg/dL, lo que cumple con uno de los criterios del Instituto Nacional sobre Abuso de Alcohol y Alcoholismo (NIAAA, en Estados Unidos) para el consumo excesivo de alcohol en humanos (National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism, 2004).

Otra medida que se ha implementado para comprender los mecanismos psicológicos y la neurobiología del alcohol es la recaída, la cual es estudiada con modelos de alcohol debido a la complejidades que se presentan en estudios con humanos, en este modelo hay una re-exposición al alcohol que conlleva a un incremento temporal en el consumo posterior en comparación con el consumo inicial, a esta medida se le denomina ADE (Alcohol Deprivation Effect) siendo un modelo de recaída debido a su excelente validez aparente (Sinclair & Senter, 1967; Vengeliene et al., 2014).

Una forma de aproximarnos al estudio de las alteraciones cerebrales ocasionadas por el consumo de alcohol es mediante las técnicas de imagenología cerebral, como la resonancia magnética cerebral, la cual es una técnica que se describiremos a continuación.

Resonancia Magnética

La imagen por resonancia magnética (MRI) es una técnica que permite visualizar estructuras internas del cuerpo, aprovechando las propiedades físicas de los átomos, es una técnica no invasiva ya que utiliza energía no ionizante (Liang & Lauterbur, 2000) . La MRI está basada en las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos, en este caso del hidrógeno, utiliza pulsos de radiofrecuencia los cuales actúan sobre el campo magnético del resonador generando un efecto de precesión en los protones H^+ con el pulso de radiofrecuencia, los protones adquieren energía y con el tiempo se relajan hasta llegar a su estado de energía original. La diferencia en los tiempos de relajación es captada por una antena la cual permite construir una imagen bidimensional y/o tridimensional (Huettel et al., 2004). Así mismo, la MRI es una técnica que se ha implementado para el estudio de trastornos psiquiátricos (Liu et al., 2015), permite el estudio específico de regiones cerebrales y en modelos animales se puede emplear in vivo o ex vivo, proporcionando múltiples mecanismos de contraste para investigar diferentes aspectos de la neuroanatomía y la fisiología (Lerch et al., 2010).

Morfometría cerebral

Una de las aplicaciones de la imagen por resonancia magnética es el análisis cuantitativo, que permite fenotipificar las estructuras cerebrales, dicho análisis es conocido como morfometría cerebral, la cual es referida como el estudio de variaciones y/o cambios de formas en el cerebro. Las diferencias anatómicas entre dos cerebros se pueden expresar a escala microscópica (diferencias en citoarquitectura o mieloarquitectura), a escala mesoscópica (displasia cortical) o a nivel macroscópico (agrandamiento ventricular o asimetría anormal del lóbulo temporal), en neuroimagen, las diferencias entre el nivel mesoscópico y macroscópico son susceptibles a esta medición, actualmente se han desarrollado métodos de análisis cuantitativo; morfometría basada en vóxel, en forma y en deformación (Schröder & Faber, 2011), siendo esta última la que se implementa en este proyecto de investigación.

Deformación Basada en Morfometría

La Deformación Basada en Morfometría (DBM) es un método de morfometría que utiliza vectores de deformación, los cuales se obtienen del registro no lineal de las imágenes del cerebro, esto con la finalidad de buscar diferencias locales en el volumen o la estructura cerebral. DMB utiliza los siguientes pasos; normalización, registro no-lineal y análisis estadístico (Schröder & Faber, 2011; Zhao et al., 2018) . Esta técnica fue descrita por primera vez como una caracterización de las diferencias entre los campos vectoriales que permiten detectar diferencias globales o generales en la forma del cerebro, estos campos vectoriales son los campos utilizados en deformación para efectuar variantes no lineales que son aplicados a una plantilla que se ajusta a algún espacio anatómico estándar. La morfometría basada en la deformación es una caracterización de las diferencias en los campos vectoriales que describen diferencias globales o generales en la forma del cerebro, es decir, estos campos vectoriales son los campos de deformación utilizados para efectuar variantes no lineales de normalización espacial, cuando una de las imágenes es una plantilla que se ajusta a algún espacio anatómico estándar. La implementación de esta técnica es completamente reproducible, su validez se establece en términos de la estimación de los campos de deformación y las plantillas utilizadas en el análisis (Ashburner et al., 1998). Los estudios de resonancia magnética cerebral han encontrado alteraciones en trastornos por consumo de sustancias (Pando-Naude et al., 2021) y en algunas investigaciones se usa la morfometría basada en vóxel (VBM), donde se ha observado una disminución de la materia gris en la amígdala, la ínsula, en la corteza del cíngulo, la corteza orbitofrontal y el tálamo en AUD (Demirakca et al., 2011).

Existe una gran variabilidad entre la estructura y la función cerebral en los diversos trastornos neurológicos y psiquiátricos, la cual se puede medir de forma no invasiva mediante la adquisición de imágenes por resonancia magnética (Toga, 2015). Es por ello, que la resonancia magnética nos permite identificar endofenotipos o fenotipos derivados de imagen (IDPs, por sus siglas en inglés) , los cuales son marcadores neurobiológicos que se encuentran asociados de un gen o una enfermedad. Se han encontrado asociaciones entre las medidas de resonancia magnética y genes involucrados en el desarrollo del cerebro, plasticidad cerebral y en el transporte de nutrientes (Kendler et al, 2010). Los genes relacionados con el desarrollo cerebral y la plasticidad tienden a estar relacionados con trastornos de salud mental como depresión mayor y esquizofrenia, mientras que los genes de transporte de nutrientes tienden a estar

relacionados con trastornos neurodegenerativos (Elliott et al., 2018). No obstante, los endofenotipos muestran una estructura simple, ya que los diagnósticos de algunas enfermedades que se realizan con endofenotipos pueden ser poligénicos. En el caso SUD, es considerado un trastorno complejo el cual puede dividirse en un patrón longitudinal: experimentación con drogas → uso regular → uso dañino → transición al uso compulsivo → intentos de abandono → recaída, siendo un excelente modelo para encontrar los rasgos que reflejan los dominios disfuncionales para cada etapa del trastorno (Sanchez-Roige & Palmer, 2020) . A continuación, se presentan una serie de investigaciones relacionadas con diversos modelos de alcohol y sus hallazgos (Tabla 2).

| Estudio | Modelo de alcohol | Muestra Hembras (H) Machos (M) | Criterio de alcohol | Resultados | | |
|------------------------|--|---|---------------------------------|--|--|---|
| | | | | Conductuales | MRI | Técnica histológica |
| (West et al., 2018) | Modelo intragástrico | 27 ratas Long-Evans. Atracón (8 H y 7 M) Control (6 H y 6 M) | BEC | Memoria de trabajo, hubo un efecto principal en el porcentaje de alternancia reforzada en atracón, $F(1,191) = 31.24, p < .0001$ | Na | Estereología. Reducción volumen nuclear de neuronas en el mPFC. $Crtl > Atracón, p < .0001$ |
| (Zhao et al., 2018) | Administración de alcohol vía oral al 20%. | Ratas macho Wistar (n=25) | BAL | Na | Contracción no reversible en los núcleos pretecales y los colículos superiores e inferiores | Na |
| (Chen et al., 2017) | Modelo de intoxicación intragástrico. | Ratas macho Sprague-Dawley (n=35) 3 grupos de intoxicación aguda y un grupo control (n=5) | EtOH intoxicación | Na | Decremento de MK, FA y MD en ratas alcohólicas en lóbulo frontal y tálamo (30 min, 2 hrs, 6 hrs) | Neuronas con edema en ratas alcohólicas utilizando HE |
| (Holgate et al., 2017) | Modelo IA2BC (sacarina) y DID | Rata macho Wistar (n=32) en P35 | BEC | Mayor consumo de etanol en el modelo DID vs IA2BC, con una $p < 0.0001$ | Na | Na |
| (Jadhav et al., 2017) | Modelo de autoministración de alcohol vs sacarina al 10% | Rata Macho Wistar (n=59) en P49 | Criterios de DSM-V de AUD y BAL | Análisis factorial de 3 criterios conductuales: - Persistencia en la búsqueda | Na | Na |

| | | | | | | |
|-------------------------------------|--|---|--------------------|---|---|----|
| | | | | de drogas durante el período sin drogas: $r = 0.819$ - Motivación excesiva para la búsqueda de alcohol: $r = 0.818$ - Resistencia al castigo: $r = 0.641$. | | |
| <i>(Perez-Ramirez et al., 2017)</i> | IA2BC al 10% | Rata macho Marchigian Sardinian (msP) (n =18) | Consumo de alcohol | Na | Decremento en la CRF en el área retrosplenial visual y la red del estriado, en ratas alcohólicas y un incremento la CF entre las redes prefrontal-cingulada y estriatal | Na |
| <i>(Vetreno et al., 2017)</i> | AIE (20 %) | Ratas macho Wistar, 10 AIE y 10 control en P21. | BEC | Na | Incremento de volumen en corteza cerebral, estriado e hipotálamo y un decremento del cuerpo caloso, cerebelo e hipocampo | Na |
| <i>(Dudek & Hyttiä, 2016)</i> | Consumo voluntario de alcohol al 10 % y administración de Manganese chloride | Rata macho AA (n=58) Rata macho Wistar (n=8) | Consumo de alcohol | Na | Menor actividad en las ratas AA vs Wistar en CLi y ventral VTA con fMRI | Na |
| <i>(Vetreno et al., 2016)</i> | AIE intragástrico (20%) | Rata Wistar macho (n=32) | BEC | Na | AD mostró reducción en cerebelo, neocorteza e hipocampo, en controles vs AIE | Na |
| <i>Pfefferbaum et al., 2015)</i> | Modelo de administración intragástrica | Rata Wistar (n=22), modelo de alcohol (n=11) | BAL (250mg/dL) | Na | Disminución de FA en cuerpo caloso (rodilla) y fimbria-fórnix, durante el | Na |

| | | | | | | |
|----------------------|---|--|-----------------|---|--|----|
| | | | | | atracción y un incremento en MD en fimbria-fórnix | |
| (Dudek et al., 2015) | Consumo voluntario de alcohol al 10 % y administración cloruro de manganeso | Rata macho AA (n=42) | Consumo de EtOH | Na | Incremento en la actividad cerebral en las vías mesocorticolímbica y nigrostriatal para el grupo AA. | Na |
| (Simms et al., 2008) | IA2BC (10 % y 20 %) | Rata macho Long Evans (n=14) y Wistar (n=11) P (n=6) | BEC | IA2BC mostró alto consumo en Long-Evans, Wistar y P | Na | Na |

Tabla 2. Investigaciones sobre el consumo de alcohol.

Concentración de etanol en sangre (BEC), Curtosis media (MK), Conectividad Funcional (CF), Difusividad axial (AD), Difusión Media (MD), Factor de anisotropía (FA), Hematoxilina-eosina (HE), Índice de discriminación (DI), Imagen de curtosis de difusión (DKI), Imagen de tensor de difusión (DTI), Laberinto elevado en cruz (EPM), Modelo intermitente de alcohol a 2 botellas (IA2BC), Modelo intermitente de etanol en adolescentes (AIE), Núcleo lineal caudal (Cli), Niveles de alcohol en sangre (BAL), No aplica (NAN), Proteína ácida fibrilar glial (GFAP), Reconocimiento de objeto novedoso (NOR), Ratas Alko (AA), Ratas con preferencia al alcohol (P) y Área Ventral Tegmental (VTA), no aplica (Na).

En los estudios de neuroimagen en participantes con dependencia al alcohol se ha encontrado regiones y tejidos cerebrales específicos afectados por la exposición crónica al alcohol, los cuales son cuantificados volumétricamente, esto incluye déficits en materia gris y materia blanca (Claus et al., 2011; Pando-Naude et al., 2021), en los cuales se ha controlado las deficiencias nutricionales o trastornos hepáticos. Por su parte, en estudios describen algunas alteraciones cerebrales y de conducta relacionados con el consumo de alcohol en modelo animal de rata, algunas regiones cerebrales alteradas, se encuentran descritas en el ciclo de la adicción, el cual se describió con anterioridad entre las que sobresalen: Corteza prefrontal (Cárdenas et al., 2005; Vetreno et al., 2016; West et al., 2018; Zhao et al., 2018), tálamo (Chen et al., 2017; Zhao et al., 2018) e hipocampo (Vetreno et al., 2016; Vetreno et al., 2017; Volkow et al., 2009), todas estas áreas cerebrales se encuentran referencias con el ciclo de la adicción expuesto anteriormente, a pesar de ello, en las últimas investigaciones no se ha estudiado las deformaciones locales durante el consumo voluntario de alcohol sin preexposición.

De igual forma, pocos son los estudios que realizan investigación en modelo animales donde consideren hembras y machos, y el estudio del alcohol, no es la excepción. Priddy y colaboradores en el 2017 realizaron una investigación para analizar los efectos del ciclo estral sobre el consumo de alcohol en un modelo de alcoholismo en ratas Wistar y encontraron que las hembras bebían más alcohol que los machos (Priddy et al., 2017), estos resultados también son respaldados por las investigaciones realizadas por Amodeo en el 2018 en el que de la misma manera se observó un incremento en el consumo de alcohol por parte de las ratas hembras Wistar durante la vida adulta (Amodeo et al., 2018). En una investigación reciente, mediante la técnica de resonancia magnética intentaron ver un efecto de sexo durante el consumo de alcohol, y lo que se ha encontrado es una disminución de factor de anisotropía en la Fimbria Fórnix en ratas hembra Wistar vs machos tras la exposición al EtOH al vapor al 95% y un modelo de acceso continuo de alcohol de EtOH al 15 % (Zarh et al., 2020).

Sin embargo, la implementación de modelos longitudinales es demorada, por ello que los estudios cuentan con una muestra ~10 animales por grupo. Para ellos consideramos que la implementación de métodos estadísticos desde la perspectiva Bayesiana, pueden brindar una inferencia más precisa a este fenómeno debido a que permiten hacer inferencias con muestras pequeñas. En el siguiente tema se hablará sobre la estadística Bayesiana y sus ventajas en el campo de la investigación.

Estadística Bayesiana

La premisa principal de la estadística Bayesiana se basa en que el conocimiento inicial es actualizado de forma continua a través de la evidencia, lo cual conlleva a la obtención de un conocimiento posterior, esto permite realizar múltiples inferencias. De la misma manera, se supone que la incertidumbre puede ser modelada utilizando la teoría de la probabilidad (Dienes & Mclatchie, 2018; Gronau et al., 2017), la cual permite la descripción de la incertidumbre asociada a los sistemas estocásticos y un ajuste de modelos en la inferencia bayesiana. En la estadística bayesiana los parámetros son considerados variables aleatorias (Θ), y la incertidumbre o el grado de creencia con respecto a los parámetros se cuantifica mediante distribuciones de probabilidad, en otras palabras, la estadística bayesiana es el único enfoque en el que se hace un uso explícito de la probabilidad para cuantificar la incertidumbre de la inferencia, siendo un proceso de aprendizaje iterativo en el que se alcanzan conclusiones sobre un fenómeno (probabilidad a posteriori) a partir del conocimiento previo sobre un fenómeno (probabilidad a priori) y actualizando nueva información (información proveniente de los datos) con la finalidad de realizar inferencias sobre este, si el modelo es correcto, esta perspectiva es la esencia del método científico (McElreath, 2018), denotado de la siguiente manera.

$$p(\theta | x) = \frac{p(x | \theta) p(\theta)}{p(x)}$$

Donde :

$p(\theta | x)$: Se conoce como la distribución posterior.

$p(x | \theta)$: $L(\theta)$ es la verosimilitud. la distribución de verosimilitud cuantifica la información de θ .

$p(\theta)$: Es la distribución inicial o a priori y $p(x)$, es la distribución a priori, contiene las creencias sobre el parámetro.

$p(x)$: La evidencia $p(x)$ es la probabilidad de los datos a través de todos los posibles valores de los parámetros.

Aproximación de la estadística bayesiana

Las teorías computacionales de la función cerebral son de interés en la neurociencia y en la neurobiología (Parr et al., 2018), estas teorías postulan que el cerebro realiza inferencia bayesiana, como pueden ser los procesos de percepción y sensación (Friston, 2010; O'Reilly et al., 2012) . Así mismo, la principal contribución de un enfoque computacional a la nosología se basa en la noción de un modelo generativo, el cual genera consecuencias por causas, es decir, síntomas, signos y diagnósticos a partir de la psicopatología y la fisiopatología subyacente (Friston et al., 2017). La utilidad de un modelo generativo radica en la capacidad para inferir estados latentes a partir de resultados observados y a la oportunidad que brinda para evaluar la evidencia dado un conjunto de mediciones previas, a este tipo de comparación también se le conoce como modelo bayesiano, donde la evidencia del modelo es la probabilidad de obtener datos observados en un modelo particular (Stephan et al., 2009).

Con base en esta perspectiva podemos encontrar una serie de ventajas:

- 1 Permite combinar información continuamente, es decir, actualiza evidencia sobre una hipótesis o un modelo de manera intuitiva y coherente.
- 2 Permite alcanzar estimaciones exactas de los parámetros y hacer inferencias válidas aún con muestras pequeñas.
- 3 La interpretación de los resultados es fácil y directa ya que indica la probabilidad de que un parámetro tome un valor.
- 4 Se pueden incluir medidas de incertidumbre, datos perdidos y diferentes niveles de variabilidad.
- 5 Permite especificar las distribuciones de los parámetros a priori, cuando sabemos cómo se distribuyen (priors).

Regresión Logística Bayesiana

La aproximación bayesiana para estimar modelos de regresión binaria es utilizada para explicar la probabilidad de una variable de respuesta binaria en función de algunas covariables, siendo un método basado en el modelo lineal general (GLM). El modelo está especificado de la siguiente manera:

$$Y_i \sim \text{Bernoulli}(p_i)$$

$$p_i = F(x^T \beta)$$

- $Y_i \rightarrow$ variable binaria | $Y_i = 1$ ocurre con probabilidad p_i .
- $X_i \rightarrow (X_{i1}, X_{i2}, X_{i3}, \dots, X_{ik})^T$ vector con valores de k variables explicativas.
- $\beta \rightarrow (\beta_1, \beta_2, \beta_3, \dots, \beta_k)^T$ vector de k coeficientes de regresión.
- $F(\cdot) \rightarrow$ función de distribución acumulada (fda).
- $p_i \rightarrow X^T \beta$ es el i -ésimo predictor lineal.

En caso de que F sea la fda de una distribución normal, tenemos el enlace probit $F(t) = \Phi(t)$, por el contrario, si F es la fda de una distribución logística, obtenemos el enlace logit $F(t) = \frac{e^t}{1 + e^t}$.

Por último, se describen las principales desventajas de usar los modelos de regresión logística, entre los más comunes se encuentran:

- Heterogeneidad - no observada*, este problema señala que si el resultado es binario surge de surge de un continuo latente y un umbral, entonces, los efectos observados también deben de reflejar la heterocedasticidad latente; esto nos dice que si los modelos fueran perfectos, todas las variables independientes podrían ser incluidas en el modelo y podrían explicar toda la variación de la variable dependiente y
- Colapsabilidad*, se conoce que los coeficientes de regresión son colapsables para el modelo sobre las covariables no correlacionadas, sin embargo, los modelos de regresión logística, no tienen esta propiedad, específicamente, si una covariable que está correlacionada con el resultado binario se omite de la ecuación de regresión

logística, las pendientes de los predictores restantes se verán afectadas, incluso si la covariable omitida no está correlacionada con los predictores observados, por ejemplo, en el caso de omitir una covariable no correlacionada, las pendientes observadas tenderán a 0 (Mood et al ., 2010; Pang et al ., 2013).

Justificación

En la actualidad, la investigación preclínica utiliza una amplia gama de técnicas para evaluar los eventos moleculares, celulares, sistémicos, conductuales y cognitivos asociados a la transición del consumo de alcohol, el presente trabajo pretende investigar alteraciones en el fenotipo morfológico cerebral en un modelo preclínico asociado al trastorno por consumo de alcohol (AUD) en ratas, medido por Morfometría Basada en Deformación utilizando imagen por Resonancia Magnética (MRI).

Investigar un modelo de consumo de sustancias en animales, permite experimentar diferentes etapas del trastorno por consumo de alcohol (Sanchez-Roige & Palmer, 2020), debido a que los roedores, muestran una gran variabilidad en los niveles de vulnerabilidad y resistencia a los fenotipos de AUD, independientemente de la dosis de alcohol al que están expuestos nos permiten estudiar subpoblaciones vulnerables (alto consumo de alcohol) y resilientes (bajo consumo de alcohol) a través de procedimientos de consumo voluntario (Goltseker et al., 2019). Actualmente, las ventajas de utilizar modelos animales para el estudio de AUD, se basa en el modelamiento de procesos de auto-administración, ansia, búsqueda, ingesta compulsiva, dependencia y recaída. En recientes investigaciones, se ha encontrado que la exposición crónica a altas dosis de alcohol produce cambios neuronales contra-adaptativos que afectan la toma de decisiones e incrementa la impulsividad (Spoelder, Flores Dourojeanni, et al., 2017; Spoelder, Pol, et al., 2017), mientras que en dosis bajas se presenta un incremento en la motivación y preferencia al alcohol (Spoelder et al., 2015), esto nos permitiría mostrar que los modelos animales en ratas se asemejan a las problemáticas de AUD en humanos.

De la misma manera, se pretende emplear modelos precisos y válidos al estudiar el SUD, por lo tanto, la identificación del fenotipo cerebral en ratas con alto consumo de alcohol durante las primeras etapas del entrenamiento voluntario nos proporciona una herramienta confiable para estudiar diferentes aspectos de AUD, al mismo tiempo que se controla la vulnerabilidad y la resistencia dentro de la población estudiada (Goltseker et al., 2019). Por esta razón, fenotipificar los cambios cerebrales en un modelo de alcohol de alto consumo usando la imagen por resonancia magnética, nos puede ayudar a entender los mecanismos asociados con alteraciones en toma de decisiones, impulsividad y respuestas a estímulos reforzantes, los cuales pueden ser posibles biomarcadores de AUD en humanos.

Pregunta de investigación

¿Puede el fenotipo morfológico cerebral predecir el consumo de alcohol en un modelo pre-clínico?

Objetivos

Objetivo general:

Determinar si el fenotipo morfológico cerebral predice el alto consumo de alcohol en ratas.

Objetivos específicos

- 1 Examinar los cambios en la morfología cerebral macroscópica en consumidores de alcohol y controles.
- 2 Estimar la pertenencia al grupo de alto consumo de alcohol con base en cambios morfológicos cerebrales.
- 3 Identificar los principales predictores morfológicos en el consumo alto de alcohol.

Hipótesis

- 1 Las ratas que consumieron alcohol mostrarán deformaciones locales en áreas cerebrales en contraste con los controles sanos.
- 2 Las áreas cerebrales relacionadas con el ciclo de la adicción predecirán un alto consumo de alcohol.
- 3 La corteza cerebral, el núcleo accumbens y el tálamo, poseerán los coeficientes de predicción más altos, al predecir el consumo alto de alcohol.

Capítulo 3

Método

Muestra

Para la realización de esta investigación se utilizaron dos muestras de ratas Wistar, la primera tuvo como finalidad la validación del modelo de botellas de elección, como estudio piloto, mientras que la segunda se consideró solo como muestra experimental. Todas las ratas fueron criadas en el bioterio del Instituto de Neurobiología (INB) desde su destete en el día 21 postnatal (P21), hasta su sacrificio; así mismo, este proyecto fue aprobado por el comité de ética e investigación del INB. El material utilizado en los modelos se encuentra descrito en el material suplementario.

En la literatura se han reportado ingestas mayores en ratas adolescentes Wistar que en Rata Wistar adulta (Sengupta, 2013), así mismo se han observado diferencias en la concentración de EtOH (simms et al., 2009), por estas razones, se realizó un estudio piloto consistió en cuatro modelos de alcohol, los cuales variaban en dosis de consumo (10%,20% y 10-20%) y en edad (P45, P75 y P69), estas edades, fueron escogidas para evaluar el consumo de alcohol en la adolescencia, iniciando la adultez y etapa adulta.

- Modelo 1. Modelo de acceso intermitente al 20% de alcohol, el cual se conformó de 4 ratas Wistar, dos hembras (Rata 1 y 3, en P76) y dos ratas macho (Rata 2 y 4, en P75).
- Modelo 2. Modelo de acceso intermitente al 10% de alcohol, este modelo tuvo una muestra de 3 ratas Wistar (dos hembras; Rata 10 y 11) y una rata macho (Rata 7) en P45
- Modelo 3. Modelo de acceso intermitente al 20% de alcohol. Este modelo tuvo una pre-exposición al 10% de EtOH de 10 sesiones y se conformó de 3 ratas Wistar (dos hembras; Rata 10 y 11) en P69
- Modelo 4. Modelo de acceso intermitente al 10% de alcohol esta muestra fue de 6 ratas Wistar (tres hembras; rata 12, 13 y 14, tres machos ; rata 15 16 y 17) en P75.

Procedimiento

Modelos piloto

Todos los modelos de alcohol se encontraban en un cuarto de ciclo de luz invertido con un horario de 8:00 A.M. a 20:00 P.M, con excepción del modelo 4, el cual tuvo un horario de 12:00 A.M. a 12:00 P.M. La implementación del modelo se realizó con base en las modificaciones propuestas por Simms (Simms et al., 2008). En la Tabla 3 se exponen las características de los 4 modelos.

Los modelos consistieron en 20 sesiones correspondiente a 45 días, el modelo de alcohol constó de tres fases:

- **Habitación:** Colocación de bebederos con agua ionizada durante 10 días.
- **Exposición:** La rata tuvo acceso a los dos bebederos desde la sesión 1 hasta la sesión 20, los cuales se colocaron 15 minutos después del cambio del ciclo luz/oscuridad. En los días: lunes, miércoles y viernes, uno de los bebederos contenía 100 mL de solución de alcohol al 20%, mientras que los días: martes, jueves y sábado, ambos bebederos tenían 100 mL de agua desionizada. Todas las ratas fueron alojadas de forma individual.
- **Medición:** Se realizaron tres mediciones de alcohol y agua por sesión.
 - Medición inicial de los bebederos a 100 mL.
 - 30 minutos después de la colocación de los bebederos (Preferencia).
 - 24 horas después de la colocación de los bebederos (consumo total).

| Modelo | Muestra | Edad (P) | Concentración de EtOH | Sesiones | Ciclo de luz invertido |
|--------|----------------------------|----------|-----------------------|--------------|------------------------|
| 1 | 4 ratas Wistar (2 hembras) | P75-P76 | 20 % de EtOH | 20 (45 días) | 8:00 a 20:00 |
| 2 | 3 ratas Wistar (2 hembras) | P45 | 10 % de EtOH | 10 (23 días) | 8:00 a 20:00 |
| 3 | 3 ratas Wistar (2 hembras) | P69 | 20 % de EtOH | 10 (23 días) | 8:00 a 20:00 |
| 4 | 6 ratas Wistar (3 hembras) | P75 | 10 % de EtOH | 6 (14 días) | 12:00 a 24:00 |

Tabla 3. Características de los modelos piloto de alcohol.

Variables

Para describir los modelos del consumo intermitente de alcohol se calcularon las siguientes variables, las cuales se describen a continuación (Simms et al., 2008).

- Consumo de alcohol a las 24 horas ponderado por peso de la rata (g/Kg/24h).
- Consumo total de líquidos alcohol/agua (mL/24 h) y ponderado por peso (mL/Kg/24 h), para ello se consideró que 100 mL de EtOH al 10% ~ 98.0608 g y 100 mL de EtOH al 20% ~ 96.1216 g.
- Atracón (Consumo de alcohol en función del tiempo g /Kg/30 minutos).

Modelo experimental

El modelo de IA2BC, se estudió en rata Wistar en P45 (adolescentes). Con base en una investigación de Vetreno (Vetreno et al., 2017), se estimó el tamaño de la muestra con ayuda de los paquetes “lme4”, “simr” y “lmerTest” usando el lenguaje de programación R (R Core Team, 2019). La muestra final estará conformada por 3 bloques de ratas (n = 48), las cuales fueron aleatorizadas en dos grupos, 12 ratas control (6 hembras y 6 machos) y 32 ratas con exposición a alcohol al 20% (16 hembras y 16 machos). Una muestra preliminar fue analizada en el presente trabajo, el grupo experimental tuvo una muestra de 22 ratas Wistar (12 hembras) y una muestra control de 7 ratas Wistar (4 hembras). Las características de la muestra se presentan en la Tabla 3.

Experimento 1 - Exposición de etanol

Para la exposición al alcohol, se implementó el modelo de Acceso Intermitente de Etanol de 2 Botellas de Elección (IA2BC), siendo este un modelo de consumo crónico que dura 20 sesiones, en este modelo, el ciclo invertido fue de 7:00 AM a 19:00 PM. Igualmente, la posición de las botellas (EtOH-H₂O) fue de forma aleatoria (Amit et al., 1970; Simms et al., 2008) para controlar las preferencias secundarias, el procedimiento del modelo alcohol, así como las métricas a emplear fueron descritas en el apartado de modelos piloto.

Experimento 2 – Adquisición de las imágenes por resonancia magnética

Las imágenes fueron adquiridas usando un resonador Bruker Pharmascan 7T (Bruker Pharmascan 70/16US) usando una combinación de una bobina de radiofrecuencia circular de diámetro de 72 mm (para transmisión) y una bobina de superficie 2x2. El escáner se controló mediante el software Paravision 6.0.1. Para la imagen estructural *in vivo* se implementó una secuencia 3D Flash pesada a T1 con dos repeticiones ocupando los siguientes parámetros, tiempo de eco de 5 ms (TE), un tiempo de repetición de 30.76 ms (TR) y un FOV de 25.6 mm x 19.098 mm x 25.6 mm y un vóxel isométrico de 160 micras. El Laboratorio Nacional de Imagenología por Resonancia Magnética (LANIREM) facilitó la adquisición de las imágenes en el presente estudio de investigación. El diseño experimental se presenta en la Figura 2. Para la presente investigación solo se tomaron en cuenta los datos correspondientes al Tiempo 1.

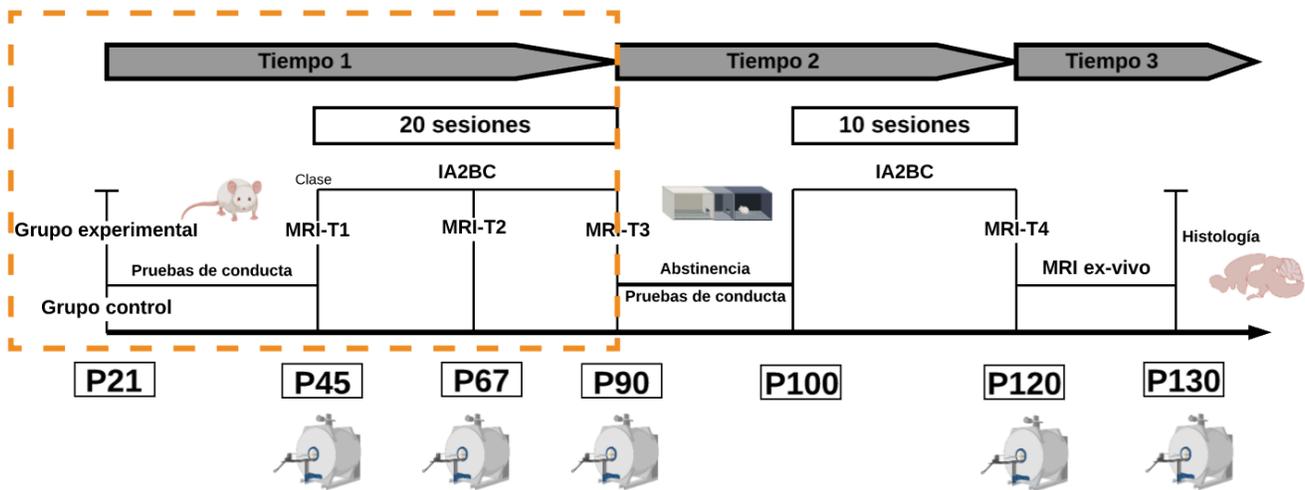


Figura 2. Diseño experimental.

En el tiempo 1, se encuentra resaltado en el cuadro naranja, el cual fue el cohorte que se utilizó para análisis en el presente trabajo.

Capítulo 4

Análisis de datos

Preprocesamiento de las imágenes de resonancia magnética.

Las secuencia estructural fue convertida de formato Bruker a nifti usando la herramienta `brkraw` (<https://brkraw.github.io/>), posteriormente, se realizó un promedio de estas imágenes para finalmente ser preprocesadas usando `MINC-toolkit-v2` (<https://github.com/BIC-MNI/minc-toolkit-v2>), `ANTs V3.0` (<http://stnava.github.io/ANTs/>) and `Mrtrix V3.0` (<https://www.mrtrix.org/>), el preprocesamiento constó de los siguientes pasos: limpiado de la señal, correcciones de inhomogeneidad de la intensidad de la señal y corrección al atlas de Fisher 344 (Goerzen et al., 2020). Todos los pasos del preprocesamiento de imágenes se encuentran disponibles en https://github.com/DiegoAngls/Alcohol_model.

Deformación Basada en Morfometría

Se implementó un análisis de Deformación Basada en Morfometría (DBM) mediante la herramienta `Two Level DBM` (https://github.com/CoBrALab/twolevel_ants_dbm), el cual se encuentra basado en `ANTsX/ANTs v2.3.1 5`, con la finalidad de crear un mapa jacobiano por sujeto y por cada una de las adquisiciones, para este análisis se utilizó una parcelación correspondiente al atlas de Fisher 344 (Goerzen et al., 2020).

Datos descriptivos

Con la finalidad de realizar comparaciones en las características descriptivas de la muestra, se comprobaron los criterios de normalidad para realizar estadística paramétrica (Field et al., 2012), usando el lenguaje de programación R.

Modelo lineal mixto

Se evaluó el cambio de la deformación cerebral en el consumo de alcohol, mediante un modelo lineal de efectos mixtos en el lenguaje de programación R, usando el paquete "`RMINC`" (<http://mouse-imaging-centre.github.io/RMINC>). Los modelos se utilizaron para evaluar el efecto

de la edad para cada una de las adquisiciones de resonancia (T1, T2 y T3) correspondientes a resonancia basal, 10 sesiones del modelo de IA2BC (Cambios agudos) (Simms et al., 2008) y 20 sesiones de consumo de alcohol, asociados con el consumo crónico de alcohol. Se consideró un efecto de interacción para el grupo experimental (control vs alcohol). En adición, para controlar los efectos productos del desarrollo, se añadió como covariable sexo y un efecto aleatorio (1| ID). Todos los análisis fueron corregidos por múltiples comparaciones mediante la corrección FDR (*false discovery rate, por sus siglas en inglés*).

Modelfit → mincLmer (Mapa jacobiano ~ Edad * Grupo * Sexo + (1 | ID)

Modelos mixtos de clase latente

Con la finalidad de clasificar a los consumidores de alcohol como alto vs bajo consumo, se implementó un modelo mixto de clase latente, ya que nos permite generar clases considerando varias mediciones en el tiempo (trayectorias), se implementó el mismo modelo mixto utilizado en el DBM, lo único que varió fue la variable independiente, en este se consideró la toma principal de alcohol g/Kg/24h, un valor por cada sujeto (ID) y por cada sesión.

Este análisis se corrió en el lenguaje de programación R con el paquete lcmm (Proust-Lima et al., 2017), con 100 iteraciones y con la estimación de dos clases.

Modelo de regresión logística bayesiana

Con la finalidad de saber si las deformaciones locales cerebrales predicen el alto consumo de alcohol en ratas, se implementó un análisis estadístico bajo el marco de inferencia bayesiana, en donde se utilizó el lenguaje de programación probabilístico STAN v2.26 (Stan Development Team, 2020), el cual nos permite especificar modelos probabilísticos y aproximar distribuciones posteriores, a través de una técnica de muestro conocida como Cadenas de Markov Montecarlo (MCMC, por sus siglas en inglés). Este análisis se implementó en el lenguaje de programación R (R Core Team, 2019) y con el paquete brms (Bürkner, 2018) .

Para este modelo, se extrajeron los picos significativos por cada región cerebral, ver Tabla 6. Previamente se generó una clase (*alto consumo y bajo consumo*), solo para el grupo experimental. Finalmente, se realizó un modelo regresión logística bayesiana.

Dado lo anterior se propuso el siguiente modelo:

$$Y_i \sim \text{Bernoulli}(\pi_i), i = 1 \dots, n \quad \text{logit}(\pi_i) = \beta_0 + \beta_1 * \text{área cerebral}_i + \dots \beta_2 * \text{área cerebral}_n + \varepsilon_i$$

Para este modelo se utilizó información previa una distribución $N(0,0.5)$ tanto para el intercepto, como para las β (McElreath, 2018) . Adicionalmente para estimar la distribución posterior se ajustó un modelo con los siguientes parámetros: cadenas quemadas = 500, iteraciones = 5000, cadenas = 4 y una semilla = 0911.

Con la finalidad que obtener inferencias válidas, se verificó la convergencia de la distribución posterior de todos los parámetros de interés mediante métodos gráficos (gráficas de traza y autocorrelación) y con un criterio de \hat{R} entre 1 y 1.05 (Gelman & Hill, 2006) .

Capítulo 5

Resultados

Resultados de los modelos piloto de alcohol

En la Figura 3 se encuentra el desempeño asociado al consumo de alcohol, mientras que en la Figura 4 se observan los resultados del consumo de agua ionizada, en comparación con la preferencia de consumo a los 30 minutos. Con base en los resultados de Simms, las ratas Wistar después de la sexta sesión alcanzan un consumo promedio de 5.8 ± 0.8 g/Kg/24h, no obstante, su consumo medio tiene un rango de 1.2 a 9.7 g/Kg/24h, en la Tabla 4 se muestran las métricas que se obtuvieron en los modelos piloto. Aunado a esto, en los modelos 1 y 3 se observa un consumo mayor de alcohol a las 24 horas en comparación con los otros dos modelos. Dentro del modelo 3, el cual fue previamente expuesto a una concentración del 10 % de EtOH correspondiente al modelo 2, mostró resultados similares a los que se obtuvieron en el modelo 1, es por ello que consideramos que la pre-exposición de alcohol al 10% no mostró un efecto en el grupo de ratas adultas, sin embargo, el modelo 2 obtuvo el consumo más alto de alcohol a los 30 minutos, por lo que consideramos que podría ser un buen modelo para estudiar la intoxicación aguda.

La preferencia por el consumo de alcohol sobre el agua se calculó solo en el tiempo de ingesta mínima (30 minutos), esta medida toma relevancia al presentar las botellas de forma aleatoria (contrabalanceo, con una probabilidad de 0.5) mostrando un grado de preferencia por la droga. En la Figura 4 se observa el porcentaje de preferencia de alcohol para cada uno de los modelos, siendo el modelo 2 el que tuvo una mayor preferencia con 45.55% y el modelo 4 con una mínima preferencia de 11.88. Esta métrica, fue significativa mediante la implementación de un Análisis de Varianza de una Vía (ANOVA), $F(3) = 19.25$ y una $p < 0.001$ en el factor grupo, por lo que se realizó una prueba post-hoc, con método de Tukey, se encontraron diferencias significativas en comparaciones contra el Piloto 2 (Piloto 2 vs Piloto 1), con una $p - adj < 0.001$, sin embargo en comparación con el Piloto 3, no se encontró esta diferencia significativa.

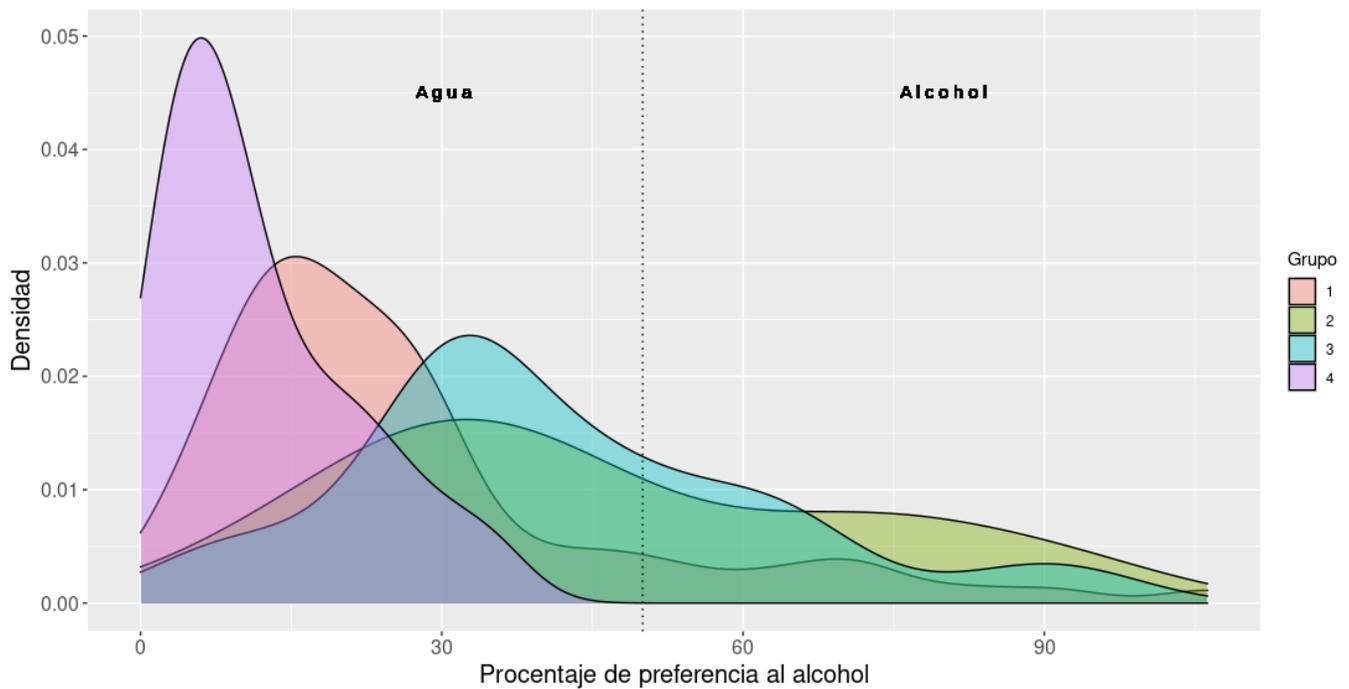


Figura 3. Preferencia del consumo de alcohol.

Se muestra una gráfica de densidad para cada uno de los modelos piloto, la línea punteada representa un umbral de preferencia al 50%.

| Modelo | Toma principal de alcohol g/Kg/24h | | Total de fluidos consumidos mL/24h | | Total de fluidos consumidos mL/30min | | Preferencia EtOH/H2O % |
|--------|------------------------------------|--------------|------------------------------------|--------------|--------------------------------------|-------------|------------------------|
| | EtOH (sd) | H2O (sd) | EtOH (sd) | H2O (sd) | EtOH (sd) | H2O (sd) | |
| 1 | 3.11(1.06) | 11.22 (1.55) | 9.37 (3.06) | 31.06 (4.89) | 1.85 (1.02) | 2.67 (1.51) | 26.27 |
| 2 | 2.72 (1.06) | 3.60 (0.76) | 12.34 (3.54) | 15.91(3.98) | 1.33 (0.63) | 1.26 (0.76) | 45.55 |
| 3 | 3.64 (0.68) | 5.14 (1.41) | 12.69 (3.31) | 18.36 (5.29) | 2.19 (0.86) | 1.85 (0.93) | 41.67 |
| 4 | 1.62 (0.36) | 12.65 (1.80) | 4.99 (1.02) | 39.86 (4.88) | 0.79 (0.39) | 3.14 (0.66) | 11.88 |

Tabla 4. Resultados globales de los modelos piloto.

Se presentan las principales métricas del modelo IA2BC, de los cuatro modelos piloto, media (sd).

Modelo experimental

Los animales que fueron expuestos al modelo IA2BC tomaron 1.90 ± 2.08 g/Kg de alcohol a las 24 horas al finalizar un total de 20 exposiciones de alcohol al 20%. No se observó una diferencia estadística en los pesos del grupo experimental y el grupo control, en la resonancia basal (0.269 ± 0.070 Kg, para el grupo control, 0.273 ± 0.080 Kg en el grupo experimental), ni en la resonancia al finalizar el modelo de alcohol, ver Tabla 5.

| | Control (n = 7) | Experimental (n = 22) | Estadístico |
|---|--------------------|--------------------------|---------------------------------------|
| Sexo | | | |
| Hembra | 4 | 12 | $\chi^2 (1) = 0.166$ $p = 0.683$ |
| Macho | 3 | 10 | |
| Edad (días) | 90 ± 2 | 90 ± 2 | n. a |
| Sesiones IA2BC | 20 | 20 | n. a |
| Peso (g) | | | |
| General | 269 ± 70 | 273 ± 80 | $t (263) = -0.615$ $p = 0.683$ |
| Hembra | 222 ± 30 | 212 ± 40 | $t (274) = 2.55$ $p = 0.011^{***}$ |
| Macho | 313 ± 70 | 325 ± 68 | $t (207) = -1.48$ $p = 0.13$ |
| Toma principal de alcohol g/Kg/24h | n. a | 1.90 ± 2.08 | n. a |
| Atracón g/Kg/30min | n. a | 0.24 ± 0.32 | n. a |

Tabla 5. Resultados globales del modelo de alcohol.

Se presentan las principales métricas del modelo IA2BC, de los cuatro modelos piloto, media \pm sd; n.a, no aplica; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

| | Experimental (n = 22) | | Estadístico |
|---|--------------------------|-----------------|--|
| | Hembras (n=12) | Machos (n=10) | |
| Peso (g) | | | |
| | 212 ± 40 | 325 ± 68 | $t (578) = -24.96$ $p < .001^{***}$ |
| Toma principal de alcohol g/Kg/24h | | | |
| | 1.36 ± 1.46 | 2.13 ± 2.31 | $t (597) = -24.96$ $p < .001^{***}$ |
| Atracón g/Kg/30min | | | |
| | 0.16 ± 0.20 | 0.31 ± 0.40 | $t (532) = -6.41$ $p < .001^{***}$ |

Tabla 6. Comparaciones globales del modelo de alcohol

Se presentan las principales métricas del modelo IA2BC, media \pm sd ; n.a, no aplica; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ; *** $p < .001$. Después de las comparaciones generales entre los controles contra el grupo experimental, no se observamos diferencias significativas en el peso de las ratas ni en la proporción por sexo de los grupos. Sin embargo, como encontramos diferencias significativas por sexo en las métricas de alcohol, solo del grupo experimental, se decidió correr el modelo lineal de efectos mixtos, agregando sexos como covariable, véase Tabla 5

Deformación basada en morfometría

Utilizando los modelos lineales mixtos, en la comparación de nuestro interés se encontraron diferencias de interacción entre las sesiones de resonancia y en el consumo de alcohol (control vs experimental) con una $p < 0.05$, en los volúmenes relativos en corteza cerebral, tálamo, caudado putamen y giro dentado, ver Tabla 6. Sin embargo, estas diferencias no soportaron la corrección por múltiples comparaciones (FDR) . Estos cambios observados en la evolución del modelo de alcoholismo pueden observarse en la Figura 5. Así mismo, no se observó un efecto de interacción con la variable sexo.

| Área cerebral | Lateralidad | Coordenadas (x y z) | t -value | Efecto |
|------------------|-------------|-----------------------|----------|------------|
| Tálamo | Izquierda | -2.348, -2.418, 5.011 | - 2.67 | Decremento |
| Corteza cerebral | Derecha | 1.88, 0.577, 9.511 | - 2.67 | Decremento |
| Caudado-Putamen | Izquierda | -2.78, 1.830 5.689 | 2.72 | Incremento |
| Giro Dentado | Izquierda | -5.69, -5.897, 4.545 | 2.72 | Incremento |

Tabla 7. Cambios cerebrales locales

Principales áreas cerebrales significativas asociadas al consumo de alcohol, con el contraste (edad*grupo).

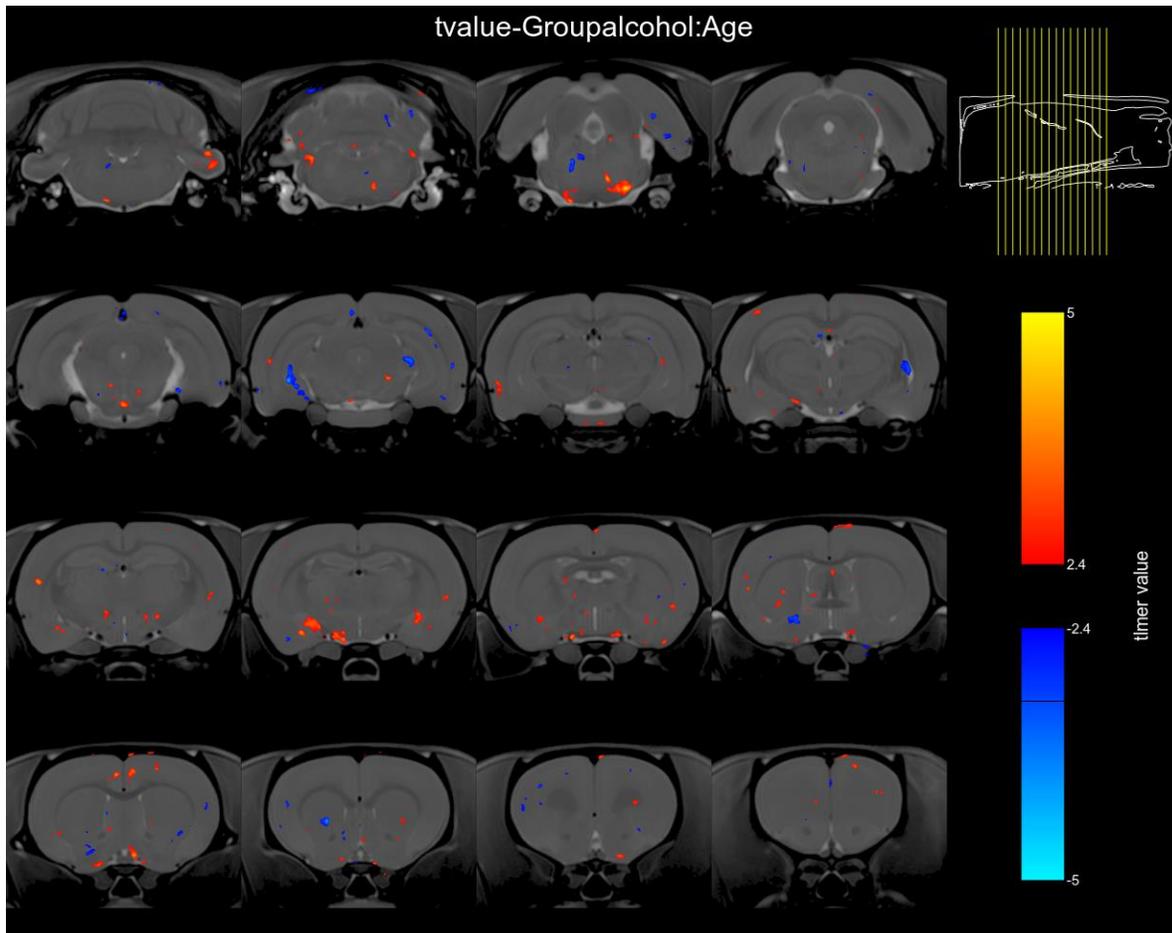


Figura 5. Deformaciones cerebrales locales.

Mapa cerebral de valores t , con contraste (edad*grupo), en colores cálidos observamos incrementos locales en áreas cerebrales, mientras que en colores fríos se observa principales cambios de decremento.

Modelo mixto de clases latentes

Para identificar las características de alto consumo de alcohol en el modelo de Acceso Intermitente de alcohol a dos botellas, el análisis mixto de clases latentes, mediante la medida de la toma principal de alcohol g/Kg /24 mostró dos principales grupos de consumidores de alcohol. El modelo de dos clases fue el mejor modelo que se ajustó a los datos, en comparación con el modelo de estimación de tres clases (ver Figura 6), lo cual se comprobó mediante el criterio de información de Akaike (AIC, por sus siglas en inglés).

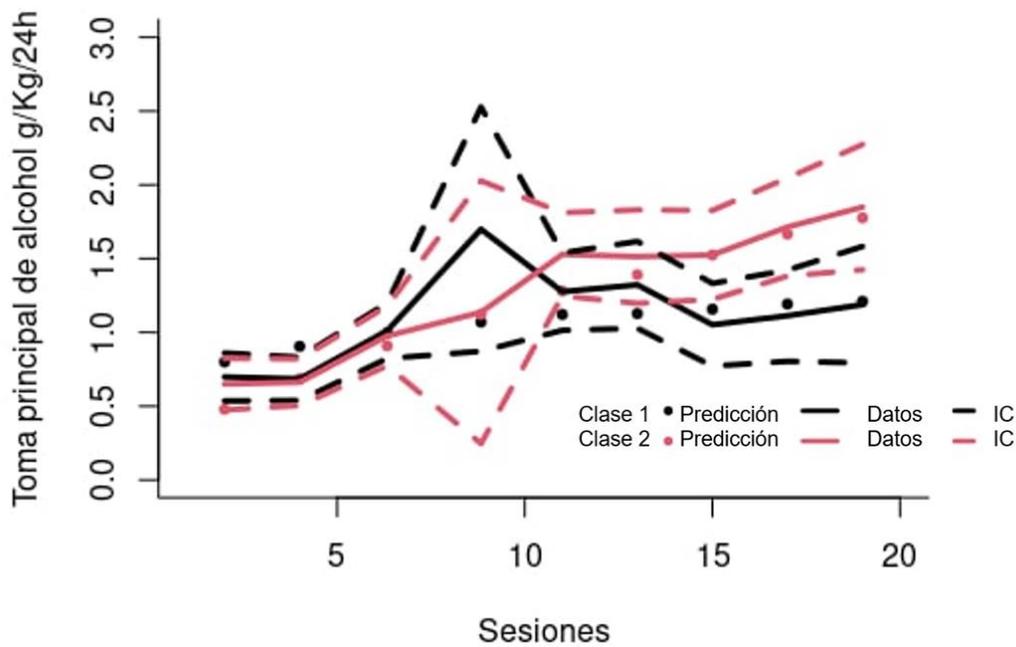


Figura 6. Clasificación del consumo de alcohol.

El modelo mixto de clases latentes encontró dos clases, en rojo se muestra los altos consumidores (clase 2), y en negro los consumidores bajos (clase 1), durante el consumo de las 20 sesiones. IC, Intervalo de confianza.

Los altos consumidores tenían un consumo $2.56 \pm 3.42\text{g/Kg/24h}$ y un atracón $0.32 \pm 0.42\text{ g/Kg/30min}$, (40.9%, n =12), mientras que los bajos consumidores consumieron en promedio $1.41 \pm 2.44\text{g/Kg/ 24 h}$ y en atracón $0.15 \pm 0.26\text{ g/Kg/30min}$ (49.1%, n =10).

| | Control (n = 7) | Experimental (n = 22) | | Estadístico |
|---|--------------------|--------------------------|--------------------------|--|
| | | Alto consumo (n = 12) | Bajo consumo (n = 10) | |
| Sexo | | | | |
| Hembra | 4 | 8 | 4 | $\chi^2 (2) = 11.39$ $p = 0.0033^*$ |
| Macho | 3 | 4 | 6 | |
| Edad (días) | 90 | 90 | 90 | n.a |
| Sesiones | | | | |
| IA2BC | 20 | 20 | 20 | n.a |
| Peso (g) | | | | |
| General | 270 ±70 | 270 ±80 | 280 ±80 | F (2) =2.7 $p = 0.06$ |
| Hembra | 230 ± 30 | 210 ±40 | 220 ±30 | F (2) =3.56 $p = 0.029^*$ |
| Macho | 330 ±70 | 320 ± 80 | 320 ±70 | F (2) =0.15 $p = 0.85$ |
| Toma principal de alcohol g/Kg/24h | | | | |
| General | n.a | 2.56 ± 3.42 | 1.41 ± 2.44 | t (277) = 2.43 $p < .015^*$ |
| Hembra | n.a | 1.68 ±1.99 | 1.02 ±0.60 | t (381) = 5.01 $p < .001^*$ |
| Macho | n.a | 3.49 ± 4.27 | 1.67 ±3.09 | t (298) = 4.84 $p < .001^{**}$ |
| Atracón g/Kg/30min | | | | |
| General | n. a | 0.32 ±0.42 | 0.15 ± 0.26 | t (463) = 4.80 $p < .001^*$ |
| Hembra | n. a | 0.19 ±0.27 | 0.14 ±0.18 | t (578) = - 24.96 $p < .001^*$ |
| Macho | n. a | 0.46 ±0.50 | 0.16 ±0.31 | t (183) = 1.95 $p = 0.052$ |

Tabla 8. Resultados globales del modelo de alcohol.

Se presentan las principales métricas del modelo IA2BC, de los cuatro modelos piloto, media ± sd; n.a, no aplica; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Después de encontrar las clases, se encontraron diferencias significativas entre hembras las hembras de alto consumo versus las hembras de bajo consumo, lo cual se observa en la Tabla 4. Este efecto no se observó en los machos.

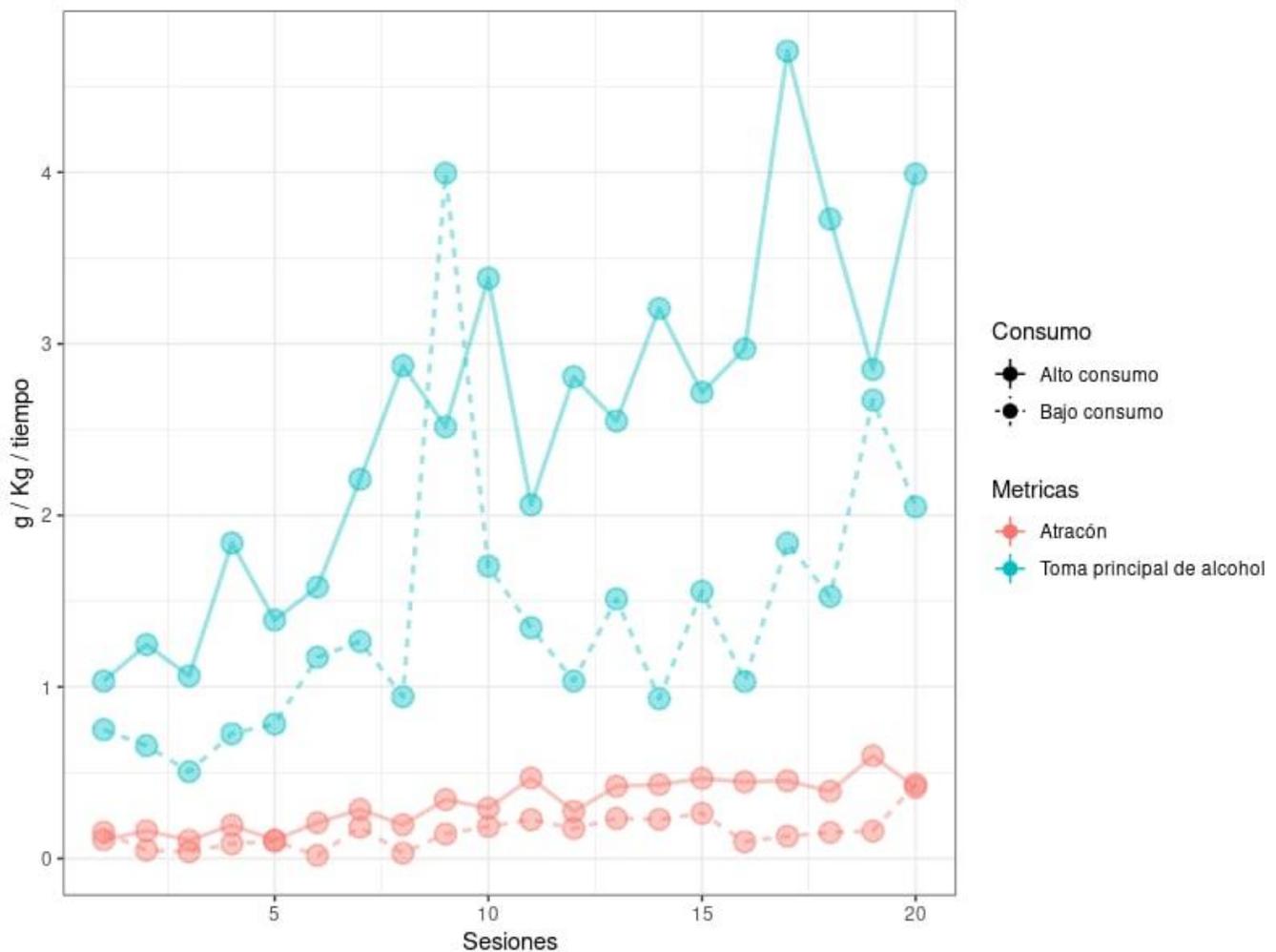


Figura 7. Principales métricas de consumo de alcohol

Se presentan los consumos de alcohol, toma principal de alcohol en azul y atracón en rojo para las dos clases (alto consumo y bajo consumo) durante las 20 sesiones del modelo de alcohol.

Modelo Predictivo (Alto consumo)

El modelo predictivo de regresión logística bayesiana en todos sus predictores logró converger para las 4 cadenas y las 5000 iteraciones, así mismo mostró convergencia con el parámetro $r_{hat} = 1$, para los coeficientes, demás se tuvo un promedio de 37000 cadenas efectivas.

Con la finalidad de facilitar la interpretación de los intervalos de credibilidad (IC), se realizó una transformación de escala logit a exponencial. Todos los predictores de las regiones cerebrales que habían mostrado incremento o decremento en la deformación cerebral propuestos en el

modelo, incrementan la probabilidad de clasificar a las observaciones como altos consumidores, ver Figura 8.

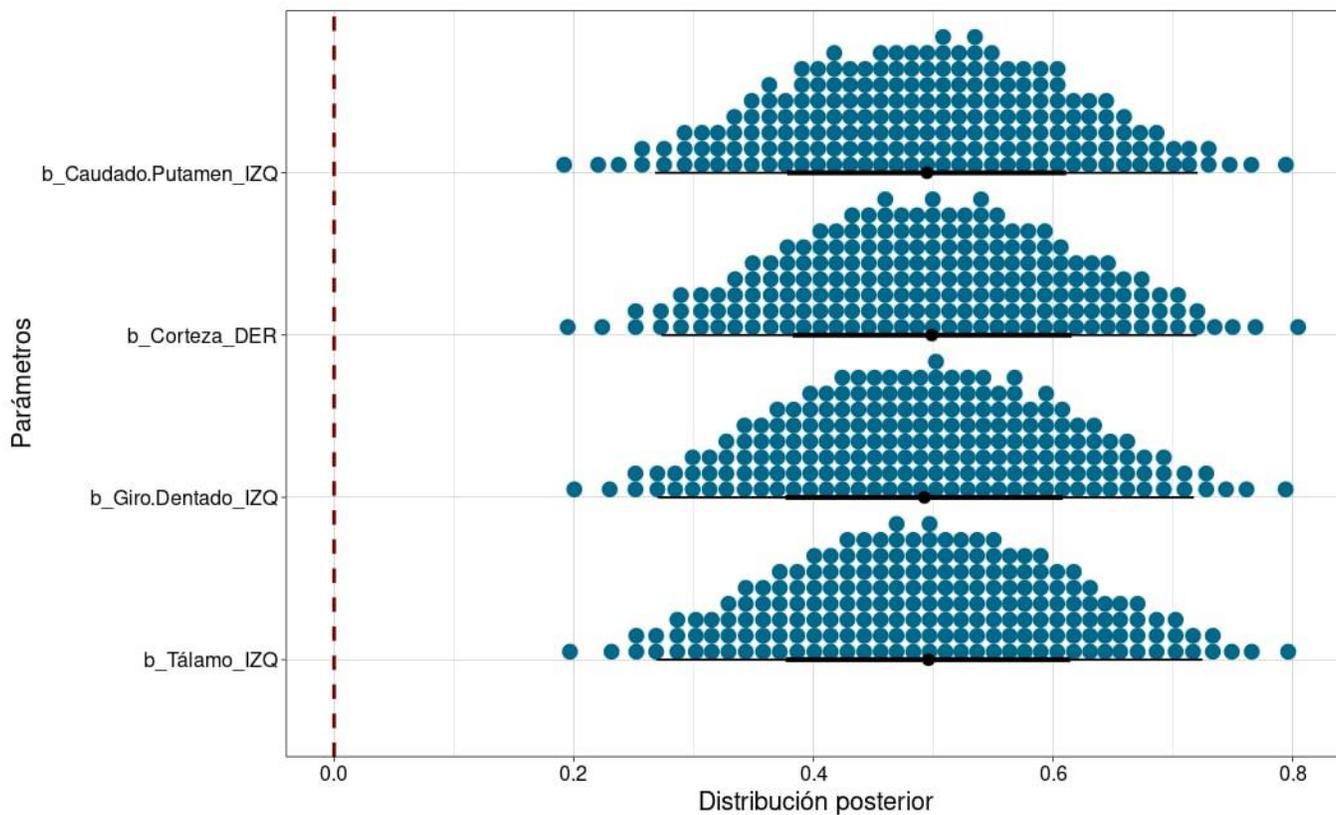


Figura 8. Intervalos de credibilidad.

Se observa los Intervalos de credibilidad y la distribución predictiva posterior, para cada parámetro, la línea punteada representa el 0, donde todos los IC son diferentes a 0.

Capítulo 6

Discusión

El presente proyecto buscó encontrar el fenotipo cerebral medido por deformación basada en morfometría (BDM) en un modelo de alcoholismo. El consumo de alcohol en ratas Wistar se desempeñó de forma muy similar a resultados que se han encontrado en la literatura, esto, en comparación con la medida más utilizada de toma principal de alcohol g/Kg/24h, en donde se observó un consumo promedio de 1.90 ± 2.08 g/Kg para el grupo experimental, y una vez clasificadas por alto y bajo consumo un promedio de 2.56 ± 3.42 g/Kg/24h y 1.41 ± 2.44 g/Kg/24h respectivamente. Esto puede variar por cepa de rata y edad, así como también por el modelo de alcoholismo empleado, por lo que no debe generalizarse (Carnicella et al., 2014). Basados en los resultados presentados por nuestros pilotos, nosotros implementamos el modelo de Acceso Intermitente de Alcohol a dos Botellas (IA2BC), como el piloto 2, ya que era el modelo en el que más preferencia de consumo había, sin embargo, al ver que el desempeño de toma de alcohol, durante todas las sesiones, era similar, en comparación con los modelos de consumo al 20% de alcohol, decidimos modificar el consumo de 10% a 20% de alcohol.

Las neuroadaptaciones inducidas por el consumo de sustancias generan cambios patológicos en la morfología cerebral, que parecen ser lo suficientemente sensible para ser observados macroscópicamente con imágenes por resonancia magnética (MRI), como lo demuestran los estudios de neuroimagen en pacientes humanos y en modelos animales (Fowler et al., 2007; Goldstein & Volkow, 2002). Si bien, nuestros resultados mostraron cambios en el grupo de interacción (control vs alcohol) con una $p < 0.05$, estos cambios no son robustos al no ser significativos con una prueba de múltiples comparaciones (FDR), lo que se puede explicar por un efecto pequeño en los controles. Por otra parte, se han encontrado cambios cerebrales producto de la deformación cerebral en modelos de consumo de alcohol (Zahr et al., 2020; Zhao et al., 2018), lo que diferencia a esos estudios del nuestro es el consumo voluntario de nuestra muestra, es decir, no existe un consumo forzado o una pre-exposición a la droga previa al consumo. Con base en esto, los cambios cerebrales por DBM que encontramos en la interacción *mapa_jacobiano**grupo, nos permiten aproximar el fenotipo asociado al consumo crónico del alcohol, en un modelo pre-clínico. De la misma manera, no se encontraron cambios cerebrales

robustos cuando se realizó el contraste de sexo, en comparación con otras investigaciones que si los encuentran (Zahr et al., 2017), a pesar de que no hubo diferencias en la proporción de machos versus hembras, esto puede deberse a que el tamaño de la muestra es pequeño.

Encontramos cuatro principales regiones cerebrales con un efecto de interacción, al finalizar 20 sesiones de alcohol al 20%, el tálamo y la corteza cerebral mostraron un decremento local, mientras que el caudado-putamen y el giro dentado mostraron un incremento local.

El Caudado-Putamen y el tálamo, son estructuras que se han descrito en la fase de Atracón/Intoxicación del ciclo de la adicción (Volkow et al., 2019). En estudios previos, se ha reportado que existe una reducción en el tálamo en consumo de alcohol (Zahr et al., 2013; Zhao et al., 2018), que es reversible después un periodo de abstinencias, lo cual corresponde a nuestro modelo, de la misma manera, se ha descrito que el circuito cortico-ganglio basal-tálamo regula el desarrollo y mantenimiento de conductas adictivas (Nestler, 2013; van Huijstee & Mansvelder, 2015). El cuerpo estriado dorso medial es importante en la realización de conductas dirigidas a objetivos, mientras que el cuerpo estriado dorsolateral (Caudado/putamen, CP) regula las conductas habituales (Yager et al., 2015). Cabe mencionar, que la presente investigación, muestra un incremento cerebral local de CP, el cual puede deberse a un aumento de cuerpos celulares o conexiones sinápticas, producto de la generación de hábitos. Lo cual, puede reflejar el consumo continuo de la rata y la generación de la conducta adictiva, así mismo lo expresa Simms en el 2008, donde menciona que el modelo intermitente de alcohol a dos botellas (IA2BC), después de la sexta sesión de consumo, genera una estabilidad en la toma de alcohol (Simms et al., 2008).

Adicionalmente, es relevante recordar, que las drogas de abuso aumentan la dopamina en el circuito de recompensa (que es importante para iniciar y mantener comportamientos motivados) comprenden las áreas del mesencéfalo (incluida el área tegmental ventral (VTA) y la sustancia negra), el estriado ventral (incluido el núcleo accumbens (NAc) y estriado dorsal (incluidos el caudado y el putamen) (Huang et al., 2018).

En adición, la otra estructura relevante en la fase de Atracón/Intoxicación, es el tálamo, este es parte integral de los circuitos que subyacen a los procesos de recompensa (Haber & Calzavara, 2009) y de inhibición de la respuesta, media los procesos de prominencia y control en conductas orientadas a objetivos (De Bourbon-Teles et al., 2014; Parnaudeau et al., 2015). Estudios

recientes en roedores se han centrado en el papel del tálamo paraventricular (PVT) en la adicción, probablemente debido a sus amplias conexiones con el estriado ventral y dorsal (Vertes & Hoover, 2008). El PVT se ha centrado en el restablecimiento de los comportamientos de búsqueda de drogas y en la mediación de asociaciones entre drogas y señales relacionadas con las drogas. Se ha encontrado activación neural (evaluada mediante la expresión de c-Fos) (Wedzony et al., 2003) en el PVT después del restablecimiento del comportamiento de búsqueda de drogas en rata. Este restablecimiento puede corresponder a ansias / atracones / recaídas, y la activación del tálamo asociada con un aumento de los comportamientos de restablecimiento puede indicar una mayor prominencia asociada con las señales de la droga (Huang et al., 2018), el cual se observó en este caso, consumo de alcohol.

Tanto la corteza cerebral como el hipocampo son estructuras que se han descrito en la fase de *Preocupación-Anticipación* del ciclo de la adicción. Se ha observado que el comportamiento repetido asociado a la recompensa resulta en la aparición de hábitos. El cual es necesario para el establecimiento de la adicción (Singer et al., 2018). Si la exposición a la droga continua, se puede generar una reducción de la conexión de la corteza cerebral que van hacia el cuerpo estriado, interrumpiendo la selección de sobreactividad del control (Renteria et al., 2018) .

Otra investigación que muestra alteraciones en la corteza cerebral es la de Dudek y colaboradores en el 2015, ellos encontraron mayor activación cerebral medido con resonancia magnética funcional en la corteza y el cíngulo, en rata con preferencia al alcohol con un consumo de alcohol al 10%. Sin embargo, en esta investigación realizó un modelo de pre-exposición a la droga, haciendo más vulnerables a las ratas. Las activaciones de la corteza prefrontal se explican por las proyecciones de VTA y la sustancia nigra en los circuitos mesocortico-límbicos y nigroestriatales involucrados en las propiedades reforzantes de la droga (Dudek et al., 2015). Por lo tanto, existe evidencia tanto consistente con la noción de que el debilitamiento de los mecanismos de autocontrol se correlaciona con un rendimiento deficiente en los circuitos de corteza como consecuencia de adaptaciones inducidas por drogas en la red estriatal o, por daño directo a PFC (Tang et al., 2015; Winstanley et al., 2010). Es por ello, que la corteza prefrontal, es la principal región cerebral de múltiples intervenciones conductuales destinadas a fortalecer la función ejecutiva y disminuir la prominencia de incentivos de las drogas (Antonelli et al., 2021; Schluter et al., 2018).

En relación con el hipocampo, estudios indican que es una estructura involucrada en la fisiopatología de varios trastornos psiquiátricos, incluida la adicción a las drogas (Lester, 2011) . La exposición a señales y contextos asociados con las drogas de abuso aumenta la actividad hipocampal tanto en los humanos con dependencia al alcohol (Hermann et al., 2006) y en los modelos animales (Barr & Unterwald, 2015). Recientemente, se encontró que la inhibición de la transmisión sináptica en las células granulares del giro dentado, impulsa la búsqueda y el consumo de alcohol, lo cual sugiere el importante papel de GD en la transición a la adicción (Beroun et al., 2018).

Todas las alteraciones producto del consumo de alcohol se han asociado tanto a la literatura como a investigaciones recientes, por lo que consideramos que desarrollar modelos murinos que nos permitan evaluar la progresión del consumo de alcohol, son de gran utilidad para entender las posibles causas y consecuencias que genera el alto consumo de alcohol, los cuales son difíciles de cuantificar en humanos.

Por su parte, el modelo de predicción mostró que las regiones cerebrales encontradas en la interacción de sesión*grupo de nuestro modelo lineal de efectos mixtos son asociados con un alto consumo de alcohol en las ratas (*toma principal de alcohol g/Kg/24h*). Esto nos indica que es posible que el fenotipo cerebral nos permita identificar subgrupos de alto consumo, para ello, es importante recordar que alto consumo de alcohol es considerado como un predictor que incrementa la probabilidad de desarrollar un trastorno por consumo de alcohol (AUD) en edades tempranas (Goltseker et al., 2019), en nuestro caso, un decremento cerebral en la corteza prefrontal y tálamo y un incremento cerebral en el caudado-putamen y giro dentado. Sin embargo, no existe trabajos que intenten generar modelos de predicción de alto consumo en ratas, y nuestros hallazgos al no ser corregidos por FDR, no pueden ser generalizados, por lo que recomendamos realizar este tipo de modelos y probarlos en muestras independientes para determinar su desempeño y posteriormente su validación.

Finalmente, como se ha descrito con anterioridad, estas regiones cerebrales se han relacionado con cambios funcionales y estructurales medidos por la técnica de resonancia magnética y nos han permitido identificar alteraciones, sin embargo, con los resultados encontrados, no podemos generalizar nuestros resultados hasta realizar comprobaciones histológicas, principalmente la tinción de Kulver Barrera.

Limitaciones

El presente proyecto buscó encontrar el fenotipo cerebral medido por deformación basada en morfometría (DBM) en un modelo de alcoholismo. Aquí nosotros describimos cuales son las limitaciones que observamos durante el estudio.

- (1) El Trastorno por Consumo de Alcohol, es un trastorno que cuenta con criterios específicos para su diagnóstico en humanos (i.e., deseo persistente por reducir o controlar el consumo, afectaciones sociales e interpersonales, consumo continuo a pesar de problemas físicos y/o psicológicos), por lo que emular las condiciones en un modelo murino, se vuelve un reto, no solo para la presente investigación, sino para futuras investigaciones
- (2) Con la finalidad de conocer cuál era la dosis de alcohol en sangre consumida por el grupo experimental, se realizó la extracción de la muestra al finalizar las 20 sesiones de consumo de alcohol, sin embargo, no se analizó la medida de alcohol en sangre para este estudio.
- (3) No presentamos métricas conductuales que nos permitan abordar una relación con la motivación del consumo de alcohol y/o la presentación de un deterioro cognitivo asociado a su consumo.
- (4) La parcelación cerebral que se implementó para el análisis de DBM, carece de regiones cerebrales que se han descrito en el ciclo de la adicción (amígdala, núcleo habelunar e ínsula) (Volkow et al., 2019), obteniendo como resultados picos de deformación poco exactos como fue en el caso de la corteza cerebral.

Conclusión

El trastorno por consumo de alcohol es un trastorno que presenta alta prevalencia a nivel nacional e internacional, haciendo que sea un problema de salud pública. Encontrar los fenotipos cerebrales asociados al consumo de alcohol, es sin duda un reto para la neurociencia traslacional. De la misma manera, modelizar el trastorno de consumo de alcohol tiene muchas problemáticas actualmente, debido a la caracterización de los criterios que presenta el mismo. Sin embargo, la presente investigación realizó un estudio de medidas repetidas con la finalidad de observar la evolución del consumo de alcohol y sus alteraciones morfológicas asociadas. Siendo esta, una de las primeras investigaciones en donde se busca observar el consumo de alcohol en un contexto preclínico, ecológico y sin ningún tipo de inducción u administración forzada de dicho consumo. El modelo de acceso intermitente de alcohol a dos botellas (IA2BC), es un modelo de alcoholismo que tanto en la literatura como en la presente investigación fue replicable para generar un consumo crónico en rata.

Se encontraron alteraciones cerebrales asociadas al consumo crónico de alcohol en comparación con el grupo control. Hay un decremento local en el tálamo y la corteza cerebral, y un incremento local en el giro dentado y el caudado-putamen, a pesar de que estas deformaciones no fueron significativas por múltiples comparaciones, todas las áreas se encuentran involucradas en el ciclo de la adicción, descrito en la literatura.

La implementación de análisis estadísticos poco frecuentes, como son los modelos mixtos y los análisis basados en perspectiva Bayesiana, nos ayudan a modelar no solo las medias, sino, son la variabilidad por sujeto y así, tener una mejor estimación generando resultados más confiables de nuestro fenómeno de estudio.

A pesar de que nuestros hallazgos no son corregidos por múltiples comparaciones, estos resultados permiten ampliar el conocimiento de las fases de atracción intoxicación y preocupación anticipación, sosteniendo la teoría del circuito de la adicción. Estos hallazgos pueden continuar explorándose para analizar las alteraciones cerebrales del alto consumo de alcohol.

Material suplementario

Material para el modelo de acceso intermitente de alcohol

Materiales:

1. Bebederos 100 mL marca redkit.
2. Alcohol de caña al 96%.
3. Agua desionizada.
4. Parafilm

Todo el material y procedimiento, se encuentra disponible en línea, https://github.com/DiegoAngls/Alcohol_model.

Referencias

- Agarwal, D. P. (2001). Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes. *Pathologie Biologie*, 49(9), 703-709.
- American Psychiatric Association. (2013b). Guía de consulta de los criterios diagnósticos del DSM-5®. In *Guía de consulta de los criterios diagnósticos del DSM-5®*. <https://doi.org/10.1176/appi.books.9780890425657>
- American Psychological Association (APA). (2002). DSM-IV-TR Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. In *DSM-IV-TR Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales* (Issue 819).
- Amit, Z., Stern, M. H., & Wise, R. A. (1970). Alcohol preference in the laboratory rat induced by hypothalamic stimulation. *Psychopharmacologia*, 17(5), 367–377. <https://doi.org/10.1007/bf00403808>.
- Amodeo, L. R., Wills, D. N., Sanchez-Alavez, M., Nguyen, W., Conti, B., & Ehlers, C. L. (2018). Intermittent voluntary ethanol consumption combined with ethanol vapor exposure during adolescence increases drinking and alters other behaviors in adulthood in female and male rats. *Alcohol*, 73, 57-66.
- Antonelli, M., Fattore, L., Sestito, L., Di Giuda, D., Diana, M., & Addolorato, G. (2021). Transcranial Magnetic Stimulation: A review about its efficacy in the treatment of alcohol, tobacco and cocaine addiction. In *Addictive Behaviors*. <https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2020.106760>
- Ashburner, J., Hutton, C., Frackowiak, R., Johnsrude, I., Price, C., & Friston, K. (1998). Identifying global anatomical differences: Deformation-based morphometry. *Human Brain Mapping*. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0193\(1998\)6:5/6<348::AID-HBM4>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0193(1998)6:5/6<348::AID-HBM4>3.0.CO;2-P)
- Baker, T. B., Piper, M. E., McCarthy, D. E., Majeskie, M. R., & Fiore, M. C. (2004). Addiction Motivation Reformulated: An Affective Processing Model of Negative Reinforcement. *Psychological Review*. <https://doi.org/10.1037/0033-295X.111.1.33>
- Banerjee, N. (2014). Neurotransmitters in alcoholism: A review of neurobiological and genetic studies. In *Indian Journal of Human Genetics*. <https://doi.org/10.4103/0971-6866.132750>
- Barr, J. L., & Unterwald, E. M. (2015). Activity-regulated gene expression in immature neurons in the dentate gyrus following re-exposure to a cocaine-paired environment. *Hippocampus*. <https://doi.org/10.1002/hipo.22377>
- Belin-Rauscent, A., Fouyssac, M., Bonci, A., & Belin, D. (2016). How preclinical models evolved to resemble the diagnostic criteria of drug addiction. In *Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2015.01.004>

- Beroun, A., Nalberczak-Skóra, M., Harda, Z., Piechota, M., Ziółkowska, M., Cały, A., Pagano, R., & Radwanska, K. (2018). Generation of silent synapses in dentate gyrus correlates with development of alcohol addiction. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0119-4>
- Bürkner, P. C. (2018). Advanced Bayesian multilevel modeling with the R package brms. *R Journal*. <https://doi.org/10.32614/rj-2018-017>
- Carnicella, S., Ron, D., & Barak, S. (2014). Intermittent ethanol access schedule in rats as a preclinical model of alcohol abuse. In *Alcohol*. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.01.006>
- Chen, X. R., Zeng, J. Y., Shen, Z. W., Kong, L. M., & Zheng, W. Bin. (2017). Diffusion Kurtosis Imaging Detects Microstructural Changes in the Brain after Acute Alcohol Intoxication in Rats. *BioMed Research International*, 2017, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2017/4757025>
- Cicero, T. J. (1979). A Critique of Animal Analogues of Alcoholism. In *Biochemistry and Pharmacology of Ethanol*. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-3450-7_27
- Cippitelli, A., Damadzic, R., Singley, E., Thorsell, A., Ciccocioppo, R., Eskay, R., & Heilig, M. (2012). Pharmacological blockade of corticotropin-releasing hormone receptor 1 (CRH1R) reduces voluntary consumption of high alcohol concentrations in non-dependent Wistar rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 522–529. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2009.08.003>. Predictive
- Claus, E. D., Ewing, S. W. F., Filbey, F. M., Sabbineni, A., & Hutchison, K. E. (2011). Identifying neurobiological phenotypes associated with alcohol use disorder severity. *Neuropsychopharmacology*, 36(10), 2086-2096.
- Costardi, J. V. V., Nampo, R. A. T., Silva, G. L., FerreiraRibeiro, M. A., Stella, H. J., BredaStella, M., & Malheiros, S. V. P. (2015). A review on alcohol: From the central action mechanism to chemical dependency. In *Revista da Associacao Medica Brasileira*. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.61.04.381>
- Crabbe, J. C. (2016). Progress with nonhuman animal models of addiction. *Journal of Studies on Alcohol and Drugs*, 77(5), 696–699. <https://doi.org/10.15288/jsad.2016.77.696>
- De Bourbon-Teles, J., Bentley, P., Koshino, S., Shah, K., Dutta, A., Malhotra, P., Egner, T., Husain, M., & Soto, D. (2014). Thalamic control of human attention driven by memory and learning. *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.024>
- Demirakca, T., Ende, G., Kämmerer, N., Welzel-Marquez, H., Hermann, D., Heinz, A., & Mann, K. (2011). Effects of alcoholism and continued abstinence on brain volumes in both genders. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2011.01514.x>

- Dienes, Z., & Mclatchie, N. (2018). Four reasons to prefer Bayesian analyses over significance testing. *Psychonomic Bulletin and Review*. <https://doi.org/10.3758/s13423-017-1266-z>
- Dudek, M., Abo-Ramadan, U., Hermann, D., Brown, M., Canals, S., Sommer, W. H., & Hyytiä, P. (2015). Brain activation induced by voluntary alcohol and saccharin drinking in rats assessed with manganese-enhanced magnetic resonance imaging. *Addiction Biology*, *20*(6), 1012–1021. <https://doi.org/10.1111/adb.12179>
- Dudek, M., & Hyytiä, P. (2016). Alcohol preference and consumption are controlled by the caudal linear nucleus in alcohol-preferring rats. *European Journal of Neuroscience*, *43*(11), 1440–1448. <https://doi.org/10.1111/ejn.13245>
- Elliott, L. T., Sharp, K., Alfaro-Almagro, F., Shi, S., Miller, K. L., Douaud, G., Marchini, J., & Smith, S. M. (2018). Genome-wide association studies of brain imaging phenotypes in UK Biobank. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0571-7>
- Erdozain, A. M., & Callado, L. F. (2014). Neurobiological alterations in alcohol addiction: a review. *Adicciones*. <https://doi.org/10.20882/adicciones.40>
- Fidler, T. L., Powers, M. S., Ramirez, J. J., Crane, A., Mulgrew, J., Smitasin, P., & Cunningham, C. L. (2012). Dependence induced increases in intragastric alcohol consumption in mice. *Addiction Biology*. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2011.00363.x>
- Field, A., Miles, J., & Field, Z. (2012). *Discovering statistics using R*. Sage publications.
- Fowler, J. S., Volkow, N. D., Kassed, C. A., & Chang, L. (2007). Imaging the addicted human brain. In *Science & practice perspectives / a publication of the National Institute on Drug Abuse, National Institutes of Health*. <https://doi.org/10.1151/spp07324>
- Friston, K. (2010). The free-energy principle: A unified brain theory? In *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn2787>
- Friston, K. J., Redish, A. D., & Gordon, J. A. (2017). Computational Nosology and Precision Psychiatry. *Computational Psychiatry*. https://doi.org/10.1162/cpsy_a_00001
- Garriott, J. C., & Manno, J. M. (2008). Pharmacology and toxicology of ethyl alcohol.
- Gelman, A., & Hill, J. (2006). Data Analysis Using Regression and Multilevel/Hierarchical Models. In *Data Analysis Using Regression and Multilevel/Hierarchical Models*. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511790942>
- Gilpin, N. W., & Koob, G. F. (2008). Neurobiology of alcohol dependence: Focus on motivational mechanisms. In *Alcohol Research and Health*.
- Gipson, C. D., Kupchik, Y. M., & Kalivas, P. W. (2014). Rapid, transient synaptic plasticity in addiction. In *Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.032>

- Giuliano, C., Peña-Oliver, Y., Goodlett, C. R., Cardinal, R. N., Robbins, T. W., Bullmore, E. T., Belin, D., & Everitt, B. J. (2018). Evidence for a Long-Lasting Compulsive Alcohol Seeking Phenotype in Rats. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/npp.2017.105>
- Goerzen, D., Fowler, C., Devenyi, G. A., Germann, J., Madularu, D., Chakravarty, M. M., & Near, J. (2020). An MRI-Derived Neuroanatomical Atlas of the Fischer 344 Rat Brain. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63965-x>
- Goldstein, R. Z., & Volkow, N. D. (2002). Drug addiction and its underlying neurobiological basis: Neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *American Journal of Psychiatry*, *159*(10), 1642–1652. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.159.10.1642>
- Goltseker, K., Hopf, F. W., & Barak, S. (2019). Advances in behavioral animal models of alcohol use disorder. *Alcohol*, *74*, 73–82. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2018.05.014>
- Gronau, Q. F., Duizer, M., Bakker, M., & Wagenmakers, E. J. (2017). Bayesian mixture modeling of significant p values: A meta-analytic method to estimate the degree of contamination from H0. *Journal of Experimental Psychology: General*. <https://doi.org/10.1037/xge0000324>
- Haber, S. N., & Calzavara, R. (2009). The cortico-basal ganglia integrative network: The role of the thalamus. In *Brain Research Bulletin*. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.09.013>
- Hermann, D., Smolka, M. N., Wrase, J., Klein, S., Nikitopoulos, J., Georgi, A., Braus, D. F., Flor, H., Mann, K., & Heinz, A. (2006). Blockade of cue-induced brain activation of abstinent alcoholics by a single administration of amisulpride as measured with fMRI. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2006.00174.x>
- Hikosaka, O. (2010). The habenula: From stress evasion to value-based decision-making. In *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn2866>
- Holgate, J. Y., Shariff, M., Mu, E. W. H., & Bartlett, S. (2017). A rat drinking in the dark model for studying ethanol and sucrose consumption. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *11*(February), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00029>
- Holford, N.H.G. Clinical pharmacokinetics of ethanol. *Clin. Pharmacokinet.* 1987, *13*, 273-292.
- Hopf, F. W., & Lesscher, H. M. B. (2014). Rodent models for compulsive alcohol intake the need for animal models of compulsive alcohol intake HHS Public Access. *Alcohol*, *48*(3), 253–264. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.03.001>
- Huang, A. S., Mitchell, J. A., Haber, S. N., Alia-Klein, N., & Goldstein, R. Z. (2018). The thalamus in drug addiction: From rodents to humans. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0028>
- Huettel, S., Song, A., & McCarthy, G. (2004). Functional magnetic resonance imaging. In *New England Journal of Medicine* (Vol. 86, Issue 2, pp. 316–317). <https://doi.org/978-0-87893-286-3>

- INPREM, I. N. d P. R. de la F. M. (2017). Encuesta NAcional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco. *Encuesta NAcional de Consumo de Drogas, Alcohol y Tabaco, ENCODAT 2016-2017*, 1, 190.
- Jadhav, K. S., Magistretti, P. J., Halfon, O., Augsburger, M., & Boutrel, B. (2017). A preclinical model for identifying rats at risk of alcohol use disorder. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09801-1>
- Ji, D., Gilpin, N. W., Richardson, H. N., Rivier, C. L., & Koob, G. F. (2008). Effects of naltrexone, duloxetine, and a corticotropin-releasing factor type 1 receptor antagonist on atracón-like alcohol drinking in rats. *Behavioural Pharmacology*. <https://doi.org/10.1097/FBP.0b013e3282f3cf70>
- Kendler, K. S., & Neale, M. C. (2010). *Endophenotype: a conceptual analysis. Molecular psychiatry*, 15(8), 789-797.
- Koob, G. F. (2011). Theoretical frameworks and mechanistic aspects of alcohol addiction: Alcohol addiction as a reward deficit disorder. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. https://doi.org/10.1007/7854_2011_129
- Koob, G. F., & Le Moal, M. (1997). Drug abuse: Hedonic homeostatic dysregulation. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.278.5335.52>
- 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)
- Koob, G., & Le Moal, M. (2001). Drug Addiction, Dysregulation of Reward, and Allostasis. *Neuropsychopharmacology*, 24(2), 97–129. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00195-0](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00195-0)
- Kuhn, B. N., Kalivas, P. W., & Bobadilla, A. C. (2019). Understanding Addiction Using Animal Models. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13(November), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00262>
- Lee, M. D., & Wagenmakers, E. J. (2013). Bayesian cognitive modeling: A practical course. *Bayesian Cognitive Modeling: A Practical Course*, 1–264. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139087759>
- Lerch, J. P., Sled, J. G., & Henkelman, R. M. (2010). MRI phenotyping of genetically altered mice. *Methods in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-61737-992-5_17
- Lester, R. A. J. (2011). Cognitive mechanisms underlying relapse to nicotine. In *Reviews in the Neurosciences*. <https://doi.org/10.1515/RNS.2011.038>
- Liang, Z.-P., & Lauterbur, P. C. (2000). Principles of Magnetic Resonance Imaging. In *Radiation Research* (Vol. 177, Issue 4). <https://doi.org/10.1667/RR2620.1>

- Liu, S., Cai, W., Liu, S., Zhang, F., Fulham, M., Feng, D., Pujol, S., & Kikinis, R. (2015). Multimodal neuroimaging computing: a review of the applications in neuropsychiatric disorders. In *Brain Informatics*. <https://doi.org/10.1007/s40708-015-0019-x>
- Lo Coco, G., Melchiori, F., Oieni, V., Infurna, M. R., Strauss, B., Schwartz, D., Rosendahl, J., & Gullo, S. (2019). Group treatment for substance use disorder in adults: A systematic review and meta-analysis of randomized-controlled trials. *Journal of Substance Abuse Treatment*. <https://doi.org/10.1016/j.jsat.2019.01.016>
- Manzo-Avalos, S., & Saavedra-Molina, A. (2010). Cellular and mitochondrial effects of alcohol consumption. *International journal of environmental research and public health*, 7(12), 4281–4304. <https://doi.org/10.3390/ijerph7124281>
- McBride, W. J., Rodd, Z. A., Bell, R. L., Lumeng, L., & Li, T. K. (2014). The alcohol-preferring (P) and high-alcohol-drinking (HAD) rats - Animal models of alcoholism. In *Alcohol*. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2013.09.044>
- McElreath, R. (2018). Statistical rethinking: A bayesian course with examples in R and stan. In *Statistical Rethinking: A Bayesian Course with Examples in R and Stan*. <https://doi.org/10.1201/9781315372495>
- Melis, M., Spiga, S., & Diana, M. (2005). The Dopamine Hypothesis of Drug Addiction: Hypodopaminergic State. *International Review of Neurobiology*. [https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(05\)63005-X](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(05)63005-X).
- Mood, C. (2010). Logistic regression: Why we cannot do what we think we can do, and what we can do about it. *European sociological review*, 26(1), 67-82.
- National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. (2004). NIAAA Council Approves Definition of Atracón Drinking. *NIAAA Newsletter*.
- Nestler, E. J. (2013). Cellular basis of memory for addiction. *Dialogues in Clinical Neuroscience*. <https://doi.org/10.31887/dcms.2013.15.4/enestler>
- Norberg, A.; Jones, A.W.; Hahn, R.G.; Gabrielsson, J.L. Role of variability in explaining ethanol pharmacokinetics: Research and forensic applications. *Clin. Pharmacokinet.* 2003, 42, 1-31.
- Noronha, A., Cui, C., Harris, R. A., & Crabbe, J. C. (2014). Neurobiology of Alcohol Dependence. In *Neurobiology of Alcohol Dependence*. <https://doi.org/10.1016/C2012-0-02501-X>
- O'Reilly, J. X., Jbabdi, S., & Behrens, T. E. J. (2012). How can a Bayesian approach inform neuroscience? In *European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2012.08010.x>
- Pando-Naude, V., Toxtó, S., Fernández-Lozano, S., Parsons, C. E., Alcauter, S., & Garza-Villarreal, E. A. (2021). Gray and white matter morphology in substance use disorders: a

neuroimaging systematic review and meta-analysis. *Translational Psychiatry*.
<https://doi.org/10.1038/s41398-020-01128-2>.

- Pang, M., Kaufman, J. S., & Platt, R. W. (2013). Studying noncollapsibility of the odds ratio with marginal structural and logistic regression models. *Statistical methods in medical research*, 25(5), 1925-1937.
- Parnaudeau, S., Taylor, K., Bolkan, S. S., Ward, R. D., Balsam, P. D., & Kellendonk, C. (2015). Mediodorsal thalamus hypofunction impairs flexible goal-directed behavior. *Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2014.03.020>
- Parr, T., Rees, G., & Friston, K. J. (2018). Computational neuropsychology and bayesian inference. In *Frontiers in Human Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2018.00061>
- Perez-Ramirez, U., Diaz-Parra, A., Ciccocioppo, R., Canals, S., & Moratal, D. (2017). Brain functional connectivity alterations in a rat model of excessive alcohol drinking: A resting-state network analysis. *Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS*, 3016–3019.
<https://doi.org/10.1109/EMBC.2017.8037492>
- Pfefferbaum, A., Zahr, N. M., Mayer, D., Rohlfing, T., & Sullivan, E. V. (2015). Dynamic Responses of Selective Brain White Matter Fiber Tracts to Atracón Alcohol and Recovery in the Rat. *PLOS ONE*, 10(4), e0124885. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124885>
- Priddy, B. M., Carmack, S. A., Thomas, L. C., Vendruscolo, J. C., Koob, G. F., & Vendruscolo, L. F. (2017). Sex, strain, and estrous cycle influences on alcohol drinking in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 152, 61-67
- Proust-Lima, C., Philipps, V., & Liqueur, B. (2017). Estimation of extended mixed models using latent classes and latent processes: The R package lcmm. *Journal of Statistical Software*. <https://doi.org/10.18637/jss.v078.i02>
- R Core Team. (2019). R: A language and environment for statistical computing. In *R Foundation for Statistical Computing*.
- Radke, A. K., Jury, N. J., Kocharian, A., Marcinkiewicz, C. A., Lowery-Gionta, E. G., Pleil, K. E., McElligott, Z. A., McKlveen, J. M., Kash, T. L., & Holmes, A. (2017). Chronic EtOH effects on putative measures of compulsive behavior in mice. *Addiction Biology*.
<https://doi.org/10.1111/adb.12342>
- Renteria, R., Baltz, E. T., & Gremel, C. M. (2018). Chronic alcohol exposure disrupts top-down control over basal ganglia action selection to produce habits. *Nature Communications*.
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-02615-9>

- Roberto, M., Gilpin, N. W., & Siggins, G. R. (2012). The central amygdala and alcohol: Role of γ -aminobutyric acid, glutamate, and neuropeptides. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012195>
- Rojas, H. A., & Neri, I. P. (2017). Glutamato para principiantes. *Archivos de Neurociencias*, 21(3), 25-28.
- 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 Atracón-Like Drinking. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 37(4), 635–643. <https://doi.org/10.1111/acer.12008>
- Sanchez-Roige, S., & Palmer, A. A. (2020). Emerging phenotyping strategies will advance our understanding of psychiatric genetics. In *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0609-7>
- Sanna, E., Talani, G., Busonero, F., Pisu, M. G., Purdy, R. H., Serra, M., & Biggio, G. (2004). Brain steroidogenesis mediates ethanol modulation of GABAA receptor activity in rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 24(29), 6521-6530.
- Schluter, R. S., van Holst, R. J., & Goudriaan, A. E. (2018). Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) in alcohol dependence: Study protocol of a randomized controlled clinical trial of efficacy and working mechanisms. *BMC Psychiatry*. <https://doi.org/10.1186/s12888-018-1759-y>
- Schröder, L., & Faber, C. (2011). In vivo NMR imaging: methods and protocols. In *in vivo NMR Imaging: Methods and Protocols*. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-219-9>
- Sengupta P. (2013). The Laboratory Rat: Relating Its Age with Human's. *International journal of preventive medicine*, 4(6), 624–630.
- Shippenberg, T. S., & Koob, G. F. (2002). Recent advances in animal models of drug addiction and alcoholism. *Neuropsychopharmacology: The fifth generation of progress*, 13, 81-97.
- 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>
- Sinclair, J. D., & Senter, R. J. (1967). Increased preference for ethanol in rats following alcohol deprivation. *Psychonomic Science*. <https://doi.org/10.3758/BF03330642>
- Singer, B. F., Fadanelli, M., Kawa, A. B., & Robinson, T. E. (2018). Are cocaine-seeking “habits” necessary for the development of addiction-like behavior in rats? *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2458-17.2017>

- Skóra, M. N., Pattij, T., Beroun, A., Kogias, G., Mielenz, D., de Vries, T., Radwanska, K., & Müller, C. P. (2020). Personality driven alcohol and drug abuse: new mechanisms revealed. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.06.023>
- Spoelder, M., Flores Dourojeanni, J. P., de Git, K. C. G., Baars, A. M., Lesscher, H. M. B., & Vanderschuren, L. J. M. J. (2017). Individual differences in voluntary alcohol intake in rats: relationship with impulsivity, decision making and Pavlovian conditioned approach. *Psychopharmacology*, *234*(14), 2177–2196. <https://doi.org/10.1007/s00213-017-4617-6>
- Spoelder, M., Hesseling, P., Baars, A. M., Lozeman-van 't Klooster, J. G., Rotte, M. D., Vanderschuren, L. J. M. J., & Lesscher, H. M. B. (2015). Individual Variation in Alcohol Intake Predicts Reinforcement, Motivation, and Compulsive Alcohol Use in Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, *39*(12), 2427–2437. <https://doi.org/10.1111/acer.12891>
- Spoelder, M., Pol, S., Janssen, B. S. G., Baars, A. M., Vanderschuren, J. M. J., & Lesscher, H. M. B. L. (2017). Loss of control over alcohol seeking in rats depends on individual vulnerability and duration of alcohol consumption experience. *Behavioural Pharmacology*, *28*(5), 334–344. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000304>
- Stan Development Team. (2020). Stan Modeling Language User's Guide and Reference Manual, Version 2.19.2. *Interaction Flow Modeling Language*.
- Stephan, K. E., Penny, W. D., Daunizeau, J., Moran, R. J., & Friston, K. J. (2009). Bayesian model selection for group studies. *NeuroImage*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.03.025>
- Tang, Y. Y., Posner, M. I., Rothbart, M. K., & Volkow, N. D. (2015). Circuitry of self-control and its role in reducing addiction. In *Trends in Cognitive Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2015.06.007>
- Tiffany, S. T., Carter, B. L., & Singleton, E. G. (2000). Challenges in the manipulation, assessment and interpretation of craving relevant variables. *Addiction*. <https://doi.org/10.1080/09652140050111753>
- Toga, A. W. (2015). Brain Mapping: An Encyclopedic Reference. In *Brain Mapping: An Encyclopedic Reference*. <https://doi.org/10.1016/C2011-1-07037-6>
- Uhl, G. R., Koob, G. F., & Cable, J. (2019). The neurobiology of addiction. In *Annals of the New York Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1111/nyas.13989>
- van Huijstee, A. N., & Mansvelder, H. D. (2015). Glutamatergic synaptic plasticity in the mesocorticolimbic system in addiction. In *Frontiers in Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00466>
- Vendruscolo, L. F., & Roberts, A. J. (2014). Operant alcohol self-administration in dependent rats: Focus on the vapor model. In *Alcohol*. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2013.08.006>

- Vengeliene, V., Bilbao, A., & Spanagel, R. (2014). The alcohol deprivation effect model for studying relapse behavior: A comparison between rats and mice. In *Alcohol*. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2014.03.002>
- Vertes, R. P., & Hoover, W. B. (2008). Projections of the paraventricular and paratenial nuclei of the dorsal midline thalamus in the rat. *Journal of Comparative Neurology*. <https://doi.org/10.1002/cne.21679>
- Vetreno, R. P., Yaxley, R., Paniagua, B., & Crews, F. T. (2016). Diffusion tensor imaging reveals adolescent ethanol-induced brain structural integrity alterations in adult rats that correlate with behavioral dysfunction. *Addiction Biology*, 21(4), 939–953. <https://doi.org/10.1111/adb.12232>
- Vetreno, R. P., Yaxley, R., Paniagua, B., Johnson, G. A., & Crews, F. T. (2017). Adult rat cortical thickness changes across age and following adolescent intermittent ethanol treatment. *Addiction Biology*, 22(3), 712–723. <https://doi.org/10.1111/adb.12364>
- Volkow, N. D., Koob, G. F., & McLellan, A. T. (2016). Neurobiologic Advances from the Brain Disease Model of Addiction. *The New England Journal of Medicine*, 374(4), 363–371. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1511480>
- Volkow, N. D., Michaelides, M., & Baler, R. (2019). The neuroscience of drug reward and addiction. *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2018>
- 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., Telang, F., Fowler, J. S., Logan, J., Jayne, M., Ma, Y., Pradhan, K., & Wong, C. (2007). Profound decreases in dopamine release in striatum in detoxified alcoholics: Possible orbitofrontal involvement. *Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3371-07.2007>
- Wedzony, K., Koros, E., Czyrak, A., Chocyk, A., Czepiel, K., Fijal, K., Mackowiak, M., Rogowski, A., Kostowski, W., & Bienkowski, P. (2003). Different pattern of brain c-Fos expression following re-exposure to ethanol or sucrose self-administration environment. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s00210-003-0811-7>
- West, R. K., Maynard, M. E., & Leasure, J. L. (2018). Ethanol effects on prefrontal cortex neurons, spatial working memory and task-induced neuronal activation in male and female rats. *Physiology and Behavior*, 188(October 2017), 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.01.027>
- Wilkie, M.B.; Besheer, J.; Kelley, S.P.; Kumar, S.; O'Buckley, T.K.; Morrow, A.L.; Hodge, C.W. Acute ethanol administration rapidly increases phosphorylation of conventional protein kinase C in specific mammalian brain regions in vivo. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2007, 31, 1259-1267.

- Winstanley, C. A., Olausson, P., Taylor, J. R., & Jentsch, J. D. (2010). Insight into the relationship between impulsivity and substance abuse from studies using animal models. In *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2010.01215.x>
- Wise, R. A. (1973). Voluntary ethanol intake in rats following exposure to ethanol on various schedules. *Psychopharmacologia*. <https://doi.org/10.1007/BF00414034>
- Wise, R. A. (2009). Roles for nigrostriatal-not just mesocorticolimbic-dopamine in reward and addiction. *Trends in Neurosciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.06.004>
- Wolffgramm, J., & Heyne, A. (1991). Social behavior, dominance, and social deprivation of rats determine drug choice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 38(2), 389–399. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(91\)90297-F](https://doi.org/10.1016/0091-3057(91)90297-F)
- Wscieklica, T., Le Sueur-Maluf, L., Prearo, L., Conte, R., Viana, M. de B., & Céspedes, I. C. (2019). Chronic intermittent ethanol administration differentially alters DeltaFosB immunoreactivity in cortical-limbic structures of rats with high and low alcohol preference. *American Journal of Drug and Alcohol Abuse*. <https://doi.org/10.1080/00952990.2019.1569667>
- Yager, L. M., Garcia, A. F., Wunsch, A. M., & Ferguson, S. M. (2015). The ins and outs of the striatum: Role in drug addiction. In *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.033>
- Zahr, N. M., Lenart, A. M., Karpf, J. A., Casey, K. M., Pohl, K. M., Sullivan, E. V., & Pfefferbaum, A. (2020). Multi-modal imaging reveals differential brain volumetric, biochemical, and white matter fiber responsivity to repeated intermittent ethanol vapor exposure in male and female rats. *Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108066>
- Zahr, N. M., Mayer, D., Rohlfing, T., Orduna, J., Luong, R., Sullivan, E. V., & Pfefferbaum, A. (2013). A mechanism of rapidly reversible cerebral ventricular enlargement independent of tissue atrophy. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.11>
- Zhao, Q., Fritz, M., Pfefferbaum, A., Sullivan, E. V., Pohl, K. M., & Zahr, N. M. (2018). Jacobian maps reveal under-reported brain regions sensitive to extreme ethanol intoxication in the rat. *Frontiers in Neuroanatomy*, 12(December). <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00108>