RIDAA
Repositorio Institucional
Digital de Acceso Abierto de la
Universidad Nacional de Quilmes

Universidad
Nacional
de Quilmes

Acosta, Julieta

Regulación circadiana de los mecanismos de procesamiento temporal y de motivación : rol de dopamina y los genes reloj

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:
Acosta, J. (2024). Regulación circadiana de los mecanismos de procesamiento temporal y de motivación: rol de dopamina y los genes reloj. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/4436

Puede encontrar éste y otros documentos en: https://ridaa.unq.edu.ar

Universidad Nacional de Quilmes
Roque Sáenz Peña 352 // Bernal
Buenos Aires // Argentina
t.: (+41 11) 4365 7100
f.: (+54 11) 4365 7101
info@unq.edu.ar

Julieta Acosta, Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto,
Mayo de 2024, pp. 288,
http://ridaa.unq.edu.ar,
Universidad Nacional de Quilmes, Secretaría de Posgrado,
Doctorado en Ciencia y Tecnología

Regulación circadiana de los mecanismos de procesamiento temporal y de motivación: rol de dopamina y los genes reloj

TESIS DOCTORAL

Julieta Acosta

jacosta9@uvq.edu.ar

Resumen

El sistema circadiano está presente en prácticamente todos los seres vivos, y modula la expresión rítmica de diversos procesos conductuales y fisiológicos. En mamíferos, el reloj circadiano central se ubica en los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo (NSQ), y es el encargado de coordinar y poner en sincronía los ritmos circadianos de todo el organismo. A su vez, el sistema de recompensa cerebral es esencial para la supervivencia, ya que se encarga de integrar los estímulos del ambiente y generar respuestas que fomentan la búsqueda y obtención de recompensas, así como de regular las emociones y estados de ánimo. Uno de los comportamientos regulados por el sistema de recompensa es la motivación. Podemos definir a la motivación como el conjunto de procesos biológicos y psicológicos que guía el comportamiento hacia la búsqueda de un objetivo determinado percibido como una recompensa. La comida es la recompensa natural más potente entre las especies. Se sabe que la búsqueda de alimento requiere de la activación de mecanismos motivacionales que están mediados por la transmisión dopaminérgica y serotoninérgica en los circuitos cortico-estriatales y cortico-límbicos del cerebro. Muchas de estas regiones cerebrales y sistemas de neurotransmisores están reguladas por el sistema circadiano.

En la presente tesis se propuso estudiar cómo el sistema circadiano modula el comportamiento de motivación por una recompensa de comida en ratones, y qué señales externas sincronizan este proceso. En el Capítulo I, se estudió la expresión rítmica de la motivación por una recompensa de comida bajo un ciclo normal de luz/oscuridad y bajo condiciones constantes, para evidenciar la naturaleza endógena circadiana del comportamiento. Asimismo, se evaluó si dicha ritmicidad se mantenía en el envejecimiento. En el Capítulo II, se estudió cómo se veía afectada la motivación y otros comportamientos regulados por el sistema de recompensa bajo condiciones ambientales que promueven la disrupción del sistema circadiano. Para tal fin, se utilizó un modelo de arritmicidad circadiana

causado por exposición a luz constante y un modelo de desincronización interna forzada causada por un protocolo de jet-lag crónico experimental. Finalmente, en el Capítulo III se estudió cómo la sincronización no-fótica por comida influye en la motivación por una recompensa. Para ello, se utilizaron protocolos de alimentación restringida temporalmente (TRF) con administración manual de comida o con administración mediante un sistema de feeders automatizados, con el objetivo de desacoplar la sincronización por comida de la sincronización por el ciclo de luz/oscuridad. Luego, utilizando tanto ratones macho como hembras, se estudió cómo la motivación por una recompensa se veía modulada por ambos agentes sincronizadores.

El estudio del comportamiento de motivación y del sistema de recompensa cerebral tiene una enorme relevancia en las áreas de la neurociencia y la medicina, principalmente en aquéllas que estudian desórdenes neurológicos, psiquiátricos, alimenticios, adicciones y trastornos del estado de ánimo en humanos. Los resultados obtenidos en la presente tesis aportan información novedosa sobre la influencia del sistema circadiano y de los sincronizadores ambientales en los comportamientos dirigidos a la obtención de recompensas.

Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto, Universidad Nacional de Quilmes

TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTORA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES

Regulación circadiana de los mecanismos de procesamiento temporal y de motivación: rol de dopamina y los genes reloj.

Autora: Lic. Julieta Acosta

Directora: Dra. Patricia V. Agostino

Co-director: Dr. Diego A. Golombek

Laboratorio de Cronobiología

Departamento de Ciencia y Tecnología

Universidad Nacional de Quilmes

2024

Índice

INTRODUCCIÓN GENERAL ..... - 10 -

1. El Sistema Circadiano ..... - 11 -

1.1 Una breve historia del tiempo ..... - 11 -

1.2 Una breve historia del tiempo (biológico): el nacimiento de la Cronobiología ..... - 12 -

1.3 ¿Y para qué necesitamos ritmos biológicos? ..... - 14 -

1.4 Parámetros de estudio de un ritmo ..... - 16 -

1.5 Características de los ritmos circadianos ..... - 18 -

1.6 Organización del Sistema Circadiano en mamíferos ..... - 20 -

1.6.1 En la búsqueda del reloj central ..... - 20 -

1.6.2 El reloj central: los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo ..... - 22 -

1.6.3 Componentes moleculares del reloj circadiano ..... - 25 -

1.6.4 Las vías de salidas del reloj central y los osciladores periféricos ..... - 28 -

1.7 ¿Cómo podemos estudiar los ritmos circadianos en el laboratorio? ..... - 30 -

1.7.1 De cómo analizar ritmos en roedores, construir actogramas y otras herramientas cronobiológicas ..... - 32 -

1.8 Sincronización, entrenamiento y enmascaramiento de los ritmos circadianos ..... - 38 -

1.9 Sincronización por disponibilidad temporal de alimento ..... - 40 -

2. Motivación por una recompensa ..... - 42 -

2.1 ¿Qué es la motivación por una recompensa? ..... - 42 -

2.1.1 Teorías y conceptos del comportamiento de motivación por una recompensa ..... - 44 -

2.2 Circuitos neuronales involucrados en la motivación ..... - 46 -

2.2.1 Las neuronas dopaminérgicas de VTA ..... - 49 -

2.2.2 VTA integra las señales homeostáticas para transformar el “hambre” en motivación ..... - 51 -

2.2.3 El núcleo accumbens del cuerpo estriado ..... - 54 -

2.3 ¿Cómo podemos medir la motivación en roedores? ..... - 59 -

3. Referencias bibliográficas de la Introducción General ..... - 64 -

CAPÍTULO I ..... - 72 -

I.1 Introducción ..... - 73 -

I.1.1 Modulación circadiana de comportamientos relacionados con la obtención de una recompensa ..... - 74 -

I.1.2 Expresión de genes reloj en áreas cortico-límbicas ..... - 75 -

I.1.3 Modulación circadiana de la señalización dopaminérgica en los circuitos neuronales de la recompensa ..... - 77 -
I.1.4 Vías de señalización indirectas desde los NSQ hacia el sistema de recompensa ..... - 79 -
I.2 Objetivos ..... - 82 -
I.3 Materiales y Métodos ..... - 84 -
I.3.1 Animales y condiciones de alojamiento ..... - 85 -
I.3.2 Registro de actividad locomotora ..... - 86 -
I.3.3 Protocolo de motivación hacia una recompensa ..... - 86 -
I.3.3.1 Equipo de entrenamiento ..... - 86 -
I.3.3.2 Procedimiento ..... - 87 -
I.3.3.3 Procesamiento de los datos y análisis de los resultados de motivación ..... - 89 -
I.3.4. Grupos y condiciones experimentales ..... - 91 -
I.3.5 Análisis de datos ..... - 94 -
I.3.5.1 Análisis de los datos para la cuantificación de los niveles motivacionales ..... - 95 -
I.3.5.2 Análisis de los datos de la dinámica de la respuesta ..... - 96 -
I.4 Resultados ..... - 98 -
I.4.1 Experimento 1: Ritmo diario en la motivación por una recompensa de comida ..... - 99 -
I.4.2. Experimento 2: Variación día-noche de la motivación por una recompensa en ratones jóvenes y viejos bajo condiciones de LD y DD ..... - 103 -
I.4.3. Experimento 3: Variación día-noche en la motivación por una recompensa de chocolate en ratones jóvenes y viejos alimentados *ad libitum* ..... - 114 -
I.5 Discusión ..... - 121 -
I.5.1. Existe un ritmo diario en la motivación por una recompensa de comida ..... - 124 -
I.5.2. Las variaciones diarias en la motivación por una recompensa de comida tienen carácter endógeno y persisten en el envejecimiento ..... - 127 -
I.5.3 Experimento 3: El componente hedónico de la alimentación presenta una variación diaria - 132 -
I.5.4 Conclusiones del Capítulo I ..... - 136 -
I.6 Referencias bibliográficas del Capítulo I ..... - 138 -
CAPÍTULO II ..... - 142 -
II.1 Introducción ..... - 143 -
II.1.1 Modelos de sincronización fótica ..... - 144 -
II.1.1.1 Rangos de entrenamiento ..... - 147 -
II.1.2 Desincronización del sistema circadiano ..... - 148 -

II.1.3 Modelo de arritmicidad circadiana causada por luz constante (LL) ..... - 149 -
II.1.4 Modelo de desincronización circadiana causada por protocolos de *jet lag* experimental .- 152 -
II.2 Objetivos ..... - 155 -
II.3 Materiales y Métodos ..... - 157 -
II.3.1. Animales y condiciones de alojamiento..... - 158 -
II.3.2. Registro de actividad locomotora ..... - 159 -
II.3.3 Protocolo experimental de arritmicidad circadiana causada por luz constante (LL)..... - 159 -
II.3.3.1 Grupos y diseño experimental ..... - 160 -
II.3.3.2 Mediciones del peso corporal y de ingesta de alimento ..... - 160 -
II.3.3.3 Motivación por una recompensa de comida ..... - 161 -
II.3.3.4 Análisis de los datos ..... - 161 -
II.3.4 Protocolo experimental de desincronización circadiana mediante un modelo *jet-lag* crónico (JLC) ..... - 161 -
II.3.4.1 Grupos y diseño experimental ..... - 163 -
II.3.4.2 Mediciones del peso corporal y de ingesta de alimento ..... - 164 -
II.3.4.3 Test de preferencia de sacarosa (SPT) ..... - 165 -
II.3.4.4 Test de laberinto en cruz elevado (EPM)..... - 165 -
II.3.4.5 Test de campo abierto (OF) ..... - 166 -
II.3.4.6 Motivación por una recompensa de comida (protocolo de tasa progresiva, PR) ..... - 166 -
II.3.4.7 Test de suspensión por la cola (TST) ..... - 166 -
II.3.4.8 Análisis de los datos ..... - 167 -
II.4 Resultados ..... - 168 -
II.4.1 Motivación por una recompensa de comida bajo condiciones de arritmicidad circadiana causa por luz constante (LL)..... - 169 -
II.4.2 Motivación y otros comportamientos asociados al sistema de recompensa bajo un modelo de desincronización circadiana causada por un *jet lag* crónico (JLC) experimental..... - 176 -
II.4.2.1 Motivación por una recompensa de comida bajo condiciones de JLC ..... - 179 -
II.4.2.2 Evaluación de conductas de tipo ansiosas, depresivas y anhedonia en ratones bajo condiciones de JLC ..... - 185 -
II.5. Discusión..... - 192 -
5.1 La arritmicidad circadiana causada por exposición a luz constante (LL) afecta el ritmo y los niveles de motivación por una recompensa de comida ..... - 193 -
5.2 La desincronización forzada causada por un protocolo de JLC experimental disminuye la motivación por una recompensa de comida ..... - 199 -

5.3 La desincronización forzada causada por un protocolo de JLC experimental induce comportamientos de tipo ansiosos y depresivos ..... - 204 -

II.5.4. Conclusiones del Capítulo II ..... - 207 -

II.6 Referencias bibliográficas del Capítulo II ..... - 208 -

CAPÍTULO III ..... - 212 -

III.1 Introducción ..... - 213 -

III.1.1 El oscilador sincronizado por comida (FEO) ..... - 214 -

III.1.2 Metodologías de estudio de la sincronización por comida ..... - 215 -

III.1.3 Restricción alimentaria temporal y su implicancia en el sistema de recompensa y los osciladores periféricos ..... - 217 -

III.2 Objetivos ..... - 220 -

III.3 Materiales y Métodos ..... - 222 -

III.3.1 Puesta a punto del protocolo de alimentación restringida temporalmente ..... - 223 -

III.3.1.1 Animales y condiciones de alojamiento ..... - 223 -

III.3.1.2 Registro de actividad locomotora ..... - 224 -

III.3.1.3 Protocolo de alimentación restringida temporalmente (TRF) con administración manual del alimento ..... - 224 -

III.3.1.4 Grupos y diseño experimental ..... - 225 -

III.3.1.5 Mediciones del peso corporal y de ingesta diaria de alimento ..... - 228 -

III.3.1.6 Motivación por una recompensa de comida ..... - 228 -

III.3.1.7 Análisis de los datos ..... - 228 -

III.3.2 Protocolo de alimentación restringida temporalmente utilizando *feeders* ..... - 230 -

III.3.2.1 Animales y condiciones de alojamiento ..... - 230 -

III.3.2.2 Registro de actividad locomotora en rueda ..... - 231 -

III.3.2.3 Protocolo de alimentación restringida temporalmente (TRF) con *feeders* ..... - 231 -

III.3.2.4 Grupos y diseño experimental ..... - 232 -

III.3.2.5 Mediciones del peso corporal y de ingesta diaria de alimento ..... - 233 -

III.3.2.6 Motivación por una recompensa de comida ..... - 235 -

III.3.2.7 Análisis de los datos ..... - 235 -

III.4 Resultados ..... - 237 -

III.4.1 Motivación por una recompensa de comida en un protocolo de TRF con administración manual de la comida ..... - 238 -

III.4.1.1 Patrones de actividad locomotora en el protocolo de TRF ..... - 239 -

III.4.1.3 Consumo diario de comida y pesos en el protocolo de TRF ..... - 243 -

III.4.1.3 Motivación por una recompensa de comida en el protocolo de TRF .....- 246 -

III.4.2 Motivación por una recompensa de comida en ratones macho y hembra bajo un protocolo de TRF con administración de comida mediante *feeders* automatizados.....- 250 -

III.4.2.1 Patrones de actividad locomotora y de alimentación en el protocolo de TRF con *feeders* automatizados.....- 252 -

III.4.2.2 Consumo de comida y pesos en machos y hembras bajo el protocolo de TRF .....- 256 -

III.4.2.3 Motivación por una recompensa de comida en machos y hembras bajo TRF .....- 260 -

III.5 Discusión.....- 268 -

III.5.1 La motivación por una recompensa de comida forma parte de la FAA y su variación diaria se ve afectada bajo un protocolo de TRF durante el día.....- 270 -

III.5.2 El desacople entre la sincronización por luz y por comida desencadena respuestas motivacionales específicas según el sexo en ratones bajo TRF .....- 271 -

III.5.3 Conclusiones del Capítulo III .....- 277 -

III.6 Referencias Bibliográficas del Capítulo III .....- 279 -

CONCLUSIONES FINALES .....- 281 -

AGRADECIMIENTOS.....- 286 -

Introducción General

1. El Sistema Circadiano

1.1 Una breve historia del tiempo

Desde tiempos inmemorables, la humanidad ha tratado de entender, explicar o filosofar sobre el concepto del tiempo. En la antigua mitología griega, el tiempo estaba personificado por el dios Cronos, una fuerza ineludible e imparable que regía el destino de dioses y mortales por igual. Filósofos griegos como Platón (427 – 347 a.C.), describieron el tiempo como una imagen móvil de la eternidad, creado junto con el universo, y que podía ser medido mediante los ciclos regulares de los cuerpos celestes.

En la Edad Media, el pensador San Agustín (354 – 430 d.C.) reflexionó que el tiempo está intrínsecamente ligado a la experiencia humana. Según este filósofo, lo que realmente medimos no es el tiempo en sí, sino los cambios percibidos en las cosas. El pasado se mide por los recuerdos, el presente por la percepción, y el futuro por las expectativas. De esta manera, el tiempo se convierte en una extensión de nuestra mente, una forma de nuestra conciencia.

En el siglo XVIII, Isaac Newton (1643 – 1727) definió al tiempo como absoluto, verdadero y matemático, distinguiéndolo claramente de una percepción más relativa y humana del mismo. Para Newton, el tiempo absoluto es independiente de cualquier evento externo, y no es afectado por el movimiento físico o por los cambios en el entorno. Asimismo, lo distinguió del tiempo relativo, siendo este último una medida perceptible y aparente del tiempo absoluto. El tiempo relativo puede ser cuantificado por el movimiento de objetos (el sol, las estrellas, los relojes mecánicos) y es el que utilizamos en la vida cotidiana para dar seguimiento al paso de las horas, días y años.

La visión newtoniana del tiempo como una entidad absoluta y universalmente aplicable fue esencial para el desarrollo de la física clásica. Científicos posteriores, como Albert Einstein (1879 – 1955), han refinado estas teorías introduciendo conceptos del tiempo como algo que puede variar y ser relativo al observador. Asimismo, el físico Stephen Hawking, contemporáneo a nuestra época – y de quién hemos plagiado, con permiso, el título de esta sección – en sus trabajos en física teórica y cosmología, discutió la naturaleza del tiempo desde el *Big Bang* hasta

los agujeros negros, explorando conceptos como la unidireccionalidad del tiempo y la posibilidad de hacer viajes a través de él.

Tras esta muy breve reseña histórica, queda claro que descifrar qué es el tiempo es una ardua, sino imposible, tarea que ha fascinado a la humanidad por miles de años y que, hasta el día de hoy, resulta difícil de explicar con certeza. Sin embargo, hay algo que sí podemos hacer: medir el tiempo. Este desafío, abocado a la biología, ha sido abordado por una disciplina científica conocida como la Cronobiología. En la siguiente sección ahondaremos un poco sobre su historia.

1.2 Una breve historia del tiempo (biológico): el nacimiento de la Cronobiología

El planeta en el que habitamos es un entorno cíclico. El movimiento de rotación de la Tierra sobre su propio eje produce, en aproximadamente 24 horas, los días y las noches sucesivos. Asimismo, el movimiento de traslación alrededor del Sol completa un ciclo en 365.25 días, lo que resulta en las distintas estaciones que experimentamos a lo largo del año. Todos los organismos y formas de vida que han habitado este planeta desde sus inicios, han experimentado estos cambios ambientales cíclicos. En este sentido, la evolución no sólo ha generado adaptaciones físicas y biológicas para colonizar y prosperar en diversos ecosistemas, sino que también ha generado mecanismos de anticipación y respuesta a los cambios periódicos del entorno.

Por un lado, la adaptación a los ciclos naturales en las variables ambientales ha permitido que los distintos organismos habitaran (desde un punto de vista temporal) distintos nichos ecológicos, dando lugar a las especies nocturnas, diurnas o crepusculares. Esta diferenciación en los patrones de actividad y comportamiento les ha proporcionado ventajas adaptativas específicas, como la capacidad de aprovechar recursos disponibles en momentos particulares del día o de evitar depredadores o competidores. Por otro lado, el ciclo natural de luz/oscuridad, con su duración de 24 horas, ha tenido una particular influencia en el desarrollo de ritmos dentro del organismo (ritmos biológicos) que oscilan con la misma periodicidad. A estas oscilaciones diarias las llamamos **ritmos circadianos** por su significado en el latín: "*circa*" que significa "cerca" y "*diem*" "día", es decir, ritmos cercanos a un día. Así, podemos observar en las distintas especies ritmos circadianos en una variedad de procesos fisiológicos y comportamentales, como los ritmos de sueño-vigilia, de temperatura corporal, de alimentación, de secreciones hormonales y de

patrones metabólicos. Asimismo, no siendo tan “mamíferocentristas”, existen ritmos en la fotosíntesis, la floración, la producción de metabolitos y compuestos bioquímicos, la capacidad de infección y colonización, entre otros. Estos ritmos endógenos les permiten a los organismos adaptarse a los ritmos exógenos del ambiente y anticiparse a las fluctuaciones diarias, generando una eficiencia energética que garantiza la supervivencia. Además, y debido a que no todo lo que oscila en el ambiente lo hace con un período de 24 horas, existen también ritmos biológicos anuales o estacionales (llamados ritmos infradianos) como el ciclo menstrual, las migraciones estacionales o la hibernación, y ritmos biológicos que ocurren en el rango de segundos a horas (los ritmos ultradianos) como la frecuencia cardíaca y respiratoria.

Así como la humanidad se ha sentado a filosofar e intentar explicar el concepto del tiempo, también ha documentado la existencia de ritmos biológicos. En la antigua Grecia, Hesíodo (700 a.C.) exponía que “las enfermedades caen sobre los hombres, algunas de día y otras de noche”, haciendo referencia a lo que hoy conocemos como ritmos en el sistema inmune. Asimismo, los egipcios tenían en cuenta los ciclos estacionales para administrar el agua y determinar los momentos adecuados de siembra y cosecha de cultivos. Ya para el siglo XVIII, Carlos Linneo, uno de los padres de la biología moderna, clasificó distintas especies de plantas que abrían y cerraban sus flores a distintos horarios del día, creando un “reloj floral”.

Si al nacimiento de la Cronobiología nos referimos, el primer experimento cronobiológico propiamente dicho fue llevado a cabo por el astrónomo Jean Jacques d’Ortous de Mairan en 1729. De Mairan observó que las hojas de la planta *Mimosa púdica* se abrían durante el día y se cerraban durante la noche [de Mairan, 1729]. Para averiguar si este suceso ocurría por influencia del ciclo ambiental de luz/oscuridad, colocó la planta dentro de un armario aislado y en completa ausencia de la influencia de la luz solar. Sorprendentemente, bajo estas condiciones, observó que las hojas seguían realizando este movimiento de manera periódica. Esta fue la primera evidencia científica de un ritmo endógeno, es decir, capaz de mantenerse en ausencia de señales temporales externas. Sin embargo, debieron pasar muchos años para que este concepto sea aceptado y validado por la comunidad científica. En ese entonces, se atribuía la ritmicidad del evento observado a otros factores externos (como las variaciones diarias de temperatura) que no podían ser controlados por el experimentador. Años más tarde, los experimentos de de Mairan

fueron continuados por de Candolle, quien demostró que el movimiento de la planta no dependía de variaciones en la temperatura ambiental, y que ocurría con un período menor a las 24 horas [de Candolle, 1832]. El descubrimiento de que el período endógeno era diferente al de los ciclos ambientales diarios, llevó a la idea de que el mecanismo debía de ser intrínseco, fundando así las bases de la existencia de relojes biológicos endógenos en los seres vivos. Sin embargo, la aceptación de la existencia de un reloj biológico como tal llevaría casi un siglo más.

Con la llegada del siglo XX, se comienzan a formalizar los mecanismos y el funcionamiento de los ritmos circadianos, gracias a los trabajos pioneros de Karl Von Frisch con abejas y de Erwin Bünning con plantas. Más tarde, los dos grandes padres de la Cronobiología moderna, Colin Pittendrigh y Jürgen Aschoff, estudiaron en profundidad y definieron las características de los ritmos circadianos utilizando diversas especies, desde *Drosophila melanogaster* hasta seres humanos encerrados en *bunkers* bajo tierra [Aschoff, 1965]. Fueron ellos dos quienes, en 1960, organizaron la primera reunión de la historia de la Cronobiología, donde convocaron a científicos de múltiples disciplinas y delinearon las propiedades fundamentales del estudio de los ritmos circadianos. Las mismas que hasta hoy en día son utilizadas, y las cuales describiremos en detalle en las siguientes secciones de esta introducción.

1.3 ¿Y para qué necesitamos ritmos biológicos?

Hasta el momento, hemos definido a los ritmos biológicos como procesos fisiológicos cíclicos que ocurren dentro del organismo como correlato de variables ambientales rítmicas. También, hemos mencionado que la existencia de estos ritmos biológicos, como producto de un proceso evolutivo, le confieren ventajas adaptativas al organismo en ese entorno cíclico. Asimismo, establecimos que los ritmos biológicos pueden mantenerse en ausencia de señales temporales externas, es decir, que hay un mecanismo intrínseco que produce estos ritmos endógenamente. Con toda esta información, podríamos empezar a hacernos varias preguntas: ¿Cuáles son las ventajas adaptativas de tener un sistema endógeno complejo que se anticipe a los cambios periódicos del entorno frente a generar una respuesta directa como consecuencia de la presencia/ausencia del estímulo? ¿Cómo es que este sistema temporal endógeno contribuye a la supervivencia de las especies? Lo que se resumiría básicamente en: ¿Cuál es la importancia de

tener un reloj y ritmos biológicos? Las respuestas a estas preguntas se basan principalmente en dos conceptos: la eficiencia energética y la compartimentalización (u orquestación) temporal de procesos fisiológicos.

En la biología comúnmente observamos que todo lo que es eficiente para un organismo es conservado a través de la evolución. Así, por ejemplo, un animal que agrupa temporalmente una mayor actividad metabólica, una mejor predisposición física, una mayor capacidad cognitiva y de alerta con el momento adecuado del día para salir a buscar comida (es decir, cuando hay mayor disponibilidad de alimento, menor presencia de depredadores, mejor capacidad de huida o escondite en caso de ataques), es un animal que probablemente tenga una tasa mayor de éxito y supervivencia frente a otros que simplemente organicen sus funciones al azar a lo largo del día. Asimismo, la agrupación de procesos fisiológicos y comportamientos que se complementan para obtener un determinado fin, es eficiente desde el punto de vista energético. La sincronicidad de estos procesos permite al animal, por ejemplo, obtener comida más eficientemente con un menor gasto calórico. De la misma manera, un animal que concentra los momentos de reproducción y nacimientos en épocas determinadas del año en las que las condiciones ambientales son óptimas y adecuadas, tendrá un mayor éxito reproductivo y mejor supervivencia como especie. En este sentido, tener ritmos biológicos adaptados al entorno representa una ventaja adaptativa para la supervivencia y el éxito de la especie.

Pero si hablamos de eficiencia energética, también podríamos pensar que, como organismo, desarrollar todo un sistema complejo para responder anticipadamente a cambios del entorno podría ser más costoso que sólo responder rápidamente a la presencia de un estímulo. Sin embargo, en la biología no todo es tan rápido como parece. Desarrollar la respuesta adecuada frente a la presencia de un estímulo implica la activación de muchas vías y procesos (genéticos, metabólicos, hormonales, conductuales, etc.) que requieren su tiempo y de una coordinación óptima y precisa. En este sentido, el mecanismo estímulo-respuesta supone una menor probabilidad de éxito y supervivencia para el individuo que el contar con un sistema capaz de anticiparse al estímulo y orquestar de manera precisa la respuesta adecuada. Y aquí hemos hecho referencia al segundo concepto: la orquestación o compartimentalización temporal. Dentro de un organismo, hay procesos fisiológicos que están sincronizados entre sí en un momento dado, y

otros que también lo están, pero en un momento opuesto (es decir, están en anti-fase, concepto que veremos más adelante). Por ejemplo, para un animal nocturno la actividad metabólica, física y capacidad cognitiva (así como todas las vías y procesos fisiológicos que cada una implica) están agrupadas durante la noche. Por el contrario, la disminución de la actividad del sistema nervioso, el aumento en los niveles de reposo y una menor tasa metabólica ocurren todos juntos durante el día, cuando el animal descansa. Todos estos procesos están ocurriendo dentro del mismo animal, pero "a distintos tiempos". Para que esta compartimentalización temporal ocurra de manera coordinada, precisa y sea eficiente para el organismo, es necesario contar con un sistema endógeno (reloj biológico) capaz de coordinar los distintos procesos fisiológicos y orquestar su salida. A su vez, esa salida debe ocurrir en un momento adecuado dentro de un entorno cambiante, y esto ocurre gracias a la capacidad del sistema de predecir y anticiparse a estos cambios. En resumen, el reloj biológico endógeno funciona como un homeostato, manteniendo el equilibrio temporal de los múltiples procesos que ocurren dentro de un organismo para dar una respuesta adecuada al entorno.

1.4 Parámetros de estudio de un ritmo

Hasta el momento, hemos hablado ampliamente de ritmos biológicos, pero no hemos definido qué es un ritmo. Un ritmo es un proceso o una cantidad que varía con el tiempo de manera regular y periódica, es decir, tiene un patrón repetitivo a lo largo del tiempo. Las variables rítmicas se grafican ajustando los datos a una función senoidal (**Figura 1A**), sobre la cual podemos definir 4 parámetros: el **Período** (T, tau), que es el tiempo que tarda en repetirse una oscilación completa; el **Mesor**, que es el valor medio que toma la variable a lo largo del ritmo; la **Amplitud**, que es la diferencia entre el valor máximo y el mesor; y la **Fase** (Ψ), que corresponde al momento en que la variable adquiere un valor determinado. Como fase podemos tomar cualquier punto o valor del ritmo, siempre definiéndolo previamente como valor de referencia (marcador de fase). Por ejemplo, el valor máximo que toma la variable rítmica se suele utilizar como marcador de fase, y comúnmente se lo conoce como acrofase. Más adelante en esta introducción, veremos los marcadores de fase más utilizados para estudiar ritmos circadianos en animales.

Cabe mencionar que los parámetros aquí mencionados sirven tanto para estudiar ritmos biológicos como cualquier otra variable o proceso con un patrón cíclico. Asimismo, estos parámetros son muy útiles para estudiar alteraciones en los ritmos de un organismo. Por ejemplo, podemos comparar dos ritmos con distinto período, como se muestra en la **Figura 1B**, en donde el período 2 es mayor al período 1. También podemos estudiar los cambios de amplitud en una variable rítmica, como se ejemplifica en la **Figura 1C**, donde las oscilaciones tienen el mismo período y coinciden en la fase, pero las amplitudes son distintas. Por último, podemos detectar diferencias o cambios de fase (ΔΨ) entre dos variables rítmicas como se muestra en la **Figura 1D**. En este caso, se tomó como referencia el valor máximo que tomó la variable (la acrofase). En el ejemplo, las variables tienen el mismo período y amplitud, pero se encuentran en anti-fase, es decir, para un momento determinado de tiempo cuando una de las variables se encuentra en su valor máximo, la otra se encuentra en su mínimo.

Figura 1. Parámetros de un ritmo. A) Representación gráfica de una variable rítmica a lo largo del tiempo. Se señalan los 4 parámetros de un ritmo: período, mesor, amplitud y fase. **B)** Se muestran dos oscilaciones con distinto período. **C)** Se muestran dos oscilaciones con distinta amplitud. **D)** Se muestran dos oscilaciones con fases diferentes. Como marcador de fase se puede utilizar cualquier punto del ritmo, en este caso se utiliza la acrofase (valor máximo). Asimismo, en el ejemplo las oscilaciones representadas se encuentran en anti-fase.

1.5 Características de los ritmos circadianos

Como hemos mencionado previamente, dentro del mundo de los ritmos biológicos existe una clasificación según el período. Como en esta tesis nos enfocaremos principalmente en los ritmos biológicos con un período de 24 horas, a partir de aquí hablaremos de ritmos y relojes circadianos (es decir, del sistema circadiano en su conjunto).

Anteriormente, hablamos de ritmos endógenos, es decir, aquellos que se mantienen en el organismo en ausencia de claves temporales ambientales (exógenas). Estos ritmos circadianos endógenos son generados por una estructura denominada *reloj circadiano central* que está presente en la mayoría de los seres vivos. Este reloj actúa como un marcapasos, ya que es capaz de generar oscilaciones espontáneas en forma autónoma, y transmitirlas al resto del organismo, para que éste funcione organizadamente. Dicho esto, ya podemos comenzar a dilucidar los componentes básicos que integran el sistema circadiano. La representación simplificada del sistema circadiano se hace a partir de un esquema conocido como Eskinograma (**Figura 2**, denominado así en honor al neurocientífico Arnold Eskin), y está compuesto por tres componentes principales: 1) el componente exógeno o sincronizador ambiental, también llamado *zeitgeber* (palabra del alemán que significa "dador de tiempo"); 2) el oscilador o reloj central, capaz de generar las oscilaciones autónomas y autosostenidas; y 3) los ritmos circadianos de las diversas variables fisiológicas y comportamentales del organismo [Golombek & Rosenstein, 2010]. Así, los sincronizadores ambientales o *zeitgebers* (como el ciclo natural de luz/oscuridad) sincronizan o "ponen en hora" al reloj central, el cual, mediante un proceso de acoplamiento de las distintas señales, genera como salida los ritmos circadianos, es decir, los patrones oscilatorios en las distintas variables fisiológicas del organismo (ritmos de temperatura corporal y secreción hormonal, de alimentación, ciclo de sueño/vigilia, etc.). Asimismo, los distintos componentes interactúan entre sí, pudiendo los ritmos circadianos retroalimentar la actividad del reloj central ("ajustando la hora del reloj" aún más); a su vez, los sincronizadores ambientales pueden afectar los ritmos circadianos de manera directa y eludiendo al reloj central, en un proceso que se conoce como enmascaramiento (*masking*, del cual hablaremos más en detalle luego).

Ahora que conocemos los componentes principales del sistema circadiano, podemos denotar las propiedades principales que definen a un ritmo circadiano como tal:

1) Poseer un carácter endógeno. Esto implica que en ausencia de sincronizadores o *zeitgebers* ambientales, la variable sigue oscilando. Bajo estas condiciones constantes (que se suelen denominar así haciendo referencia a que todos los posibles sincronizadores ambientales cíclicos se mantienen de forma controlada y constante), los ritmos endógenos expresan su período en libre curso (*free running*) que suele ser ligeramente distinto (mayor o menor, dependiendo de la especie) al del sincronizador ambiental. Esta diferencia entre el período endógeno del ritmo y el período exógeno del sincronizador ambiental es lo que hace evidente la existencia de un mecanismo intrínseco (el reloj central) capaz de generar la oscilación en ausencia de claves temporales externas.
2) Poseer capacidad de sincronización a un ciclo ambiental con un período cercano a las 24 horas. En este sentido, la fase del ritmo circadiano en condiciones de sincronización debe mantener una relación estable y adecuada con la fase del ciclo ambiental. En la naturaleza, el ciclo de luz/oscuridad es el estímulo más importante en lo que a sincronización de los ritmos circadianos se refiere, si bien existen otros de relativa importancia de acuerdo a la especie en estudio.
3) Poseer compensaciones en el período por cambios de temperatura. Esto es: que el período del ritmo circadiano se mantenga relativamente constante frente a cambios bruscos en la temperatura ambiental. Esta propiedad es especialmente relevante para organismos ectotérmicos (que no regulan la temperatura en su medio interno) como ocurre en hongos, plantas y bacterias.

Establecidos los criterios que definen un ritmo circadiano, es interesante hacer algunas observaciones adicionales. La propiedad de endogeneidad del ritmo en libre curso es una característica fundamental para demostrar que una variable fisiológica es un ritmo circadiano. Asimismo, se deben explicitar cuáles son las condiciones de libre curso o condiciones constantes bajo las cuales se evalúa la variable. En el caso de que estemos observando un ritmo bajo condiciones cíclicas de un *zeitgeber*, deberíamos hablar en principio de un ritmo *diario* hasta que podamos demostrar que la variable en cuestión puede mantener su ritmicidad en condiciones constantes (situación en la que sí podremos llamarlo ritmo circadiano). Esto es importante dado que pueden existir variables que muestren ritmos diarios pero que no se mantengan en

condiciones constantes, y allí no estaríamos evidenciando la presencia de un mecanismo endógeno.

Figura 2. Esquema simplificado del sistema circadiano. Modelo de los componentes que integran el sistema circadiano. El oscilador o reloj central endógeno es modificado por un agente sincronizador ambiental (*zeitgeber*), en un proceso denominado sincronización. Esto da lugar a la generación de los ritmos biológicos, a través del mecanismo de acoplamiento. Asimismo, el sincronizador puede actuar directamente sobre la variable de salida, sin pasar por el oscilador (enmascaramiento); y esta última alterar al oscilador mediante el proceso de retroalimentación. El ciclo natural de luz/oscuridad es uno de los principales *zeitgebers* del reloj circadiano. Sin embargo, la disponibilidad de alimento o las interacciones sociales también pueden actuar como estímulos sincronizadores del reloj. El ciclo de sueño-vigilia representa el ejemplo más claro de un ritmo circadiano, no obstante, este fenómeno abarca también muchas otras variaciones en la fisiología, además de influir en procesos cognitivos que varían a lo largo del día, tales como los niveles de atención y concentración.

1.6 Organización del Sistema Circadiano en mamíferos

1.6.1 En la búsqueda del reloj central

Luego del descubrimiento de los ritmos circadianos y su naturaleza característica, los científicos se embarcaron en la búsqueda del oscilador endógeno responsable y su funcionamiento. Este interés condujo a utilizar una amplia gama de modelos que abarcaban desde organismos unicelulares como las cianobacterias, hasta organismos más complejos como hongos, plantas, y diferentes modelos animales, incluyendo la mosca de la fruta *Drosophila*

melanogaster y roedores. Anatómicamente, la organización del sistema circadiano varía considerablemente según la complejidad de los diferentes organismos. Sin embargo, en la mayoría de ellos, el mecanismo molecular del reloj endógeno es similar y se conserva ampliamente entre los diversos reinos, lo que resalta su importancia evolutiva. El descubrimiento del reloj circadiano y su organización en mamíferos, principalmente en roedores, es particularmente relevante para esta tesis. Nos centraremos en este aspecto en los siguientes párrafos.

En 1971, Robert Moore inyectó un marcador anterógrado en la retina de ratas y encontró una vía directa desde la retina hasta el hipotálamo (conocida como tracto retinohipotalámico – TRH) que finalizaba en dos pequeños núcleos que se encuentran por encima del quiasma óptico, denominados **Núcleos Supraquiasmáticos** (NSQ) [Moore & Lenn, 1972]. La localización anatómica de los NSQ se puede apreciar en la **Figura 3**. Luego, lesionó específicamente estos núcleos y observó que los animales perdían la ritmicidad en los niveles séricos de corticosterona [Moore & Eichler, 1972]. Adicionalmente, Stephan y Zucker lesionaron los NSQ de ratas y descubrieron que se perdían los ritmos de bebida y actividad locomotora [Stephan & Zucker, 1972]. Experimentos adicionales confirmaron que trasplantar tejido íntegro de los NSQ en animales previamente arrítmicos (debido a ablaciones anteriores) restauraba la ritmicidad circadiana [Lehman et al., 1987; Sujino et al., 2003]. A raíz de experimentos con animales lesionados, De Coursey y colaboradores quisieron estudiar las ventajas adaptativas reales de tener un reloj circadiano y liberaron ardillas con los NSQ lesionados a un entorno natural controlado. Observaron que estas ardillas tenían un comportamiento arrítmico, a diferencia de sus controles no lesionados que eran diurnos. Además, el 60% de estos animales arrítmicos fue sorprendido por la aparición de predadores nocturnos [DeCoursey et al., 1997], demostrando de esta forma que el reloj circadiano aportaba la ventaja adaptativa de anticiparse a los cambios ambientales (en este caso la presencia de depredadores nocturnos).

Figura 3. Localización de los Núcleos Supraquiasmáticos (NSQ) hipotalámicos. A) Ubicación de los NSQ en el ratón (marcados en rojo). Como se observa en la vista lateral del cerebro de ratón, se encuentran al final del tracto retinohipotalámico (TRH) y por encima del quiasma óptico (QO), en la región del hipotálamo. **B)** Corte coronal de cerebro de ratón con tinción de Nissl, a la altura de la ubicación de los NSQ (recuadro rojo). También se muestra una ampliación de los NSQ. 3V: tercer ventrículo.

1.6.2 El reloj central: los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo

Los experimentos anteriores demostraron que el reloj circadiano central en mamíferos se localizaba en los NSQ hipotalámicos. Sin ellos, la ritmicidad del organismo se perdía por completo. Dada su relevancia en el sistema, es de especial interés describir su composición y organización estructural para luego poder centrarnos en el mecanismo molecular que hace que este reloj "dé la hora".

Los NSQ son un par de estructuras neuronales localizadas en la parte antero-ventral del hipotálamo, a cada lado del tercer ventrículo, por encima del quiasma óptico, como se mostró previamente en la Figura 3. La información lumínica del ambiente llega a los NSQ desde la retina

a través del TRH. En la capa más interna de la retina, podemos encontrar un tipo de neuronas, conocidas como células ganglionares de la retina, que reciben información visual de las células fotorreceptoras (conos y bastones) y transmiten esa información al cerebro a través del nervio óptico. Un subconjunto especial de estas células ganglionares contiene un pigmento fotosensible llamado melanopsina, que las hace sensibles a la luz directa. Son estas células ganglionares de la retina intrínsecamente fotosensibles (ipRGCs, por sus siglas en inglés) las encargadas de llevar la información fótica, a través del TRH hacia los NSQ, modulando así los ritmos circadianos. Las proyecciones neuronales del TRH son suficientes para mantener la sincronización de los NSQ a la luz, ya que las lesiones en este tracto impiden que los NSQ ajusten su actividad rítmica a los ciclos ambientales de luz/oscuridad [Johnson et al., 1988; Hattar et al., 2006].

En el ratón, cada NSQ contiene aproximadamente 10.000 neuronas, las cuales son pequeñas y están densamente empaquetadas junto con otras células de sostén como las células de la glía. Las neuronas de los NSQ son osciladores autónomos, es decir, son capaces de generar oscilaciones circadianas de forma independiente que, en condiciones normales, se sincronizan entre sí actuando como un oscilador central que guía la ritmicidad en el organismo [Takahashi et al., 2008]. Estructuralmente se pueden encontrar dos subdivisiones anatómicas principales en cada NSQ: la región dorsomedial o *shell*, y la región ventrolateral o *core* (**Figura 4**). Las neuronas de cada subregión se pueden distinguir por su contenido neuroquímico [Abrahamson & Moore, 2001; Antle et al., 2005]. La región del *core* se caracteriza por la expresión diferencial del péptido intestinal vasoactivo (VIP) y del péptido liberador de gastrina (GRP). A esta región llegan la mayoría de las aferencias neuronales de la retina, ya sea directamente a través del TRH como indirectamente desde otras regiones como el rafe y la hojuela intergeniculada (IGL). Dentro de la región del *shell*, las neuronas expresan arginina vasopresina (AVP) y calbindina (CAL). La región del *shell* posee ritmicidad endógena sostenida en libre curso (es decir, oscila por si sóla en ausencia de señales externas), modulada a su vez por las señales de la región del *core*. Desde el *shell* salen proyecciones a diversas zonas del hipotálamo, como los núcleos paraventriculares (PVN), el hipotálamo dorsomedial (DMH), entre otras. Estas zonas son áreas involucradas en el control endócrino, inmune, termorregulatorio y autonómico; y se encargarían de regular los ritmos en los tejidos periféricos actuando como vías de salida del reloj central [Kalsbeek et al.,

2006]. Se sabe también que el *shell* es sensible a estímulos sincronizadores no fóticos provenientes de otras áreas del cerebro, que modulan su actividad [Abrahamson & Moore, 2001; Kalsbeek et al., 2006]. En resumen, se podría decir que el *core* representa la zona dedicada a la entrada de la señal fótica, mientras que el *shell* es responsable de la transmisión de la ritmicidad del reloj al resto del sistema circadiano y del organismo. Dicho esto, la comunicación entre ambas

Figura 4. Características neuroanatómicas de los NSQ. **(A)** Sección coronal de los NSQ de ratón. En rojo se observan las células positivas para AVP de la región *shell*, y en verde las células positivas para GRP de la región *core* de los NSQ. Imagen modificada de [Karatsoreos, 2004]. **(B)** La región del *core* recibe las aferencias directas del TRH, señalizando la presencia de la luz (*input* fótico) mediante la liberación de PACAP y glutamato. Dentro del *core*, la luz genera la inducción de genes reloj y la producción y liberación de VIP, GABA, GRP en neuronas específicas. Esta información fótica llega a la región del *shell*, cuyas neuronas producen AVP, GABA y CAL. En el *shell* se integran la señal fótica proveniente del *core* con la ritmicidad endógena de genes reloj. Desde el *shell* se proyectan las diferentes vías de salida del reloj que llegan, por ejemplo, a zonas hipotalámicas como PVN y DMH. Las flechas azules indican aferencias y las flechas rojas eferencias desde los NSQ. TRH: tracto retinohipotalámico; PACAP: polipéptido activador pituitario de la adenilato ciclasa; GABA: ácido gamma-aminobutírico; GRP: péptido liberador de gastrina; VIP: péptido intestinal vasoactivo; IGL: hojuela intergeniculada; CAL: calbindina; AVP: arginina vasopresina; NO: óxido nítrico; PVN: núcleo paraventricular; DMH: hipotálamo dorsomedial.

regiones de los NSQ es indispensable para el correcto funcionamiento del sistema, y para "poner en hora" adecuadamente al organismo. La comunicación entre las neuronas dentro de cada zona y entre zonas de los NSQ ocurre por varias moléculas y péptidos, entre ellos el óxido nítrico (NO), VIP y el neurotransmisor ácido gamma amino butírico (GABA) [Hastings & Herzog, 2004; Plano, Agostino & Golombek, 2007].

1.6.3 Componentes moleculares del reloj circadiano

Ya hemos definido la ubicación y la composición neuroanatómica del reloj circadiano central en mamíferos. Pero ¿cómo son las neuronas dentro de los NSQ capaces de generar ritmos? ¿Cómo se "ponen en hora" a partir de la información que les llega de los estímulos ambientales? ¿Cómo transmiten esa ritmicidad al resto del organismo? La respuesta a estas preguntas se encuentra en el mecanismo molecular que ocurre dentro de cada célula de los NSQ.

El modelo genérico de un reloj molecular implica un ciclo de retroalimentación transcripcional negativa con elementos positivos y negativos. Los elementos positivos activan la transcripción de los elementos negativos, y estos inhiben a los elementos positivos, inhibiendo así su propia transcripción. De esta forma, se genera un ciclo o ritmo en la disponibilidad de los elementos negativos, y este ciclo tiene una periodicidad determinada (por ejemplo, 24 horas).

En mamíferos, existen varios ciclos o bucles de retroalimentación transcripcionales-traduccionales positivos y negativos, que complejizan y le dan robustez al mecanismo molecular del reloj (**Figura 5**). Comúnmente, se conoce a los genes y sus productos proteicos involucrados en este proceso como **genes y proteínas reloj**. En el bucle de retroalimentación principal, los genes reloj *Clock* y *Bmal1* codifican sus respectivas proteínas, que forman un heterodímero (CLOCK-BMAL1) que actúa como factor de transcripción, uniéndose a secuencias regulatorias en el ADN, llamadas secuencias *E-box,* para activar la expresión de otros genes. Entre esos genes, se encuentran los genes reloj *Period (Per) 1, 2 y 3,* y *Cryptochrome (Cry) 1 y 2.* El bucle de retroalimentación negativo es llevado a cabo por el heterodímero formado por las proteínas PER y CRY, las cuales se translocan al núcleo, heterodimerizan, e interaccionan con el heterodímero CLOCK-BMAL1 inhibiendo su actividad. De esta forma, también inhiben su propia transcripción.

Figura 5. Mecanismo molecular del reloj circadiano en mamíferos. El dímero CLOCK-BMAL1 se une a secuencias *E-box* en la región promotora de diversos genes, entre ellos, *Per*, *Cry*, *Rev-erb*, *Ror* y los genes controlados por reloj (GCR), activando su transcripción. Las proteínas PER y CRY heterodimerizan y, en el núcleo, inhiben la actividad de CLOCK-BMAL1, inhibiendo así su propia transcripción y la de otros genes que tienen secuencias *E-box*. Este bucle primario de activación-inhibición se ve complementado por la inhibición de la transcripción de *Bmal1* mediada por REV-ERBα, y la activación mediada por ROR, quienes se unen al elemento RORE en el promotor de *Bmal1*. Estos bucles sumados a las modificaciones postraduccionales de PER y CRY, y la degradación regulada de las proteínas reloj, hacen que el ciclo se repita con un período de aproximadamente de 24 horas. Las flechas azules indican mecanismos de activación, las rojas de represión, y las grises de traslocación. Modificado de [Agostino, Acosta & Meck, 2017].

Todo este ciclo de retroalimentación dura aproximadamente 24 horas, por lo que constituye el reloj molecular circadiano [Takahashi, 2015]. Asimismo, el heterodímero CLOCK-BMAL1 (los elementos positivos) no sólo activa la transcripción de genes reloj, sino que también lo hace en múltiples genes, llamados **genes controlados por el reloj** (GCR). De esta forma, cuando los elementos negativos CRY y PER inhiben al heterodímero CLOCK-BMAL1, también están inhibiendo la activación de los GCR. Los GCR no participan del mecanismo de oscilación *per se* sino de la generación de los ritmos biológicos circadianos propiamente dichos, ya que sus productos son las salidas del reloj [Ko & Takahashi, 2006; Partch, Green & Takahashi, 2014]. Se sabe que entre un 15 a un 20% del total del genoma oscila circadianamente [Rijo-Ferreira & Takahashi, 2019].

Además del bucle de retroalimentación primario, existe un bucle de retroalimentación negativo secundario que implica a los receptores nucleares relacionados al ácido retinoico, REV-ERB-alpha (REV-ERB-α) y el Receptor Alpha Huérfano asociado a RAR (ROR-α). Dichos genes son también activados por el heterodímero CLOCK-BMAL1. A su vez, las proteínas codificadas por REV-ERB-α y ROR-α compiten para unirse a los elementos de respuesta ROR (RORE) presentes en el promotor de *Bmal1*, inhibiendo o activando su expresión, respectivamente. Estas proteínas, por lo tanto, regulan la expresión de *Bmal1* [Ko & Takahashi, 2006]. Este bucle secundario suma un mecanismo adicional de control al mecanismo molecular del reloj, dándole robustez al circuito. Adicionalmente, el mecanismo principal está regulado por modificaciones post-transcripcionales, como fosforilaciones y ubiquitinaciones sobre las proteínas PER y CRY, para acelerar su traslocación al núcleo o favorecer su degradación por ubiquitinación. Estos procesos contribuyen a la precisión del reloj circadiano [Akashi, 2002; Eide et al., 2005].

Todos estos mecanismos llevan a que exista ritmicidad en la expresión de los genes reloj. Los niveles de ARNm y de proteína de PER 1, 2 y 3, CRY 1 y 2, RORα y REV-ERBα en los NSQ de roedores nocturnos poseen su máximo durante el día, mientras que los niveles de BMAL1 poseen su máximo durante la noche, es decir, que se encuentran en anti-fase. Por otro lado, los niveles de CLOCK son constitutivos [Abe et al., 1998; Asai et al., 2001; Lowrey & Takahashi, 2004; Chun et al., 2015].

Dentro de cada neurona de los NSQ, y en general dentro de cada célula del organismo, está ocurriendo este mecanismo molecular para generar la ritmicidad circadiana. Como se

mencionó, las neuronas en los NSQ son capaces de generar estas oscilaciones moleculares de manera independiente y autosostenida (en ausencia de señales ambientales). Sin embargo, como hemos mencionado ampliamente a lo largo de esta introducción, los factores ambientales (ciclo luz/oscuridad, disponibilidad de alimento, cambios de temperatura, etc.) "ponen en hora" a este reloj intrínseco para adecuar los ritmos del organismo con los ciclos externos. En particular, la sincronización por luz (llamada sincronización fótica, principal *zeitgeber* en mamíferos) ocurre cuando la información lumínica llega a través del TRH a los NSQ. Los axones de las células ganglionares fotosensibles de la retina secretan el neurotransmisor glutamato, provocando la despolarización de la membrana de las neuronas en los NSQ. Esta despolarización genera el ingreso de un flujo de calcio, que a su vez activa un complejo de proteínas quinasas que fosforilan una proteína denominada CREB. Cuando CREB se encuentra fosforilada, se activa e induce la expresión de otros genes, entre ellos los genes reloj *Per1* y *Per2* [Yan & Okamura, 2002; Golombek et al., 2003]. La inducción de *Per1* y *Per2* mediada por la luz, resetea y pone en fase ("en hora") el mecanismo del reloj molecular (y, en consecuencia, los ritmos de salida) con el ambiente.

1.6.4 Las vías de salidas del reloj central y los osciladores periféricos

El mecanismo molecular del reloj que se explicó en la sección previa no es exclusivo sólo de los NSQ. Lo que sí es casi exclusivo de los NSQ, es la capacidad de generar ritmos moleculares autosostenidos y en ausencia de señales externas sincronizadoras. El término 'casi' utilizado, hace referencia a que, actualmente, se han descubiertos otras estructuras en el cerebro capaces de generar oscilaciones *per se*. Sin embargo, muchas regiones cerebrales por fuera de los NSQ expresan genes reloj, así como también diferentes órganos y tejidos del resto del organismo. Actualmente, se sabe que prácticamente todas las células del organismo contienen un reloj molecular circadiano [Yoo et al., 2004; Mohawk, Green & Takahashi, 2012].

En los últimos años, se ha propuesto al sistema circadiano de mamíferos como un sistema jerárquico multi-oscilatorio (**Figura 6**) [revisado en Brown et al., 2019], compuesto por el oscilador central sincronizado principalmente por luz (los NSQ), osciladores centrales adicionales (llamados extra-NSQ) sincronizados por estímulos no fóticos (como la disponibilidad de comida y ciertas drogas, temática que abordaremos en el Capítulo III de esta tesis), osciladores secundarios en

Figura 6. Organización jerárquica multi-oscilatoria del sistema circadiano. El ciclo de luz/oscuridad es el principal sincronizador del reloj central en los NSQ. Mediante diversas vías de señalización humorales, neuronales, autonómicas, y neuroendócrinas, el reloj central sincroniza "poniendo en hora" el resto de los osciladores secundarios en el cerebro y de los osciladores periféricos del organismo (por ejemplo, el corazón, riñones, pulmones e hígado). Además, otras señales externas sincronizadoras, como ciertas drogas y la alimentación, pueden sincronizar a dichos osciladores periféricos, con una fase diferente a la de los NSQ.

otras regiones del cerebro (como retina o bulbo olfatorio), y osciladores periféricos (órganos y tejidos del resto del organismo). Dichos osciladores periféricos poseen su propio mecanismo molecular circadiano y los ritmos de ciertas funciones están determinados por el reloj propio de las células de ese tejido, pero a la vez, son sincronizados y "puestos en hora" por las señales provenientes de los NSQ. En este sentido, el reloj central en los NSQ mantiene relaciones de fase estables y coherentes entre los distintos osciladores secundarios y periféricos para adaptar adecuadamente la fisiología a las necesidades del entorno.

Como vimos, la luz que llega a los NSQ por medio del TRH sincroniza los ritmos endógenos del reloj central con el ciclo ambiental externo. A su vez, los NSQ coordinan al resto de los osciladores del organismo por medio de distintas salidas neuroendócrinas, autonómicas y

comportamentales. Por ejemplo, el ritmo de secreción de glucocorticoides es una de las salidas humorales que utiliza el reloj central para sincronizar los tejidos periféricos [Balsalobre et al., 2000]. Adicionalmente, se cree que los ritmos de actividad locomotora podrían ser controlados por vías humorales, ya que se han descripto factores liberados por los NSQ como, por ejemplo, TGFα (factor de crecimiento transformante alfa), PK2 (proquineticina 2), y CLC (citoquina similar a cardiotrofina), que han mostrado inhibir la actividad locomotora en animales sin afectar el mecanismo de generación de los ritmos [Cheng et al., 2002; Kramer et al., 2001; Kraves & Weitz, 2006]. Asimismo, existen vías de señalización neuronales desde los NSQ hacia centros de control autonómico y neuroendócrino en el hipotálamo (como PVN y DMH) que controlan directa o indirectamente las oscilaciones en diversos órganos y tejidos de la periferia [Buijs et al., 2001; Cailotto et al., 2009]. Por otro lado, se ha demostrado que los propios ritmos de alimentación o de temperatura pueden actuar también como agentes sincronizadores de los relojes periféricos [Damiola et al., 2000; Brown et al., 2002]. Aún más, los osciladores periféricos pueden también sincronizarse por múltiples vías que no dependen directamente de señales provenientes del reloj central. Por ejemplo, el reloj periférico en el hígado es capaz de sincronizarse a la alimentación y la disponibilidad de nutrientes con independencia de los NSQ [Mohawk, Green & Takahashi, 2012]. Aún hoy en día, se desconoce gran parte de cómo el reloj central coordina los distintos osciladores periféricos, cómo estos se comunican entre sí, y las vías por las que se sincronizan con las distintas señales del entorno.

1.7 ¿Cómo podemos estudiar los ritmos circadianos en el laboratorio?

La forma correcta de estudiar los ritmos circadianos de un organismo va a depender del tipo de organismo que se quiera estudiar y del tipo de experimento que se quiera hacer (*in vivo* o *in vitro*). Lo que sí es común a todos los estudios cronobiológicos es la utilización de una serie temporal de datos. La variable fisiológica o comportamiento en cuestión deberán ser medidos sucesivas veces a lo largo de un período de tiempo adecuado para el fenómeno que se intenta describir (por ejemplo, 24 horas). Asimismo, se deben tener en cuenta las condiciones constantes para evidenciar la endogeneidad de la variable oscilatoria.

La metodología más utilizada para medir ritmos circadianos en células o explantos de tejidos *in vitro* se basa, principalmente, en analizar de forma directa la actividad de los genes reloj mediante diferentes herramientas moleculares. Por ejemplo, se pueden utilizar tejidos provenientes de animales mutantes o la transfección de plásmidos reporteros en cultivos celulares que permitan visualizar la expresión rítmica de los genes. Generalmente, esto se logra a partir de la expresión del gen que codifica para la enzima luciferasa que está bajo el control del promotor de algún gen reloj (por ejemplo, *per2::luc* o *bmal1::luc*), lo cual permite evidenciar la activación rítmica en ensayos de bioluminiscencia. Asimismo, hoy en día existen metodologías más sofisticadas que permiten medir los ritmos bioluminiscentes de expresión de genes *in vivo* en animales intactos utilizando luminómetros especiales. Por otro lado, se puede medir la expresión rítmica de genes reloj u otros genes controlados por el reloj a partir de tejidos frescos de animales utilizando diversas técnicas, como *western blots*, inmuhistoquímica, PCR en tiempo real, secuenciación masiva de ARNm, entre otras. Por razones obvias, en estos casos las muestras se toman secuencialmente a partir de distintos animales, y la frecuencia de muestreo debe ser la adecuada para tener una buena resolución de la expresión rítmica de la variable a analizar. En todos estos casos, los datos experimentales obtenidos provienen de muestreos de series temporales cortas (unos pocos días) y pueden ser analizados utilizando la representación cartesiana simple de las variables (como el ejemplo gráfico de un ritmo sinusoide mostrado en la Figura 1A). De esta forma, se puede analizar la periodicidad de las variables, y detectar cambios de fase o diferencias de amplitud.

Existe otra metodología, más simple y ampliamente utilizada en los estudios cronobiológicos *in vivo*, que permite estudiar el funcionamiento del reloj circadiano a partir del análisis de medidas indirectas, es decir, de las variables de salida (ritmos circadianos) del reloj. En roedores, los ritmos comportamentales como la actividad locomotora general, la actividad en rueda, los ritmos de alimentación y bebida, y el ritmo de temperatura corporal son las variables más frecuentemente utilizadas y son buenos indicadores del funcionamiento del sistema circadiano. Al ser mediciones no invasivas (y no letales) para el animal, pueden ser recopiladas a lo largos de extensos periodos de tiempo (varios días, semanas o meses). En estos casos, el análisis de la variable en un gráfico cartesiano sería inconveniente y difícil de interpretar. Es por

ello que existen métodos especializados para graficar y analizar estas series temporales de datos muy extensas: los **actogramas**. En la presente tesis, se utilizarán los ritmos de actividad locomotora y de alimentación de los roedores como indicadores del correcto funcionamiento y sincronización del sistema circadiano con distintos sincronizadores ambientales. En los siguientes párrafos se describirá en detalle qué son los actogramas y cómo se construyen.

1.7.1 De cómo analizar ritmos en roedores, construir actogramas y otras herramientas cronobiológicas

La actividad locomotora general en roedores puede registrarse mediante la detección del movimiento en la jaula por medio de sensores de tipo infrarrojo, o de la actividad en rueda por *switches reed* magnéticos, donde cada vez que el animal pasa por debajo del sensor o utiliza la rueda, se registra una cuenta. Esta cuenta se digitaliza, se suma al total de cuentas generadas en un intervalo de tiempo determinado (denominado *bin*, que puede ser, por ejemplo, cada 1 minuto o cada 5 minutos) y se registra en una computadora. De esta forma podemos registrar los patrones de actividad locomotora del animal a lo largo de 24 horas y por varios días consecutivos. Para representar este patrón de actividad gráficamente, utilizamos los denominados **actogramas** (**Figura 7**). Los mismos se construyen trazando la serie temporal de actividad del animal, con histogramas representando la suma de las cuentas en cada *bin* sucesivo, a lo largo de 24 horas (o cualquier otro módulo temporal que elijamos). En este sentido, cada fila del gráfico representa un día completo, donde la hora del día está representada en el eje horizontal, y el valor alcanzado por la variable en el eje vertical. Luego, se apilan los días sucesivos de registro uno debajo del otro de manera cronológica. De esta forma en el actograma final, podemos ver en el eje *Y* los datos días sucesivos del registro de la variable, y en el eje *X* las horas. Una variante muy utilizada de este gráfico es el actograma doble (o *double-plot*), que se construye anexando al gráfico original una copia exacta al lado, y de esta forma, en el eje *X* podemos ver graficados dos días sucesivos (48 horas). Así, los actogramas permiten visualizar de una forma muy clara las modificaciones en los parámetros del ritmo de actividad de los animales en los días sucesivos. Además, permiten obtener marcadores de la fase del ritmo, como, por ejemplo, el inicio o el fin de la actividad de cada día (parámetros conocidos como "*onset*" y "*offset*", respectivamente), ver

Figura 7. Construcción de un actograma. (A) Ritmo de la actividad locomotora de un roedor nocturno durante dos días sucesivos bajo un ciclo de luz/oscuridad representada por una curva sinusoidal asociada al registro crudo de actividad. Debajo se muestra el armado típico de un actograma de actividad: la actividad correspondiente al día 2 se pone por debajo a la del día 1. **(B)** Actograma de esquema simple. Al igual que se explicó en A, las horas del día van en el eje *X* mientras que los días sucesivos se "apilan" en el eje *Y*. **C)** Actograma de esquema doble. Se construye un actograma simple y se coloca al lado una copia del mismo, pero de manera que queden desfasados en un día. De esta forma al terminar el día 1 al lado comienza el día 2. Así, en una sola línea se pueden observar 48 horas de registro. Las barras negras y blancas que se encuentran arriba de cada gráfico representan esquemáticamente el ciclo de luz/oscuridad (o LD, por *light/dark cycle*): negro corresponde a la fase de oscuridad y blanco a la fase de luz.

cambios de período y estimarlo mediante cálculos trigonométricos, observar cambios en la amplitud y la fase, etc. Por supuesto que, si bien son típicamente utilizados para datos de actividad locomotora, los actogramas son útiles para analizar periodicidades de cualquier variable rítmica que pueda medirse en series de larga duración.

Ahora que ya conocemos cómo representar gráficamente la actividad locomotora para medir indirectamente el funcionamiento del reloj circadiano, podemos centrarnos en su aplicación en el laboratorio utilizando como modelo de estudio a los roedores. La mayoría de los roedores son animales nocturnos, es decir, que tienen su momento de mayor actividad durante la noche. En el laboratorio, para evaluar los ritmos en estos animales, inicialmente se los coloca bajo un ciclo normal de luz/oscuridad (que a partir de aquí denominaremos **ciclo LD**, por su nombre en inglés *light/dark cycle*) de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de oscuridad (ciclo LD 12:12, de período final: 24 hs). De esta forma, al cuantificar la actividad locomotora del animal a lo largo de los días sucesivos, podemos evidenciar como los patrones diarios de este ritmo están sincronizados con el ciclo LD externo. En este caso, en roedores nocturnos, esperamos ver que el animal concentra su mayor actividad durante la noche (horas de oscuridad) y descanse durante el día (horas de luz, ver Figura 7). Para poder establecer fases o momentos determinados en la variable de estudio (en este caso, la actividad locomotora), se necesita darle un marco de referencia o escala temporal. Cuando un ritmo es observado en condiciones de LD, o bajo condiciones de cualquier otro sincronizador ambiental, el marco de referencia puede determinarse fácilmente utilizando momentos específicos en este ciclo ambiental, por ejemplo, el momento en que las condiciones de iluminación cambian (la transición de luz a oscuridad o viceversa). Por convención, en Cronobiología se define la escala temporal como "hora del *zeitgeber*" o **ZT** (por "*Zeitgeber Time*"), fijando la hora ZT12 (hora del *zeitgeber* 12) al momento del comienzo de la noche de la variable, que en el caso del ciclo LD es el momento del apagado de las luces. Así, el ZT0 coincidiría con el horario de encendido de las luces y el comienzo del día para el animal. En base a este marco de referencia convencional podemos independizarnos del hecho de que, por ejemplo, en distintos bioterios los horarios de encendido y apagado de las luces sean diferentes. Podemos definir una fase determinada para administrar una droga o

evaluar comportamentalmente a un animal en función de la coordenada ZT, y garantizar así que el momento de evaluación es reproducible desde el punto de vista circadiano.

Como se mencionó anteriormente, cuando evaluamos una variable rítmica bajo un ciclo LD, lo que se observan son ritmos diarios y no circadianos, ya que estos están siendo evidenciados bajo la sincronización continua del *zeitgeber*. Si se desea analizar los ritmos circadianos, los animales se deberán colocar en condiciones constantes o de libre curso (*free running*). En roedores, teniendo en cuenta que la luz es el principal agente sincronizador del reloj central en los NSQ, las condiciones de libre curso se suelen establecer mediante condiciones de **oscuridad constante** (**DD**, por sus siglas en inglés *dark-dark*) y manteniendo todos los demás factores ambientales constantes (temperatura, humedad, alimentación y presencia de cualquier otro estímulo). Si bajo estas condiciones medimos la actividad locomotora como indicador de los ritmos circadianos y lo representamos en un actograma, lo que vamos a evidenciar es el ritmo locomotor en libre curso expresado con el período endógeno del animal. En este caso, dada la ausencia de claves temporales externas, se deben tomar referencias temporales observables sobre el ritmo bajo estudio. A este marco de referencia temporal definido por eventos intrínsecos del ritmo se lo denomina "hora circadiana" o **CT** (por "*Circadian Time*") y también se puede dividir internamente el ciclo en 24 horas circadianas (cuya duración en este caso dependerá del período del ritmo estudiado). En este caso, resulta entonces útil dividir la escala temporal dada por el ritmo en un *día* y una *noche subjetivos*. En el caso más común de los ritmos de actividad locomotora de un roedor nocturno, se utiliza por convención el inicio de la noche subjetiva como el momento en el que comienza el intervalo de actividad locomotora (*onset*), y este se define como CT12 (hora circadiana 12). Respectivamente, se puede tomar al CT0 como la finalización del intervalo de actividad (*offset*), el inicio del reposo, y el comienzo del *día subjetivo* del animal. Es importante resaltar que la duración de las horas circadianas depende directamente del período del ritmo endógeno (T, tau), y se calcula de acuerdo al cociente T(tau)/ 24 horas. Así, un ritmo endógeno de un período menor a 24 horas implicará que la hora circadiana sea menor a 60 minutos reales, mientras que un período mayor a 24 horas tendrá una hora circadiana mayor a 60 minutos reales. De la misma forma que se explicó para el ZT, determinar y explicitar el CT en

el cual se realizan los experimentos permite estandarizar y reproducir los resultados en la especie animal utilizada.

La longitud del período endógeno circadiano es dependiente de la especie, e incluso puede variar entre poblaciones de la misma especie [Saunders, 2002]. En la presente tesis, se utilizará una cepa de ratones (C57BL6) cuyo período endógeno es menor a 24 horas, de hecho, el rango de períodos en libre curso reportados es de T=23.7 - 23.9 horas [Cutler et al., 2003; Takasu et al., 2012]. Bajo condiciones de oscuridad constante, lo que se observa en los actogramas obtenidos de esta cepa de ratones es que el inicio de actividad locomotora (CT12) ocurre todos los días "un poco antes", es decir, se evidencia cómo el ritmo de actividad locomotora se corre hacia la izquierda en los días sucesivos (ver **Figura 8A**). Esto se debe a que, convencionalmente, los actogramas están graficados en un módulo de 24 horas, por ello, aquellos ritmos con una periodicidad menor muestran este efecto de "corrimiento hacia la izquierda". Por el contrario, si graficaríamos la actividad locomotora de una especie con período mayor a 24 horas en condiciones de libre curso (como, por ejemplo, ocurre en hámsters), veríamos que el ritmo se corre hacia la derecha. En este sentido, el actograma permite observar fácilmente cambios en el período bajo diferentes condiciones experimentales. Para cuantificar este período, se utiliza comúnmente en Cronobiología una herramienta conocida como **periodograma**. Los periodogramas buscan periodicidad en una serie de datos mediante métodos matemáticos y estadísticos. Se grafican los posibles períodos (dentro de un intervalo temporal elegido) en el eje *X*, y el porcentaje de varianza que se explica al alinear los datos utilizando cada uno de los posibles períodos en el eje *Y*; cuando este valor supera la línea de significación corresponde al o a los períodos/s significativos de dichos datos (picos observables en la gráfica de la **Figura 8B**). Esta herramienta es útil también para establecer condiciones de arritmicidad circadiana, es decir, evidenciar que los ritmos circadianos se pierden por completo a causa de una condición experimental determinada. En estos casos, no se observaría un pico estadísticamente significativo en el periodograma.

Finalmente, otra herramienta que se utiliza para analizar los patrones de actividad es un gráfico, conocido como ***waveform***, en el cual se muestra el promedio de los patrones de actividad de muchos días (**Figura 8C**). En estos gráficos, el eje *Y* muestra el promedio de la actividad para

cada punto horario de varios días sucesivos de registro, mientras que en el eje *X* se colocan las horas del día (u horas circadianas cuando corresponde). Este tipo de gráfico es de mucha utilidad para estudiar la distribución media de la actividad a lo largo de los días e incluso para promediar dicha distribución entre varios animales dentro de un mismo grupo experimental. Para cuantificar la actividad, se calcula el área bajo la curva en el intervalo temporal que se desea estudiar.

Figura 8. Formas de analizar los ritmos de actividad locomotora en roedores. **(A)** Actograma de un ratón que estuvo bajo un ciclo LD 12:12 (parte superior) y luego fue puesto bajo condiciones de oscuridad constante (DD). Observar que en LD, el ZT12 se define como el apagado de las luces y coincide con el *onset* (marcador de fase del inicio de la actividad del animal). En DD, el ratón tiene un período endógeno menor a 24 hs, y el CT12 es el *onset* de la actividad locomotora (que todos los días se "adelanta" unos minutos). **(B)** Se muestran los periodogramas correspondiente a los días que el ratón estuvo bajo un ciclo LD (recuadro celeste) y en DD (recuadro rosa). En LD, el animal exhibió un período de 1440 min (24 hs), tal como muestra el pico del periodograma que sobrepasa la línea de significancia (línea punteada roja). En cambio, su período endógeno en DD fue menor: 1410 min (23.05 hs). **(C)** Gráfico de *waveform* que se utiliza para estudiar la distribución promedio de la actividad locomotora a lo largo de los días sucesivos de registro, en este caso, de un ratón bajo LD 12:12. Para la cuantificación, se calcula el área debajo de la curva (gris) del intervalo deseado.

1.8 Sincronización, entrenamiento y enmascaramiento de los ritmos circadianos

En esta sección abordaremos algunos conceptos que, ahora que conocemos qué es y la utilidad de un actograma, pueden ser explicados de manera más simple. Para ello, debemos remontarnos a la esquematización de los componentes del sistema circadiano (el Eskinograma en la Figura 2). Allí, podemos apreciar que el mecanismo mediante el cual el oscilador biológico es capaz de ajustar su período endógeno al período del ciclo ambiental es a través de la **sincronización**. Por medio de la sincronización, por ejemplo, un roedor nocturno es capaz de ajustar su reloj y sus ritmos endógenos de actividad locomotora, que tienen un período inferior a las 24 horas, a un ciclo LD de 24 horas. En este caso, este roedor tendrá que "alargar" su período endógeno para igualar al período del ciclo LD externo. Al hacerlo, los ritmos y el ciclo ambiental no solo van a coincidir en el período sino también en las fases. Un roedor nocturno bajo un ciclo LD, tendrá su fase de actividad coincidente con la noche y su fase de reposo coincidente con el día (ver Figuras 7 y 8). Este ajuste necesario de la fase circadiana endógena a la fase del ciclo ambiental es lo que se conoce como **entrenamiento** (del inglés, *entrainment*)[1] [Golombek & Rosenstein, 2010]. Los relojes circadianos tienen la capacidad de ser "entrenados" por los ciclos ambientales, y esta es una característica fundamental para la supervivencia de las especies. Veamos un ejemplo: si un roedor nocturno con un período endógeno de 23.9 horas, que es ligeramente inferior a 24 horas (solo hay una diferencia de 0.1 hs, es decir, 6 minutos entre uno y otro), no es capaz de entrenar al ciclo ambiental y continúa oscilando con su periodicidad endógena, al cabo de 10 días el sistema circadiano del animal va a estar 1 hora retrasado con respecto al ciclo ambiental natural. Luego de aproximadamente tres meses, el animal estaría en una fase completamente opuesta a la del ciclo ambiental y se tendría que convertir en diurno. La incapacidad de adecuar su fase endógena (mediante un reajuste en el período) a la del ambiente, generaría eventualmente una diferencia de fases entre ambos inadecuada para la supervivencia.

El entrenamiento ocurre por medio de la sincronización. Cuando el *zeitgeber* principal es el ciclo LD, existen varios modelos que intentan explicar cómo ocurre el mecanismo de sincronización y los efectos que la luz tiene sobre el reloj circadiano. La diferencia entre sincronización y entrenamiento en Cronobiología será abordada en el Capítulo I. A su vez, otros

[1] Algunos autores españoles prefieren llamar a este fenómeno "arrastramiento" o "encarrilamiento".

conceptos y modelos del mecanismo de sincronización serán abordados en la introducción al Capítulo II de la presente tesis.

La sincronización implica una estabilidad en la relación de fases entre el ritmo biológico y el ciclo ambiental. En otras palabras, si tomamos como fase el inicio de la actividad locomotora (*onset*) del roedor nocturno, ésta debe coincidir con la fase que da inicio a la oscuridad en el ciclo LD. De esta forma, podríamos evidenciar que ambas fases (la del ritmo y la del ciclo ambiental) coinciden de forma coherente con la naturaleza del animal, y podríamos decir que el ritmo está entrenado y sincronizado al ciclo ambiental. Sin embargo, - y a nuestro pesar - esto no es del todo cierto dado que se debe considerar otro mecanismo que podría estar actuando e interfiriendo con la observación: el **enmascaramiento** (*masking*). El enmascaramiento es la influencia directa del ciclo ambiental sobre los ritmos circadianos sin la intermediación de un reloj endógeno (ver Figura 2). El enmascaramiento puede ser de varios tipos: *negativo* cuando lo que se detecta es una supresión o disminución de la variable rítmica por efecto del estímulo ambiental, y *positivo* cuando se produce un potenciamiento de la misma [Mrosovsky, 1999]. Para ejemplificar este concepto, podríamos pensar que los patrones de actividad locomotora observados bajo un ciclo LD en un roedor nocturno podrían deberse a un simple efecto de la presencia/ausencia de la luz. En este sentido, el efecto inhibitorio de la luz sobre la actividad del animal ocurriría durante el día, y por la noche, al apagarse la luz, este efecto se cancela, el animal se desinhibe y comienza a mostrar actividad. La forma de corroborar si esto es cierto es la de poner al animal bajo condiciones de oscuridad constante para evidenciar si el ritmo se expresa en libre curso o no. En el caso más extremo de enmascaramiento (en este caso negativo), veríamos que el ritmo en libre curso no se mantiene y, por consiguiente, no existía una sincronización del reloj circadiano con el ciclo ambiental y era solo un efecto del enmascaramiento. Por el contrario, si el ritmo se mantiene y muestra una fase endógena que se corresponde y es coherente con la fase mostrada previamente bajo un ciclo LD (debido al cambio de período), entonces podemos decir que el ritmo de actividad locomotora observado estaba sincronizado con el ciclo ambiental. A pesar de que parecería que el enmascaramiento existe sólo para interferir en la interpretación de los resultados y molestar a los cronobiólogos, tiene una función biológica muy importante ya que flexibiliza el

sistema permitiéndole la adaptación aguda a cambios difíciles de predecir o de procesar evitando el control del reloj central circadiano.

Cabe mencionar que la sincronización y el enmascaramiento no son mecanismos excluyentes entre sí. Se pueden encontrar casos en los que un ritmo se encuentre tanto sincronizado como enmascarado simultáneamente por un ciclo ambiental. Un ejemplo muy común puede ocurrir en roedores nocturnos en donde el ritmo de actividad locomotora puede estar perfectamente sincronizado al ciclo LD, pero a la vez, su *onset* (el inicio de la actividad) puede estar suprimido por enmascaramiento negativo a causa de la presencia de luz unos minutos antes de la transición de luz a oscuridad. En este caso, al transferir al animal a oscuridad constante, podemos observar como el *onset* de la actividad en libre curso se adelanta unos minutos al *onset* previsto por el comportamiento previo. Así, el ritmo en su totalidad no se encuentra enmascarado por la luz sino sólo su *onset*.

1.9 Sincronización por disponibilidad temporal de alimento

Como se mencionó anteriormente, el oscilador circadiano central ubicado en los NSQ es sincronizado principalmente por el ciclo LD. Sin embargo, cuando la disponibilidad de alimento es restringida a un intervalo determinado del día (proceso conocido como *Time-Restricted Feeding* o **TRF**), los animales se adaptan en pocos días a esta condición alimentándose durante el período de disponibilidad de alimento y aumentando su actividad locomotora en las horas precedentes (mecanismo conocido como *Food Anticipatory Activity* o **FAA**). Este comportamiento persiste aun cuando los NSQ son lesionados, indicando la presencia de un oscilador sincronizado por comida (**FEO**, por su nombre en inglés *Food-Entrainable Oscillator*) que es independiente del reloj central circadiano [Mieda et al., 2006]. Si bien existe un número creciente de evidencias que indican que la FAA es modificada tanto por factores endocrinos homeostáticos (ghrelina, leptina, etc.) como por factores relacionados con el circuito de recompensa del cerebro (en particular, el sistema de dopamina), aún se desconocen sus vías específicas de regulación, así como la localización exacta del FEO en el cerebro [Pendergast & Yamazaki, 2018]. Este tipo de sincronización no fótica se abordará en detalle y será la temática principal del Capítulo III de la presente tesis.

Ahora que hemos explorado qué es y cómo funciona el sistema circadiano, podemos apreciar la gran variedad de procesos bioquímicos, fisiológicos y conductuales que están bajo su regulación en el organismo. Dentro de este amplio espectro, podemos encontrar un comportamiento que es inherente a la naturaleza de diversas especies animales y de los humanos: **la motivación por obtener una recompensa**. El comportamiento de motivación es el otro gran protagonista en esta historia y, en particular, el enfoque central de esta tesis será estudiar cómo está modulado por el sistema circadiano. Pero primero, vamos a conocer un poco más sobre la motivación.

2. Motivación por una recompensa

2.1 ¿Qué es la motivación por una recompensa?

El estudio de la motivación y sus fundamentos biológicos tiene una larga historia que interconecta la filosofía, la psicología y la neurociencia. Los pilares científicos de este campo se establecieron en el siglo XX, con el descubrimiento de Pavlov del condicionamiento operante clásico [Pavlov, 1928] y el desarrollo por parte de Skinner de la teoría del reforzamiento [Ferster & Skinner, 1957]. Estas investigaciones pioneras sentaron las bases conductuales para el estudio de la motivación. Estos y otros trabajos subsiguientes, permitieron identificar distintas partes del cerebro o "centros neuronales" que eran capaces de activar o suprimir un comportamiento o una acción que tuviera bases motivacionales [Olds, 1958]. Asimismo, permitieron clasificar los objetivos o metas que impulsan las conductas motivadas en dos categorías: aquellos orientados a obtener de manera eficiente recompensas placenteras, y aquellos dirigidos a la evasión de amenazas o de consecuencias negativas. Desde esta perspectiva más naturalista y evolucionista, Stuber (2023) define a la motivación como el acercamiento, evasión o cualquier otra acción cuantificable que ocurre como respuesta a estímulos sensoriales específicos con el objetivo de satisfacer una necesidad biológica. Dentro de estas necesidades biológicas, podemos incluir comportamientos que preservan la supervivencia de los animales en la naturaleza, tales como la alimentación (tanto el consumo de alimentos como de bebidas), el descanso, la reproducción y la defensa territorial. En este sentido, un animal en su entorno ecológico activa mecanismos motivacionales para buscar y obtener comida, evadir o escapar de depredadores, crear nidos o madrigueras para protegerse, o aparearse para mantener la supervivencia de la especie.

Una definición más general, y quizás más aplicable a la vida en nuestras sociedades modernas, es la dada por Carvalho Poyraz y colaboradores (2016) quienes entienden a la motivación como la activación de aquellos comportamientos que están dirigidos a la obtención de una recompensa (del inglés, *goal-directed behaviors*), sea cual fuere la naturaleza de la misma. Desde esta perspectiva, todas las acciones que se pongan en juego para alcanzar un objetivo específico, considerado recompensante, tiene bases motivacionales, independientemente de si esa recompensa satisface o no necesidades biológicas en el individuo. Esta visión sobre la

motivación captura una amplia gama de comportamientos humanos, subrayando que la recompensa buscada puede variar enormemente entre individuos y situaciones. Así, un individuo activa mecanismos motivacionales al seleccionar y preparar alimentos que disfruta, al esforzarse por atraer o conquistar a una potencial pareja, al ejercitarse buscando mejorar su estado físico, al estudiar por horas para rendir un examen para obtener un título de grado – o al sentarse frente a una computadora durante meses para escribir una tesis doctoral -, al buscar sustancias adictivas y drogas que le generan una sensación placentera, o al arriesgarse a perder dinero en juegos de azar con el fin de obtener una suma mayor.

Estas acciones, junto con las realizadas por los animales en la naturaleza y los seres humanos para satisfacer necesidades biológicas, activan circuitos cerebrales y mecanismos moleculares similares, conocidos colectivamente como el 'sistema de recompensa', que impulsan el comportamiento motivado. De igual manera, los trastornos motivacionales y la anhedonia (que se define como la incapacidad de experimentar placer) observados en diversas enfermedades neuropsiquiátricas, así como la adicción dañina a drogas y los trastornos alimentarios, se originan en disfunciones de estos mismos circuitos. Estas condiciones pueden ser el resultado, tanto del mal funcionamiento como de la sobreestimulación del sistema de recompensa del cerebro.

Es importante señalar que no solo las conductas orientadas hacia la búsqueda de recompensas placenteras activan el sistema de recompensa cerebral, sino también las conductas aversivas. Estas últimas, que se desencadenan en un intento de evadir o huir de estímulos o situaciones percibidos como peligrosos o desagradables, implican tanto los mecanismos del sistema de recompensa como otras áreas cerebrales responsables del procesamiento del miedo y el dolor. Estas conductas son igualmente relevantes en el estudio de la motivación y son necesarias para entender el funcionamiento de los circuitos neuronales involucrados. No obstante, el enfoque principal de esta tesis será en aquellas conductas motivadas que incitan al individuo a generar y persistir en una acción para obtener una recompensa natural, como la comida.

2.1.1 Teorías y conceptos del comportamiento de motivación por una recompensa

Las primeras teorías formuladas por psicólogos y neurocientíficos del comportamiento apuntaban a que la motivación ocurría como un mecanismo homeostático, para mantener el estado de equilibrio en el organismo. Así, por ejemplo, el organismo censaba el hambre mediante la secreción de diferentes hormonas y la activación de diversas vías metabólicas, desencadenando mecanismos para activar la motivación hacia la búsqueda de comida para satisfacer esa necesidad y volver al equilibrio. En ese sentido, el "impulso motivacional" (concepto adaptado del inglés como "*motivational drive*") estaba guiado por la "cantidad de hambre" que el animal tenía y la necesidad de saciarla; asimismo, ese impulso se reducía a medida que el animal ingería alimento [revisado en Berridge, 2004]. Sin embargo, estas teorías fallaban al intentar explicar algunos aspectos de la conducta de motivación relacionados con la parte hedónica (el placer). Una de ellas fue la observación de que en ratas se encontró una alta motivación por consumir soluciones con sacarina, aun cuando los animales no obtenían ningún nutriente o beneficio energético de las mismas [Sheffield, 1966]. Es así que surgieron nuevas teorías para intentar explicar este comportamiento, las cuales introdujeron el concepto de motivación incentiva o motivación por incentivos (concepto adaptado del inglés "*incentive motivation*"). En estas teorías un estímulo determinado tenía su propia valencia o valor hedónico intrínseco, como consecuencia de un proceso de aprendizaje y experiencias previas del animal, y era capaz de generar conductas motivadas para obtenerlo independientemente del estado fisiológico del animal. Adaptaciones posteriores de estas teorías incorporaron el estado fisiológico interno del organismo como mecanismo modulatorio de la motivación incentiva. En este sentido, el déficit fisiológico era capaz de modular el valor hedónico intrínseco de la recompensa, por ejemplo, el hambre o la saciedad podían aumentar o disminuir, respectivamente, la valencia hedónica del estímulo externo (la comida).

Bajo estas nuevas teorías, se fueron delineando conceptos que hoy se conocen como componentes básicos de la motivación: el "gustar" y el "querer" (conceptos adaptados de los términos en inglés "*liking and wanting*"). Muchas veces estos conceptos son utilizados como sinónimos, pero para el comportamiento de motivación ambos se distinguen entre sí dado que involucran diferentes mecanismos cerebrales. Como lo define Berridge (2004), el "gustar" es

esencialmente el impacto hedónico, es decir, la reacción que ocurre en el cerebro por el placer sensorial desencadenado al consumir una recompensa, por ejemplo, consumir una solución de sacarina por su sabor dulce. Asimismo, el "gustar" también puede ser desencadenado por un estímulo que esté asociado a la obtención de esa recompensa por medio de un mecanismo previo de aprendizaje (lo que se conoce como "estimulo condicionado" en la teoría del condicionamiento clásico o pavloviano). Por otro lado, el "querer", o también denominado "saliencia incentiva" (concepto adaptado del inglés "*incentive salience*"), es el valor motivacional incentivo o intrínseco de la recompensa. El "querer" no implica un placer sensorial, es puramente el valor que tiene el estímulo en la motivación del individuo, no su impacto hedónico. Explicado de manera más sencilla, el "querer" se refiere al impulso o la motivación para buscar recompensas, mientras que el "gustar" es el placer que se siente al obtener la recompensa y que luego genera asociaciones y preferencias por ese tipo de recompensa y su búsqueda, aun cuando no lo "necesitemos". En general, ambos procesos ocurren al mismo tiempo en la conducta motivacional, pero pueden ser separados uno del otro bajo determinadas circunstancias experimentales. Por ejemplo, la disrupción del sistema dopaminérgico mesolímbico, causada por lesiones neuroquímicas de las vías dopaminérgicas que van desde el área tegmental ventral (VTA) al núcleo accumbens (NAc) - regiones sumamente importantes para el sistema de recompensa, como veremos en breve - reducen dramáticamente la motivación incentiva o el "querer" comer una recompensa de comida apetitosa, pero no afectan el valor hedónico o el "gusto" por esa recompensa (que generalmente se miden mediante expresiones faciales "de placer" en animales) [Peciña et al., 1997; Berridge & Robinson, 1998]. Esto es, los roedores mostraron una baja motivación por obtener y consumir la recompensa apetitosa, pero cuando la consumieron mostraron señales de placer y de gusto por la misma. De hecho, la supresión completa del sistema dopaminérgico deja a los individuos prácticamente sin motivación por cualquier incentivo o estímulo placentero, como comida, sexo, drogas, etc. Sin embargo, el "gustar" o el impacto hedónico de los mismos incentivos permanece intacto [revisado en Berridge, 2004]. Por otro lado, se ha visto que ratones mutantes con una mayor señalización dopaminérgica "quieren" en exceso recompensas apetitosas azucaradas, mientras que el "gusto" por el dulce no se ve alterado y permanece igual que en los ratones control [Peciña et al., 2003]. Se cree que en la drogadicción

y en diversas patologías humanas con déficits motivacionales y hedónicos, podrían estar afectados estos procesos de manera independiente. Sin embargo, las vías y circuitos cerebrales involucrados en uno u otro proceso todavía no se encuentran totalmente caracterizadas, y siguen siendo objeto de estudio. Asimismo, el "querer" y el "gustar" son ambos necesarios para el normal funcionamiento del mecanismo de motivación por una recompensa.

Por otro lado, las teorías motivacionales han enfatizado el distinguir dos aspectos o componentes de la motivación: el direccional y el activacional. Así, la motivación implica un componente "direccional" que le permite al sujeto seleccionar eficientemente el comportamiento que lo llevará al resultado positivo de obtener una recompensa (comida, agua, sexo) o a evitar un estímulo nocivo (depredadores o potenciales peligros). Por otro lado, la motivación implica una cierta activación comportamental, caracterizada por el componente "activacional" que es el que inicia y mantiene el vigor y la persistencia de las acciones que lo llevarán a obtener la recompensa [Salamone et al., 2016]. Se cree que ambos componentes están regulados por diferentes circuitos neuronales, que involucran las llamadas vías de salida 'directa e indirecta' que conectan al NAc con otras áreas cerebrales del circuito de recompensa [Carvalho Poyraz et al., 2016]. Diferentes manipulaciones genéticas en estas vías neuronales pueden, por ejemplo, retrasar el inicio de la respuesta comportamental sin afectar el vigor o la persistencia de la respuesta una vez iniciada.

Existen muchas otras definiciones y terminologías utilizadas en el estudio de la motivación por una recompensa, muchas de ellas ligadas a conceptos y teorías provenientes del área de la psicología. Un abordaje tan extenso escapa los propósitos de la presente tesis, no obstante, es importante destacar que esto demuestra la complejidad inherente a la conducta de motivación, los diferentes componentes o aspectos en los que se puede 'subdividir' este comportamiento, y la necesidad de la existencia de múltiples circuitos y vías neuronales involucrados en los diversos aspectos subyacentes al comportamiento motivacional.

2.2 Circuitos neuronales involucrados en la motivación

Como se ha mencionado, la motivación es un comportamiento complejo en donde intervienen múltiples áreas y regiones cerebrales, que colectivamente llamamos el **sistema de**

recompensa. Sin embargo, este sistema no se encuentra aislado y actuando de manera independiente, sino que está en constante comunicación con otras regiones cerebrales que lo retroalimentan, modulan o inhiben. Dicho esto, para comprender la neurobiología subyacente al comportamiento de motivación, es necesario desglosar el proceso en etapas. Al hablar de etapas, nos referimos al secuencial procesamiento de información por parte de distintas áreas o circuitos neuronales en el cerebro. Para ello, es necesario entender cómo el sistema nervioso capta e integra las señales motivacionales del entorno para, luego, generar un aprendizaje conductual, formar memorias asociadas al refuerzo, mantener la homeostasis fisiológica, evaluar el estado emocional preexistente y, finalmente, llevar a cabo la conducta dirigida a la obtención de una recompensa. En los siguientes párrafos, se describirán a modo general estas etapas y los circuitos neuronales involucrados en cada una de ellas [revisado en Stuber, 2023]. La esquematización simplificada de este proceso se puede observar en la **Figura 9**.

En primer lugar, las distintas señales del entorno van a ser detectadas por las neuronas sensoriales que inervan la periferia del organismo. Este sistema sensorial transmite la información externa hacia las regiones cerebrales encargadas de su procesamiento, tales como el tronco encefálico, el hipotálamo, y las cortezas sensoriales primarias y secundarias. Luego, esta información es transmitida desde estas áreas hacia las regiones cortico-límbicas, comprendidas por la amígdala, el hipocampo y la corteza frontal. En estas regiones tiene lugar el aprendizaje asociativo, que implica asociar un estímulo con un resultado, así como los procesos de predicción de eventos y toma de decisiones. Esto implica que, basándose en el aprendizaje adquirido y las experiencias anteriores, se establece un curso de acción considerando tanto las señales actuales del entorno como el estado interno del organismo. Los circuitos neuronales en estas áreas captan nueva información sensorial, la procesan y la contrastan con la información almacenada previamente para ajustar la respuesta y facilitar la toma de decisiones óptima, teniendo en cuenta las necesidades internas, el entorno y las experiencias pasadas.

La información continúa su camino desde las regiones cortico-límbicas hacia las estructuras subcorticales comprendidas por el hipotálamo, la amígdala extendida y el estriado ventral. Estas áreas son fundamentales para el procesamiento de la información relacionada con los comportamientos instintivos que son esenciales para la supervivencia, tales como la

alimentación, la reproducción, la agresión y la huida. Además, estos circuitos son modulados tanto directa como indirectamente por diversas señales fisiológicas, entre ellas, las hormonas liberadas en la periferia del cuerpo. Esta interacción hormonal agrega una capa adicional de regulación, proporcionando a las áreas subcorticales información detallada sobre el estado energético y fisiológico del organismo. De esta manera, las estructuras subcorticales funcionan como centros de integración para el estado homeostático y metabólico del cuerpo, asegurando una respuesta coordinada y adaptativa ante diferentes estímulos y necesidades.

Figura 9. Circuitos neuronales involucrados en la generación del comportamiento de motivación. Esquematización de la integración de los estímulos sensoriales del ambiente para ser transformados en acciones motivadas. En primer lugar, la información de las señales motivacionales del entorno es captada a través de las neuronas sensoriales y llega a los distintos centros encargados de su procesamiento en la corteza cerebral. En la corteza sensorial se identifican y extraen características relevantes de la información recibida para luego ser enviada a los circuitos neuronales ubicados en las cortezas frontal y límbica. Allí, se establecen asociaciones causales entre las características sensoriales y las necesidades biológicas para determinar un correcto curso de acción. Luego, esta información es transmitida a las regiones subcorticales, el hipotálamo y la amígdala extendida, que son centros para el procesamiento de comportamientos instintivos, tales como comer y beber. Estos circuitos de comportamientos innatos interactúan con las neuronas dopaminérgicas ubicadas en el área tegmental ventral (VTA) para reforzar las acciones y asociaciones en curso. La liberación de dopamina en el estriado ventral, principalmente en el núcleo accumbens (NAc), modula la actividad de las neuronas en dicha zona, que luego van a señalizar a las regiones de los ganglios de la base y la corteza motora. Estas áreas son fundamentales para llevar a cabo acciones y movimientos que están dirigidos hacia la obtención de una recompensa. Imagen adaptada de [Stuber, 2023].

Finalmente, las neuronas provenientes de las áreas subcorticales transmiten la información integrada hacia las neuronas ubicadas en el mesencéfalo y en el cerebro posterior. Dentro de estas áreas, el **área tegmental ventral (VTA)** juega un papel crucial al centralizar la información relacionada con estímulos motivacionales y regular la liberación del neurotransmisor **dopamina (DA)** hacia el cerebro anterior. Este último incluye estructuras esenciales como el cuerpo estriado, el **núcleo accumbens (NAc)** y la corteza motora. La liberación de dopamina desde VTA al NAc es fundamental para activar los mecanismos de motivación. Paralelamente, la activación de regiones motoras, como el estriado dorsal y la corteza, es vital para la ejecución de las acciones y movimientos necesarios para obtener la recompensa. Este proceso es el punto de encuentro de los diferentes circuitos neuronales que han integrado la información del ambiente, del estado interno y del aprendizaje de eventos pasados, para dar lugar a la manifestación del comportamiento motivado. Es por ello que, en las siguientes secciones, hablaremos con mayor detalle de estas áreas y circuitos neuronales.

2.2.1 Las neuronas dopaminérgicas de VTA

Como se mencionó anteriormente, en el centro de los circuitos cerebrales encargados de la motivación se encuentran las neuronas dopaminérgicas de VTA. Se ha descripto en la literatura que estas neuronas desempeñan distintos roles en la motivación, la toma de decisiones, la memoria de trabajo, y la aversión [Morales & Margolis, 2017]. Los estudios realizados en los últimos años han demostrado que las diversas funciones que tienen las neuronas de VTA están mediadas por diferentes subpoblaciones de neuronas dopaminérgicas asociadas a distintas redes neuronales. Asimismo, en VTA coexisten junto con las neuronas dopaminérgicas, poblaciones de neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas, aunque son menos predominantes. El rol que cumplen estas últimas en la motivación es complejo, y se cree que principalmente regulan la actividad de las neuronas dopaminérgicas, aunque aún no se conoce de manera completa. Aquí nos enfocaremos principalmente en las neuronas dopaminérgicas de VTA y su modulación, dado que son las que inervan densamente el núcleo accumbens para controlar la intensidad de la motivación e influir en la formación de patrones de comportamiento asociados a la obtención de una recompensa.

La señalización dopaminérgica es un factor clave en el fortalecimiento de los comportamientos asociados a la obtención de una recompensa (término conocido en inglés como "*reinforcement*") [Wise, 2004; Witten et al., 2011]. Además, contribuye a que ciertos estímulos sean percibidos como altamente motivadores, generando un fuerte incentivo para la acción o búsqueda de recompensas asociadas (mecanismo mencionado previamente que se conoce en inglés como "*incentive salience*") [Berridge, 2007]. Esto quiere decir que cuando se libera dopamina desde VTA por la presencia de un estímulo externo, la percepción de este estímulo se ve aumentada en términos de su atractivo, lo que puede llevar a una mayor atención y una mayor probabilidad de que el individuo se comporte de determinada manera en respuesta a ese estímulo. Por otro lado, la señalización de las neuronas dopaminérgicas en VTA está implicada también en procesos relacionados con el aprendizaje y la predicción de errores. Por ejemplo, señalizan la discrepancia entre las recompensas esperadas y las recompensas obtenidas, proceso conocido como error de predicción de recompensas [Schultz, 1998; Cohen et al., 2012]. Asimismo, estas neuronas son las encargadas de generar las asociaciones entre las señales ambientales y las recompensas obtenidas [Jeong et al., 2022]. Por otra parte, las neuronas en VTA pueden codificar e integrar distintas señales sensoriales, motoras y cognitivas [Engelhard et al., 2019] provenientes de diversas regiones cerebrales, así como también las señales de la ingesta de nutrientes y de agua provenientes del tracto gastrointestinal [Grove et al., 2022].

La actividad de las neuronas dopaminérgicas de VTA está regulada de forma local por las neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas de VTA, y por sinapsis de eferentes neuronales provenientes de otras regiones cerebrales. Por ejemplo, las neuronas GABAérgicas en VTA son las principales reguladoras de las neuronas dopaminérgicas, inhibiendo su actividad. Esta inhibición reduce el consumo de la recompensa [Van Zessen et al., 2012], produce aversión generalizada [Tan et al., 2012] y contribuye al aprendizaje de predicción de errores disminuyendo la actividad dopaminérgica cuando se obtiene la recompensa [Eshel et al., 2015]. En cuanto a las regulaciones no locales de las neuronas en VTA, podemos encontrar sinapsis excitatorias provenientes de la habénula lateral (LHb). Estas excitan a las neuronas GABAérgicas en VTA, produciendo la consecuente inhibición de la actividad de las neuronas dopaminérgicas, lo que promueve las conductas de evasión y aversión [Lammel et al., 2012]. Esto quiere decir que la regulación desde

LHb hacia VTA reduce la actividad dopaminérgica para contribuir a la generación de comportamientos aversivos. Por otro lado, VTA es regulada también por sinapsis excitatorias e inhibitorias provenientes del área hipotalámica lateral (LHA). Esta señalización ocurre nuevamente sobre las neuronas GABAérgicas de VTA, controlando directamente su actividad, e indirectamente la liberación de dopamina, y modulando así de manera bidireccional los estados motivacionales [Nieh et al., 2016]. De esta regulación, se hablará con un poco más de detalle en la siguiente sección, dado que está implicada en los mecanismos del control homeostático de la motivación.

En conclusión, la regulación de las neuronas dopaminérgicas en VTA es altamente compleja e incluye probablemente múltiples regiones y circuitos neuronales que no están descriptos en su totalidad hasta el día de hoy. Esto adquiere sentido si pensamos que se requiere de un mecanismo regulatorio complejo y multifacético para que esta área pueda llevar a cabo funciones tan distintas de manera coordinada y en el momento apropiado. En cuanto a las vías de salida de VTA, las que son de nuestro interés son las que están relacionadas a los comportamientos motivados, como las eferencias dopaminérgicas hacia los circuitos de los ganglios de la base, incluyendo el NAc en el estriado ventral. Sin embargo, cabe mencionar que las neuronas dopaminérgicas de VTA también proyectan hacia distintas áreas cerebrales para llevar a cabo otras funciones, tales como la corteza prefrontal y la amígdala.

2.2.2 VTA integra las señales homeostáticas para transformar el “hambre” en motivación

La presente tesis tiene el foco en las conductas motivadas que se ponen en juego para obtener recompensas naturales, principalmente la comida. Las neuronas dopaminérgicas de VTA parecerían ser uno de los centros principales que integra las señales de la regulación homeostática del organismo para modular el estado motivacional en el individuo. En los siguientes párrafos se describirá esta comunicación con mayor detalle. Asimismo, en la **Figura 10** se pueden observar los diferentes circuitos neuronales implicados en la motivación centrados en la regulación a nivel de VTA.

Para transformar el hambre en una señal de motivación que inicie la búsqueda y el consumo de comida, las neuronas que responden a esta necesidad fisiológica interaccionan

directamente con el sistema de recompensa a nivel de VTA, la amígdala extendida y el hipotálamo lateral (o LHA). Esto ocurre gracias a las neuronas AgRP (péptido relacionado con el Agouti), ubicadas en el núcleo arcuato del hipotálamo ventral, que actúan como un termostato para el hambre. Por ejemplo, se ha visto que las neuronas AgRP aumentan su actividad bajo condiciones de deprivación de comida, mientras que la misma disminuye cuando los animales se alimentan [Betley et al., 2015; Chen et al., 2015]. La activación de las neuronas AgRP induce la alimentación [Aponte et al., 2011] y su actividad disminuye en respuesta a la entrega calórica intragástrica [Bai et al., 2019], sugiriendo que tiene un rol crítico en la transmisión de señales interoceptivas desde el intestino hacia el cerebro. Cuando se atenúa la actividad de las neuronas AgRP, afectando su capacidad de detectar calorías, se observa una reducción en la liberación de dopamina desde VTA hacia el NAc asociada a la alimentación [Reichenbach et al., 2022]. Por otro lado, se ha visto que la activación de las neuronas AgRP potencia la actividad dopaminérgica en VTA y la consecuente liberación de dopamina en el NAc [Mazzone et al., 2020; Alhadeff et al., 2019]. En este sentido, es probable que las neuronas AgRP del núcleo arcuato sean la primera estación de relevo en el cerebro encargadas de detectar las señales homeostáticas de la periferia relacionadas con el hambre para llevar esta información hacia los circuitos de recompensa, incrementando o disminuyendo los niveles motivacionales por la comida.

Una de las vías que conecta indirectamente a las neuronas AgRP con el sistema dopaminérgico en VTA podría tener al LHA como intermediario [Betley et al., 2013]. Existe un gran cúmulo de evidencias sobre la importancia del circuito LHA-VTA en la motivación y en los comportamientos relacionados con el consumo de las recompensas naturales como la comida. En particular, se ha reportado que las distintas poblaciones neuronales del LHA son reguladores fundamentales en los comportamientos relacionados con la alimentación [Rossi et al., 2019]. Por ejemplo, se ha visto que la estimulación optogenética de las neuronas glutamatérgicas en LHA interrumpe inmediatamente el consumo de la recompensa de comida, mientras que su completa ablación causa una sobrealimentación y un aumento del peso corporal [Stamatakis et al., 2016]. Por otro lado, se ha observado que la restricción calórica causa que las neuronas glutamatérgicas de LHA tengan menor actividad mientras que el consumo crónico de alimentos altamente calóricos la aumenta [Rossi et al., 2019]. En este circuito, las neuronas glutamatérgicas de LHA

Figura 10. Circuitos modulatorios de entrada y salida de VTA. El área tegmental ventral del mesencéfalo es una de las estructuras clave del sistema de recompensa. VTA tiene principalmente neuronas dopaminérgicas (en naranja) encargadas de regular las conductas de motivación, aunque también posee neuronas GABAérgicas (en celeste/azul) y glutamatérgicas (en verde) que actúan principalmente modulando la actividad de dopamina (DA). VTA recibe entradas neuronales regulatorias desde diferentes regiones cerebrales como la habénula lateral (LHb), cuyas proyecciones glutamatérgicas activan las neuronas GABAérgicas en VTA inhibiendo indirectamente la actividad dopaminérgica, lo que promueve conductas aversivas. Por otro lado, el núcleo arcuato (ARC) del hipotálamo ventral y sus neuronas AgRP censan las señales homeostáticas de la periferia del cuerpo vinculadas con el hambre. Sus proyecciones GABAérgicas al área hipotalámica lateral (LHA) inhiben la actividad de las neuronas excitatorias glutamatérgicas allí, que proyectan tanto a LHb como a VTA. Al inhibir las sinapsis excitatorias de LHA, las neuronas GABAérgicas en VTA dejan de estar activas, lo que causa una desinhibición de la actividad de las neuronas dopaminérgicas, y un aumento en la liberación de dopamina que incrementa los niveles motivacionales en respuesta al hambre. Las principales vías de salida de las neuronas dopaminérgicas de VTA son el estriado ventral (EV), la corteza prefrontal (PFC) y la amígdala basolateral (BLA). En particular la liberación de DA en las distintas regiones del núcleo accumbens (NAc) modula el comportamiento de motivación, mientras que el aprendizaje, la predicción de errores y la toma de decisiones vinculados a la obtención de recompensas esta mediado por el circuito cortical, subcortical y el hipocampo (Hipp).

proyectan directamente hacia VTA, principalmente mediando sinapsis excitatorias sobre las neuronas GABAérgicas. Esto quiere decir que cuando la actividad glutamatérgica en LHA aumenta, se activan las neuronas GABAérgicas de VTA, causando la inhibición de las neuronas

dopaminérgicas de VTA, reduciendo así la liberación de dopamina y disminuyendo los niveles motivaciones por la búsqueda y consumo de recompensas de comida (ver Figura 10). Asimismo, cuando la actividad glutamatérgica en LHA disminuye ocurre lo contrario, es decir, el sistema se desinhibe y se incrementa la liberación de dopamina aumentando los niveles motivacionales y el consumo de alimentos. En conjunto, los distintos tipos de neuronas en LHA actúan como entradas esenciales para los circuitos de recompensa del cerebro dando información, principalmente a nivel del VTA, sobre el estado energético del organismo. Al mismo tiempo, se sabe que las neuronas en LHA también proyectan hacia áreas cerebrales motoras en el tronco cerebral, para hacer coincidir la liberación de dopamina con patrones motores necesarios en la alimentación, como la masticación.

En resumen, un posible circuito para convertir las señales homeostáticas del organismo en conductas motivadas podría incluir la detección de las hormonas circulantes asociadas con la alimentación y el ayuno (tales como leptina y ghrelina) por parte de las neuronas AgRP en el núcleo arcuato, cuya activación o inhibición modula la actividad de las neuronas glutamatérgicas en LHA influyendo así sobre la capacidad inhibitoria de las neuronas GABAérgicas en VTA que, a su vez, controlan la liberación de dopamina impactando finalmente en el estado motivacional.

2.2.3 El núcleo accumbens del cuerpo estriado

El estriado es un importante punto de convergencia en el cerebro anterior, encargado de llevar a cabo diversas funciones conductuales y procesos cognitivos, tales como la motivación, las emociones, la cognición y la coordinación de movimientos. Tras la integración de diversas señales provenientes de múltiples estructuras cerebrales, el estriado transforma estas señales compuestas en una acción observable o resultado conductual. Es una estructura compleja, conformada por subregiones con características neuroanatómicas particulares y funcionalidades distintas. A grandes rasgos, el estriado puede subdividirse en dos partes principales: el estriado dorsal y el estriado ventral. El estriado dorsal, que incluye el núcleo caudado y el putamen, está implicado principalmente en funciones motoras y cognitivas. Por otro lado, el estriado ventral, compuesto principalmente por el núcleo accumbens, forma parte del sistema de recompensa y

se encarga de regular los comportamientos motivados, el placer y las respuestas emocionales. Asimismo, el NAc sirve como una interfase entre el sistema límbico y las regiones motoras.

Anatómicamente, el núcleo accumbens se puede subdividir en una región central (el *core*) recubierta por una región más externa (el *shell*) [Zaborszky et al., 1985]. Estas dos regiones están compuestas por distintos tipos celulares, y sus características histoquímicas y electrofisiológicas son distintas (**Figura 11A**) [Wright & Groenewegen, 1996]. Además, están anatómicamente interconectadas con distintas regiones cerebrales, expresan distintos tipos de receptores y se activan por diferentes sustancias neuromoduladoras [revisado en Salgado & Kapplit, 2015].

Las aferencias neuronales que llegan al NAc son diversas (**Figura 11B**). Como ya se mencionó, las vías dopaminérgicas principales que llegan al NAc provienen de VTA (vías dopaminérgicas mesolímbicas). Asimismo, el estriado dorsal también recibe entradas dopaminérgicas desde sustancia nigra (vías dopaminérgicas nigroestriatales). Por otro lado, las aferencias glutamatérgicas excitatorias que llegan al NAc provienen de la amígdala, el hipocampo, el tálamo, y las cortezas prelímbicas y prefrontales [Salgado & Kapplit, 2015]. Además, la parte medial de la región del *shell* del NAc recibe una entrada directa desde el LHA, y en particular del sistema de orexinas presentes allí [Baldo et al., 2003; Diniz and Bittencourt, 2017]. Como vimos anteriormente, el LHA es una estación de relevo del metabolismo del organismo que también señaliza hacia VTA. En este caso, la conexión entre el LHA y el NAc sugiere una modulación adicional hacia los centros motivacionales sobre el estado energético. Por otro lado, las neuronas del NAc proyectan hacia varias regiones del mesencéfalo y de los ganglios de la base, y son principalmente eferentes GABAérgicos (Figura 11B). Por ejemplo, la región del *core* del NAc se conecta con áreas premotoras y motoras de la corteza, mientras que el *shell* se conecta con áreas corticales prefrontales, así como con una gama de áreas motoras subcorticales, incluyendo la amígdala extendida y el LHA [Zahm & Brog, 1992; Alexander et al., 1986]. Asimismo, el *core* y el *shell* del NAc proyectan hacia distintas estructuras subcorticales, talámicas, y de la corteza formando un circuito neuronal que se conoce como el bucle cortico-striato-pálido-tálamo-cortical encargado de procesar información de diversos estímulos, y que tiene un papel central en el control del movimiento, la percepción sensorial, la estimación temporal, la regulación emocional y otra gran variedad de funciones cognitivas. Adicionalmente, el NAc también tiene salidas

neuronales hacia las regiones dopaminérgicas del cerebro, retroalimentando el circuito: el *core* del NAc proyecta hacia sustancia nigra, mientras que el *shell* hacia VTA [Heimer et al., 1991; O'Donnell et al., 1997].

Figura 11. El núcleo accumbens y los circuitos neuronales del sistema de recompensa. (A) El núcleo accumbens (NAc) está ubicado en la parte ventral del cuerpo estriado, y se puede dividir anatómicamente en la región del *core* y del *shell*. **(B)** El NAc se conecta con múltiples regiones cerebrales y recibe, a su vez, entradas desde diversas áreas. Las vías de salida del NAc son principalmente GABAérgicas (azul) y proyectan a la amígdala (AMG), el globo pálido (GP), el área hipotalámica lateral (LHA) y la corteza prefrontal (PFC). La principal entrada dopaminérgica (naranja) al NAc proviene del área tegmental ventral (VTA), que a su vez recibe información del sistema de serotonina (amarillo) ubicado en los núcleos dorsales del rafe (DRN). La información homeostática y metabólica de la periferia llega al NAc y a VTA desde LHA a través del núcleo arcuato (ARC). Asimismo, el NAc forma parte del circuito cortico-tálamo-límbico-cortical a través de sus salidas hacia el GP, de allí al área subtalámica (STN), luego al tálamo que proyecta a la corteza, y desde allí nuevamente a las distintas regiones del estriado dorsal (como el caudado-putamen, CPu) y ventral.

El NAc ha sido el foco de extensas investigaciones durante décadas debido a su implicancia en diversos trastornos neurológicos y psiquiátricos, así como en el consumo de sustancias adictivas y drogas. Se ha establecido su relevancia en condiciones tales como la depresión, el

desorden obsesivo-compulsivo, el desorden bipolar, los trastornos de ansiedad, las enfermedades de Parkinson, Alzheimer y Huntington, la obesidad, y la adicción a diversos tipos de drogas [revisado en Salgado & Kapplit, 2015]. Se destaca como un factor común esencial a estas diversas afecciones al sistema dopaminérgico proveniente desde VTA hacia el NAc. En cuanto a las funcionalidades del NAc que han sido descriptas, los estudios han demostrado que desempeña roles cruciales en la locomoción [Kelly et al., 1975], el aprendizaje condicionado [Everitt et al., 1991], la impulsividad [Basar et al., 2010], comportamientos de asunción de riesgos [Kuhnen & Knutson, 2005], la alimentación [Kelly et al., 2005], la motivación sexual [Everitt, 1990], así como en la obtención de recompensas [Robinson et al., 1989; Di Chirara, 1995]. La gran cantidad de investigaciones dejan en claro que el NAc es una estructura clave del sistema natural de recompensa, modulando la motivación. Asimismo, la gran diversidad de funcionalidades llevadas a cabo por el NAc podría deberse a las múltiples conexiones con otras estructuras cerebrales, así como a los diferentes neuromoduladores involucrados.

Varias evidencias señalan que la DA y la serotonina son importantes en el control de la motivación por comida y los procesos que involucran recompensas naturales, como la alimentación y el comportamiento sexual [Yagishita, 2020]. Dentro del NAc, la acción de DA está mediada principalmente por los receptores de dopamina tipo 1 y 2 (D1 y D2). Aunque la dopamina parecería actuar como un sistema de comunicación compartido entre la búsqueda de alimentos y el consumo de drogas, los mecanismos implicados en ambos procesos pueden ser distintos [DiLeone et al., 2012]. Asimismo, se ha reportado que en pacientes con trastornos del estado de ánimo (del inglés "*mood disorders*") y en modelos animales de depresión, las vías dopaminérgicas de VTA al NAc están alteradas, así como la actividad en el NAc se ve reducida [Heller et al., 2009; Nestler & Carlezon, 2006]. En respaldo del papel de la dopamina en la motivación por una recompensa de comida, se ha observado que la depleción completa de DA produce que los animales dejen de buscar activamente alimentos (y, debido a ello, eventualmente mueran de hambre), pero si se les coloca la comida directamente en la boca, la consumen [Salamone & Correa, 2012]. También se ha encontrado que el tratamiento con antagonistas de los receptores de DA reduce la respuesta motivacional por obtener una recompensa de comida cuando los animales deben realizar un gran esfuerzo para obtenerla, pero no cuando el esfuerzo

es menor [Salamone & Correa, 2012; Kelley, 2004]. En este contexto, generalmente se asume que la señalización dopaminérgica está principalmente implicada en la motivación incentiva (el componente de "querer" o "*wanting*" de la motivación) [Salamone & Correa, 2012]. Sin embargo, estudios más recientes demuestran que las distintas regiones del NAc (*core* y *shell*) podrían estar desempeñando diferentes roles en el comportamiento motivado, con la región del *shell* modulando principalmente la valencia hedónica ("*liking*"), y la región del *core* involucrada en el aprendizaje y la motivación intrínseca guiada a la obtención de un objetivo ('*goal-directed behavior*') [revisado en Becker-Krail et al., 2022]. Estas diferencias funcionales se deben no solo a la integración diferencial de las señales dopaminérgicas provenientes de VTA, sino también a las variadas inervaciones que reciben ambas regiones del NAc desde otras áreas del cerebro.

El rol preponderante de la señalización dopaminérgica en el NAc está ampliamente demostrado. Sin embargo, cabe mencionar que la serotonina (5-HT) también tiene un rol en la modulación del comportamiento de motivación. Respecto a la motivación por recompensas naturales, Sanders y colaboradores (2007) han demostrado que la administración de fluoxetina, un fármaco que inhibe al transportador de serotonina (SERT), y las deleciones genéticas de SERT, reducen las respuestas operantes para obtener una recompensa de comida en ratones evaluados en distintos paradigmas conductuales. Asimismo, un estudio reciente ha demostrado que las neuronas de 5-HT de los núcleos dorsales del rafe (DRN) responden cuando los animales reciben diversas recompensas naturales (como comida, sacarosa, sexo, o interacciones sociales), lo que sugiere que el DRN podría servir como una estructura para el procesamiento de la recompensa en paralelo al sistema dopaminérgico del mesencéfalo [Li et al., 2016].

La neuromodulación del NAc es compleja. Se sabe que los receptores dopaminérgicos interactúan con una gran variedad de receptores de otros tipos de neurotransmisores como acetilcolina, glutamato, serotonina y péptidos del sistema natural de opioides, para modular la actividad en el NAc. De hecho, nuevas líneas de investigación señalan un potencial rol de los receptores de opioides del NAc en el control de la motivación y su implicancia en enfermedades psiquiátricas, como la depresión [Callaghan et al., 2018; Castro & Bruchas, 2019]. Sin embargo, aún hoy en día se desconoce por completo cómo esta estructura tan importante para el sistema

de recompensa es capaz de integrar las diferentes señales y generar el gran repertorio de comportamientos motivados.

2.3 ¿Cómo podemos medir la motivación en roedores?

Medir la motivación en roedores, especialmente en contextos de laboratorio, implica el desarrollo de métodos y técnicas que permitan evaluar los diferentes aspectos involucrados en dicho comportamiento. Hoy en día, existe una gran cantidad de procedimientos conductuales que se han desarrollado a lo largo de la historia de la psicología experimental y la biología del comportamiento con los cuales se pueden diseccionar los procesos y componentes motivacionales. El tipo de prueba o test a utilizar dependerá del objetivo a estudiar y de la hipótesis a responder, y los mismos pueden variar desde pruebas comportamentales simples y que no requieren el uso de la tecnología, hasta el diseño de jaulas automatizadas que analizan variables complejas del comportamiento evaluado. Cabe mencionar que los diferentes tests mencionados a continuación pueden ser adaptados y utilizados con recompensas naturales (comida) y no naturales, de hecho, suelen ser muy utilizados para medir la motivación en roedores por la búsqueda y el consumo de sustancias adictivas o drogas.

Para evaluar el componente hedónico de la recompensa (el "*liking*" o "gustar") o la falta del mismo (anhedonia), el test en roedores más utilizado consiste en presentarles una sustancia palatable y medir la preferencia, el placer o la reacción hedónica hacia la misma. Hay varias formas de evaluar estos tipos de reacciones en roedores. La más simple es la prueba de preferencia por sacarosa [Muscat & Willner, 1989]. Esta prueba aprovecha el hecho de que, cuando a los roedores se les da a elegir libremente entre agua y una solución de sacarosa, generalmente optan por consumir en mayor cantidad la solución de sacarosa [Muscat & Willner, 1989]. Esta preferencia es un indicador de una respuesta hedónica placentera a la solución de sacarosa. Así, al medir la cantidad total de sacarosa consumida durante un período de tiempo se puede evaluar el componente hedónico en los roedores. Otro método para evaluar la reacción hedónica ante una recompensa, es la prueba de reactividad al sabor ("*taste-reactivity test*") [Grill & Norgren, 1978). Esta prueba se basa en la respuesta hedónica universal a ciertos sabores, evidente desde humanos hasta ratones. La exposición a lo dulce induce movimientos específicos

de la lengua y la boca, a diferencia de la reacción a sabores amargos, lo cual es un buen indicador de una respuesta placentera o no hacia la recompensa [Berridge & Robinson, 2003; Peciña & Berridge, 2005]. Al exponer a los animales a diversas soluciones, registrar y evaluar sus expresiones faciales, los investigadores pueden identificar tanto las reacciones hedónicas positivas como negativas, así como examinar cómo la modificación de distintos circuitos neurobiológicos afecta la respuesta hedónica.

Para evaluar la motivación incentiva o intrínseca (el componente "*wanting*" o el "querer") en roedores se suelen utilizar paradigmas conductuales que permiten evaluar que tan dispuesto está el animal a realizar una respuesta específica para obtener algún tipo de recompensa. Este tipo de conductas se conoce como "motivación instrumental" y está dirigido hacia un objetivo específico (término usado en el inglés como "*goal-directed*"), lo que implica que el animal está motivado a involucrarse en generar una respuesta anticipando que va a obtener una recompensa, haciendo una evaluación previa de costo/beneficio [Salamone et al., 2007]. Al manipular el tipo y la cantidad de esfuerzo requerido y/o las características de la recompensa, se pueden evaluar diversos aspectos del comportamiento de motivación.

Para utilizar este tipo de paradigmas conductuales se necesita contar con jaulas operantes específicamente diseñadas para roedores (**Figura 12A**). Las variaciones del tipo de equipamiento de las mismas son múltiples, pero generalmente están compuestas por algún tipo de mecanismo que permite medir la respuesta que debe hacer el animal (presionar una palanca, tocar algún sensor del tipo "*nose-poke*" o un dispositivo que el animal debe lamer), un receptáculo donde obtiene las recompensas y un sistema dispensador de las mismas, y un dispositivo (luz o sonido) que indica el inicio y la finalización de la sesión comportamental. Asimismo, en este tipo de protocolos se requiere de una habituación y entrenamiento previo para que el animal pueda aprender la asociación básica de respuesta-recompensa (conocido generalmente como entrenamiento en **condicionamiento operante**). Una vez que los animales aprenden esta asociación, pueden ser evaluados en el paradigma conductual para evaluar la motivación por una recompensa. Los protocolos más utilizados y considerados como los '*gold standards*' para medir comportamientos motivados, son los programas de reforzamiento de tasa fija (*fixed-ratio schedule*, o FR) o de tasa progresiva (*progressive ratio schedule*, o PR). En el FR, el animal obtiene

la recompensa luego de generar una cantidad fija (FR5, FR10, FR15 o FR25) de respuestas, por ejemplo, presionar una palanca. A lo largo de varias sesiones, el número de presiones requeridas para obtener la recompensa puede aumentar (al ir aumentando el FR), y la medida en que los animales están dispuestos a seguir presionando ante un aumento en los requisitos de trabajo proporciona un indicador de cuán motivado está un animal para obtener la recompensa [Salamone et al., 2003]. Por otro lado, en el paradigma de **tasa progresiva (PR)**, durante la sesión comportamental, los animales sólo obtienen la recompensa después de que realicen una cierta cantidad de respuestas, pero el requisito de trabajo para cada recompensa aumenta después de la entrega de la misma. Con cada recompensa subsiguiente, el esfuerzo se vuelve más y más difícil, hasta que en algún momento el animal deja de responder. El requisito de trabajo en el cual el animal deja de responder se toma como un índice de motivación. Durante este programa, el requisito de respuesta aumenta según alguna regla matemática después de cada recompensa, por ejemplo, se han utilizado progresiones exponenciales, geométricas y aritméticas variadas [Killeen et al., 2009; Richardson & Roberts, 1996].

En la presente tesis el protocolo elegido para evaluar la motivación fue el de tasa progresiva (**Figura 12B**) debido a que no requiere de una gran cantidad de sesiones comportamentales para evaluar el comportamiento (lo que podría influir negativamente en los animales al perturbar continuamente sus condiciones normales de alojamiento) y porque permite obtener diversas mediciones del desempeño de los animales en la tarea para evaluar la motivación. Por un lado, como se mencionó previamente, el momento en el que la respuesta del animal cesa puede identificarse como la pérdida de la motivación para trabajar por la recompensa de comida. Este momento, se define como el "punto de quiebre" (al que llamaremos en adelante ***breaking point,*** por su denominación del inglés) y nos permite comparar la motivación entre distintos grupos experimentales. Asimismo, podemos utilizar el **número de respuestas totales** realizadas y la **cantidad de recompensas obtenidas** durante la sesión como índices de la motivación [Richardson and Roberts, 1996; Drew et al., 2007]. Estos parámetros son dependientes entre sí: un alto número de respuestas indica una mayor cantidad de recompensas obtenidas, un mayor *breaking point* y, por consiguiente, un alto nivel motivacional. Adicionalmente, el análisis tradicional de la motivación en el test de PR incluye la comparación entre grupos de las "curvas

Figura 12. Jaulas operantes y protocolo de tasa progresiva (PR) para evaluar la motivación por una recompensa en ratones. (A) Se muestran fotografías tomadas a las jaulas operantes que se utilizaron en los experimentos de esta tesis para evaluar la motivación por una recompensa de comida en ratones. Las mismas cuentan con un sistema dispensador de *pellets* de comida (de 20 mg cada uno) y dos palancas retraíbles ubicadas a cada lado del receptáculo donde se depositan las recompensas. **(B)** Para evaluar la motivación los ratones son ubicados dentro de las jaulas operantes y durante la sesión comportamental de PR (que tiene una duración de 2 horas) deben incrementar cada vez más la cantidad de presiones de la palanca para obtener las sucesivas recompensas de comida. Luego de la sesión, la motivación del animal se analiza a partir de la cantidad de presiones realizadas, las recompensas obtenidas, el *breaking point*, la persistencia durante la sesión y la dinámica de la respuesta.

de supervivencia" de los animales en la prueba comportamental. Esto quiere decir que se analiza cómo es la **persistencia de los animales en la tarea** dentro de un grupo, y se comparan las caídas de las curvas entre grupos mediante el análisis estadístico que se usa comúnmente para evaluar la sobrevida [Drew et al., 2007; Simpson et al., 2011]. Estos gráficos son especialmente informativos porque muestran y consideran los datos de todos los sujetos, mientras que las medidas promedio pueden ocultar diferencias individuales o verse afectadas de manera

desproporcionada por casos extremos. Por otro lado, el test comportamental también brinda información de los tiempos de cada una de las presiones de palanca realizadas por un animal durante la sesión. Esta información permite evidenciar cómo es la respuesta de los animales a lo largo de la sesión de PR. En consecuencia, se puede graficar la **dinámica de la respuesta** con el objetivo de sumar un nivel adicional de análisis de los datos obtenidos, y no sólo evaluar los promedios "estáticos" de la respuesta total. De esta forma, podemos comparar cuál es la tendencia a lo largo del tiempo que sigue la respuesta motivacional de los animales y la evolución temporal de este comportamiento durante la sesión de PR, dado que podría ser distinta bajo las diferentes condiciones de evaluación, así como también variar a lo largo de la sesión para un mismo animal. Este tipo de análisis no se ha publicado aún, y es un método de análisis original de la presente tesis. En la sección de metodología del Capítulo I se describirá con mayor detalle cómo se realizó el mismo.

3. Referencias bibliográficas de la Introducción General

Abe, H., Honma, S., Namihira, M., Tanahashi, Y., Ikeda, M., & Honma, K. I. (1998). Circadian rhythm and light responsiveness of BMAL1 expression, a partner of mammalian clock gene Clock, in the suprachiasmatic nucleus of rats. Neuroscience letters, 258(2), 93-96.

Abrahamson, E. E., & Moore, R. Y. (2001). Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. Brain research, 916(1-2), 172-191.

Akashi, M. Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKIepsilon) and CKIdelta. Mol Cell Biol, 22(6).

Alexander, G. E., DeLong, M. R., & Strick, P. L. (1986). Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annual review of neuroscience*, *9*(1), 357-381.

Alhadeff, A. L., Goldstein, N., Park, O., Klima, M. L., Vargas, A., & Betley, J. N. (2019). Natural and drug rewards engage distinct pathways that converge on coordinated hypothalamic and reward circuits. *Neuron*, *103*(5), 891-908.

Antle, M. C., Kriegsfeld, L. J., & Silver, R. (2005). Signaling within the master clock of the brain: localized activation of mitogen-activated protein kinase by gastrin-releasing peptide. Journal of Neuroscience, 25(10), 2447-2454.

Aponte, Y., Atasoy, D., & Sternson, S. M. (2011). AGRP neurons are sufficient to orchestrate feeding behavior rapidly and without training. *Nature neuroscience*, *14*(3), 351-355.

Asai, M., Yoshinobu, Y., Kaneko, S., Mori, A., Nikaido, T., Moriya, T., ... & Shibata, S. (2001). Circadian profile of Per gene mRNA expression in the suprachiasmatic nucleus, paraventricular nucleus, and pineal body of aged rats. Journal of neuroscience research, 66(6), 1133-1139.

Aschoff, J. (1965). "Circadian Rhythms in Man." Science 148(3676): 1427-1432.

Bai, L., Mesgarzadeh, S., Ramesh, K. S., Huey, E. L., Liu, Y., Gray, L. A., ... & Knight, Z. A. (2019). Genetic identification of vagal sensory neurons that control feeding. *Cell*, *179*(5), 1129-1143.

Baldo, B. A., Daniel, R. A., Berridge, C. W., & Kelley, A. E. (2003). Overlapping distributions of orexin/hypocretin-and dopamine-β-hydroxylase immunoreactive fibers in rat brain regions mediating arousal, motivation, and stress. *Journal of Comparative Neurology*, *464*(2), 220-237.

Balsalobre, A., S. A. Brown, et al. (2000). "Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling." Science 289(5488): 2344-2347.

Basar, K., Sesia, T., Groenewegen, H., Steinbusch, H. W., Visser-Vandewalle, V., & Temel, Y. (2010). Nucleus accumbens and impulsivity. *Progress in neurobiology*, *92*(4), 533-557.

Becker-Krail, D. D., Walker, W. H., & Nelson, R. J. (2022). The ventral tegmental area and nucleus accumbens as circadian oscillators: implications for drug abuse and substance use disorders. Frontiers in Physiology, 13, 886704.

Berridge, K. C. (2004). Motivation concepts in behavioral neuroscience. *Physiology & behavior*, *81*(2), 179-209.

Berridge, K. C. (2007). The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience. *Psychopharmacology*, *191*, 391-431.

Berridge, K. C., & Robinson, T. E. (1998). What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain research reviews*, *28*(3), 309-369.

Berridge, K. C., & Robinson, T. E. (2003). Parsing reward. Trends in neurosciences, 26(9), 507-513.

Betley, J. N., Cao, Z. F. H., Ritola, K. D., & Sternson, S. M. (2013). Parallel, redundant circuit organization for homeostatic control of feeding behavior. *Cell*, *155*(6), 1337-1350.

Betley, J. N., Xu, S., Cao, Z. F. H., Gong, R., Magnus, C. J., Yu, Y., & Sternson, S. M. (2015). Neurons for hunger and thirst transmit a negative-valence teaching signal. *Nature*, *521*(7551), 180-185.

Brown, A. J., Pendergast, J. S., & Yamazaki, S. (2019). Focus: Clocks and Cycles: Peripheral Circadian Oscillators. The Yale Journal of Biology and Medicine, 92(2), 327.

Brown, S. A., Zumbrunn, G., Fleury-Olela, F., Preitner, N., & Schibler, U. (2002). Rhythms of mammalian body temperature can sustain peripheral circadian clocks. Current biology, 12(18), 1574-1583.

Buijs, R. M., Chun, S. J., Niijima, A., Romijn, H. J., & Nagai, K. (2001). Parasympathetic and sympathetic control of the pancreas: a role for the suprachiasmatic nucleus and other hypothalamic centers that are involved in the regulation of food intake. Journal of Comparative Neurology, 431(4), 405-423.

Cailotto, C., J. Lei, et al. (2009). "Effects of nocturnal light on (clock) gene expression in peripheral organs: a role for the autonomic innervation of the liver." PLoS One 4(5): e5650.

Callaghan, C. K., Rouine, J., & O'Mara, S. M. (2018). Potential roles for opioid receptors in motivation and major depressive disorder. *Progress in Brain Research*, *239*, 89-119.

Carvalho Poyraz, F., Holzner, E., Bailey, M. R., Meszaros, J., Kenney, L., Kheirbek, M. A., ... & Kellendonk, C. (2016). Decreasing striatopallidal pathway function enhances motivation by energizing the initiation of goal-directed action. *Journal of Neuroscience*, *36*(22), 5988-6001.

Castro, D. C., & Bruchas, M. R. (2019). A motivational and neuropeptidergic hub: anatomical and functional diversity within the nucleus accumbens shell. *Neuron*, *102*(3), 529-552.

Chen, Y., Lin, Y. C., Kuo, T. W., & Knight, Z. A. (2015). Sensory detection of food rapidly modulates arcuate feeding circuits. *Cell*, *160*(5), 829-841.

Cheng, M. Y., Bullock, C. M., Li, C., Lee, A. G., Bermak, J. C., Belluzzi, J., ... & Zhou, Q. Y. (2002). Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus. Nature, 417(6887), 405-410.

Chun, L. E., Woodruff, E. R., Morton, S., Hinds, L. R., & Spencer, R. L. (2015). Variations in phase and amplitude of rhythmic clock gene expression across prefrontal cortex, hippocampus, amygdala, and hypothalamic paraventricular and suprachiasmatic nuclei of male and female rats. Journal of biological rhythms, 30(5), 417-436.

Cohen, J. Y., Haesler, S., Vong, L., Lowell, B. B., & Uchida, N. (2012). Neuron-type-specific signals for reward and punishment in the ventral tegmental area. *nature*, *482*(7383), 85-88.

Cutler, D. J., Haraura, M., Reed, H. E., Shen, S., Sheward, W. J., Morrison, C. F., ... & Piggins, H. D. (2003). The mouse VPAC2 receptor confers suprachiasmatic nuclei cellular rhythmicity and responsiveness to vasoactive intestinal polypeptide in vitro. European Journal of Neuroscience, 17(2), 197-204.

Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., & Schibler, U. (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. Genes & development, 14(23), 2950-2961.

De Candolle, A. P. (1832). Physiologie Végétale.en J. Bechet, editor, Paris.

De Mairan, J. J. (1729). Observation Botanique pp. pp. 35-36 Histoire de L'Academie royale des sciences, Paris.

DeCoursey, P. J., J. R. Krulas, et al. (1997). "Circadian performance of suprachiasmatic nuclei (SCN)- lesioned antelope ground squirrels in a desert enclosure." Physiol Behav 62(5): 1099-1108.

Di Chiara, G. (1995). The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation. *Drug and alcohol dependence*, *38*(2), 95-137.

DiLeone, R. J., Taylor, J. R., & Picciotto, M. R. (2012). The drive to eat: comparisons and distinctions between mechanisms of food reward and drug addiction. *Nature neuroscience*, *15*(10), 1330-1335.

Diniz, G. B., & Bittencourt, J. C. (2017). The melanin-concentrating hormone as an integrative peptide driving motivated behaviors. *Frontiers in systems neuroscience*, *11*, 32.

Drew, M. R., Simpson, E. H., Kellendonk, C., Herzberg, W. G., Lipatova, O., Fairhurst, S., ... & Balsam, P. D. (2007). Transient overexpression of striatal D2 receptors impairs operant motivation and interval timing. Journal of Neuroscience, 27(29), 7731-7739.

Eide, E. J., Kang, H., Crapo, S., Gallego, M., & Virshup, D. M. (2005). Casein kinase I in the mammalian circadian clock. In Methods in enzymology (Vol. 393, pp. 408-418). Academic Press.

Engelhard, B., Finkelstein, J., Cox, J., Fleming, W., Jang, H. J., Ornelas, S., ... & Witten, I. B. (2019). Specialized coding of sensory, motor and cognitive variables in VTA dopamine neurons. *Nature*, *570*(7762), 509-513.

Eshel, N., Bukwich, M., Rao, V., Hemmelder, V., Tian, J., & Uchida, N. (2015). Arithmetic and local circuitry underlying dopamine prediction errors. *Nature*, *525*(7568), 243-246.

Everitt, B. J. (1990). Sexual motivation: a neural and behavioural analysis of the mechanisms underlying appetitive and copulatory responses of male rats. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *14*(2), 217-232.

Everitt, B. J., Morris, K. A., O'brien, A., & Robbins, T. W. (1991). The basolateral amygdala-ventral striatal system and conditioned place preference: further evidence of limbic-striatal interactions underlying reward-related processes. *Neuroscience*, *42*(1), 1-18.

Ferster, C. B., & Skinner, B. F. (1957). Mixed schedules.

Golombek, D. A., & Rosenstein, R. E. (2010). Physiology of circadian entrainment. Physiological reviews, 90(3), 1063-1102.

Golombek, D. A., Ferreyra, G. A., Agostino, P. V., Murad, A. D., Rubio, M. F., Pizzio, G. A., ... & Bekinschtein, T. A. (2003). From light to genes: moving the hands of the circadian clock. Front Biosci, 8(8), s285-93.

Grill, H. J., & Norgren, R. (1978). The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. Brain research, 143(2), 263-279.

Grove, J. C., Gray, L. A., La Santa Medina, N., Sivakumar, N., Ahn, J. S., Corpuz, T. V., ... & Knight, Z. A. (2022). Dopamine subsystems that track internal states. *Nature*, *608*(7922), 374-380.

Hastings, M. H., & Herzog, E. D. (2004). Clock genes, oscillators, and cellular networks in the suprachiasmatic nuclei. Journal of biological rhythms, 19(5), 400-413.

Hattar, S., Kumar, M., Park, A., Tong, P., Tung, J., Yau, K. W., & Berson, D. M. (2006). Central projections of melanopsin-expressing retinal ganglion cells in the mouse. Journal of Comparative Neurology, 497(3), 326-349.

Heimer, L., Zahm, D. S., Churchill, L., Kalivas, P. W., & Wohltmann, C. (1991). Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience*, *41*(1), 89-125.

Heller, A. S., Johnstone, T., Shackman, A. J., Light, S. N., Peterson, M. J., Kolden, G. G., ... & Davidson, R. J. (2009). Reduced capacity to sustain positive emotion in major depression reflects diminished maintenance of fronto-striatal brain activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(52), 22445-22450.

Jeong, H., Taylor, A., Floeder, J. R., Lohmann, M., Mihalas, S., Wu, B., ... & Namboodiri, V. M. K. (2022). Mesolimbic dopamine release conveys causal associations. *Science*, *378*(6626), eabq6740.

Johnson RF, Moore RY, Morin LP. (1988). “Loss of entrainment and anatomical plasticity after lesions of the hamster retino hypothalamic tract”. Brain Res 460: 297–313.

Kalsbeek, A., Palm, I. F., La Fleur, S. E., Scheer, F. A. J. L., Perreau-Lenz, S., Ruiter, M., ... & Buijs, R. M. (2006). SCN outputs and the hypothalamic balance of life. Journal of biological rhythms, 21(6), 458-469.

Kelley, A. E. (2004). Ventral striatal control of appetitive motivation: role in ingestive behavior and reward-related learning. *Neuroscience & biobehavioral reviews*, *27*(8), 765-776.

Kelley, A. E., Baldo, B. A., Pratt, W. E., & Will, M. J. (2005). Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiology & behavior*, *86*(5), 773-795.

Kelly, P. H., Seviour, P. W., & Iversen, S. D. (1975). Amphetamine and apomorphine responses in the rat following 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens septi and corpus striatum. *Brain research*, *94*(3), 507-522.

Killeen, P. R., Posadas-Sanchez, D., Johansen, E. B., & Thrailkill, E. A. (2009). Progressive ratio schedules of reinforcement. Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes, 35(1), 35.

Ko, C. H., & Takahashi, J. S. (2006). Molecular components of the mammalian circadian clock. Human molecular genetics, 15(suppl_2), R271-R277.

Kramer, A., Yang, F. C., Snodgrass, P., Li, X., Scammell, T. E., Davis, F. C., & Weitz, C. J. (2001). Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling. Science, 294(5551), 2511-2515.

Kraves, S., & Weitz, C. J. (2006). A role for cardiotrophin-like cytokine in the circadian control of mammalian locomotor activity. Nature neuroscience, 9(2), 212-219.

Kuhnen, C. M., & Knutson, B. (2005). The neural basis of financial risk taking. *Neuron*, *47*(5), 763-770.

Lammel, S., Lim, B. K., Ran, C., Huang, K. W., Betley, M. J., Tye, K. M., ... & Malenka, R. C. (2012). Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature*, *491*(7423), 212-217.

Lehman, M. N., R. Silver, et al. (1987). "Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain." J Neurosci 7(6): 1626-1638.

Li, Y., Zhong, W., Wang, D., Feng, Q., Liu, Z., Zhou, J., ... & Luo, M. (2016). Serotonin neurons in the dorsal raphe nucleus encode reward signals. *Nature communications*, *7*(1), 10503.

Lowrey, P. L., & Takahashi, J. S. (2004). Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet., 5, 407-441.

Mazzone, C. M., Liang-Guallpa, J., Li, C., Wolcott, N. S., Boone, M. H., Southern, M., ... & Krashes, M. J. (2020). High-fat food biases hypothalamic and mesolimbic expression of consummatory drives. *Nature neuroscience*, *23*(10), 1253-1266.

Mieda, M., Williams, S. C., Richardson, J. A., Tanaka, K., & Yanagisawa, M. (2006). The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103(32), 12150-12155.

Mohawk, J. A., Green, C. B., & Takahashi, J. S. (2012). Central and peripheral circadian clocks in mammals. Annual review of neuroscience, 35, 445-462.

Moore, R. Y. and N. J. Lenn (1972). "A retinohypothalamic projection in the rat." J Comp Neurol 146(1): 1-14.

Moore, R. Y. and V. B. Eichler (1972). "Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat." Brain Res 42(1): 201-206.

Morales, M., & Margolis, E. B. (2017). Ventral tegmental area: cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, *18*(2), 73-85.

Mrosovsky, N. (1999). Masking: history, definitions, and measurement. Chronobiology international, 16(4), 415-429.

Muscat, R., & Willner, P. (1989). Effects of dopamine receptor antagonists on sucrose consumption and preference. Psychopharmacology, 99, 98-102.

Nestler, E. J., & Carlezon Jr, W. A. (2006). The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biological psychiatry*, *59*(12), 1151-1159.

Nieh, E. H., Vander Weele, C. M., Matthews, G. A., Presbrey, K. N., Wichmann, R., Leppla, C. A., ... & Tye, K. M. (2016). Inhibitory input from the lateral hypothalamus to the ventral tegmental area disinhibits dopamine neurons and promotes behavioral activation. *Neuron*, *90*(6), 1286-1298.

O'Donnell, P., Lavın, A., Enquist, L. W., Grace, A. A., & Card, J. P. (1997). Interconnected parallel circuits between rat nucleus accumbens and thalamus revealed by retrograde transynaptic transport of pseudorabies virus. *Journal of Neuroscience*, *17*(6), 2143-2167.

Olds, J. (1958). Self-stimulation of the brain: Its use to study local effects of hunger, sex, and drugs. *Science*, *127*(3294), 315-324.

Partch, C. L., Green, C. B., & Takahashi, J. S. (2014). Molecular architecture of the mammalian circadian clock. Trends in cell biology, 24(2), 90-99.

Pavlov, I. P. (1928). *Conditioned reflexes: An investigation of the physiological activity of the cerebral cortex*. Oxford University Press: Humphrey Milford.

Peciña, S., & Berridge, K. C. (2005). Hedonic hot spot in nucleus accumbens shell: where do μ-opioids cause increased hedonic impact of sweetness? Journal of neuroscience, 25(50), 11777-11786.

Peciña, S., Berridge, K. C., & Parker, L. A. (1997). Pimozide does not shift palatability: separation of anhedonia from sensorimotor suppression by taste reactivity. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *58*(3), 801-811.

Peciña, S., Cagniard, B., Berridge, K. C., Aldridge, J. W., & Zhuang, X. (2003). Hyperdopaminergic mutant mice have higher "wanting" but not "liking" for sweet rewards. *Journal of Neuroscience*, *23*(28), 9395-9402.

Pendergast, J. S., & Yamazaki, S. (2018). The mysterious food-entrainable oscillator: insights from mutant and engineered mouse models. Journal of biological rhythms, 33(5), 458-474.

Plano, S. A., Agostino, P. V., & Golombek, D. A. (2007). Extracellular nitric oxide signaling in the hamster biological clock. FEBS letters, 581(28), 5500-5504.

Reichenbach, A., Clarke, R. E., Stark, R., Lockie, S. H., Mequinion, M., Dempsey, H., ... & Andrews, Z. B. (2022). Metabolic sensing in AgRP neurons integrates homeostatic state with dopamine signalling in the striatum. *Elife*, *11*, e72668.

Richardson, N. R., & Roberts, D. C. (1996). Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. Journal of neuroscience methods, 66(1), 1-11.

Rijo-Ferreira, F., & Takahashi, J. S. (2019). Genomics of circadian rhythms in health and disease. Genome medicine, 11(1), 82.

Robbins, T. W., Cador, M., Taylor, J. R., & Everitt, B. J. (1989). Limbic-striatal interactions in reward-related processes. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *13*(2-3), 155-162.

Rossi, M. A., Basiri, M. L., Liu, Y., Hashikawa, Y., Hashikawa, K., Fenno, L. E., ... & Stuber, G. D. (2021). Transcriptional and functional divergence in lateral hypothalamic glutamate neurons projecting to the lateral habenula and ventral tegmental area. *Neuron*, *109*(23), 3823-3837.

Rossi, M. A., Basiri, M. L., McHenry, J. A., Kosyk, O., Otis, J. M., van den Munkhof, H. E., ... & Stuber, G. D. (2019). Obesity remodels activity and transcriptional state of a lateral hypothalamic brake on feeding. *Science*, *364*(6447), 1271-1274.

Salamone, J. D., & Correa, M. (2012). The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine. *Neuron*, *76*(3), 470-485.

Salamone, J. D., Correa, M., Farrar, A., & Mingote, S. M. (2007). Effort-related functions of nucleus accumbens dopamine and associated forebrain circuits. Psychopharmacology, 191, 461-482.

Salamone, J. D., Correa, M., Mingote, S., & Weber, S. M. (2003). Nucleus accumbens dopamine and the regulation of effort in food-seeking behavior: implications for studies of natural motivation, psychiatry, and drug abuse. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 305(1), 1-8.

Salamone, J. D., Pardo, M., Yohn, S. E., López-Cruz, L., SanMiguel, N., & Correa, M. (2016). Mesolimbic dopamine and the regulation of motivated behavior. *Behavioral neuroscience of motivation*, 231-257

Salgado, S., & Kaplitt, M. G. (2015). The nucleus accumbens: a comprehensive review. *Stereotactic and functional neurosurgery*, *93*(2), 75-93.

Sanders, A. C., Hussain, A. J., Hen, R., & Zhuang, X. (2007). Chronic blockade or constitutive deletion of the serotonin transporter reduces operant responding for food reward. *Neuropsychopharmacology*, *32*(11), 2321-2329.

Saunders, D. S. (2002). Insect clocks. Elsevier.

Schultz, W. (1998). Predictive reward signal of dopamine neurons. *Journal of neurophysiology*.

Sheffield, F. D. (1966). A drive-induction theory of reinforcement. *Current research in motivation*, 98-111.

Simpson, E. H., Kellendonk, C., Ward, R. D., Richards, V., Lipatova, O., Fairhurst, S., ... & Balsam, P. D. (2011). Pharmacologic rescue of motivational deficit in an animal model of the negative symptoms of schizophrenia. Biological psychiatry, 69(10), 928-935.

Stamatakis, A. M., Van Swieten, M., Basiri, M. L., Blair, G. A., Kantak, P., & Stuber, G. D. (2016). Lateral hypothalamic area glutamatergic neurons and their projections to the lateral habenula regulate feeding and reward. *Journal of Neuroscience*, *36*(2), 302-311.

Stephan, F. K. and I. Zucker (1972). "Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions." Proc Natl Acad Sci U S A 69(6): 1583-1586.

Stuber, G. D. (2023). Neurocircuits for motivation. *Science*, *382*(6669), 394-398.

Sujino, M., K. H. Masumoto, et al. (2003). "Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian behavioral rhythms of genetically arrhythmic mice." Curr Biol 13(8): 664-668.

Takahashi JS (2015). Molecular components of the circadian clock in mammals. Diabetes Obes Metab. 17 Suppl 1(0 1):6-11. doi: 10.1111/dom.12514.

Takahashi, J.S., et al. (2008). “The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease”. Nat Rev Genet. 9(10): p. 764-75

Takasu, N. N., Kurosawa, G., Tokuda, I. T., Mochizuki, A., Todo, T., & Nakamura, W. (2012). Circadian regulation of food-anticipatory activity in molecular clock–deficient mice. PLoS One, 7(11), e48892.

Tan, K. R., Yvon, C., Turiault, M., Mirzabekov, J. J., Doehner, J., Labouèbe, G., ... & Lüscher, C. (2012). GABA neurons of the VTA drive conditioned place aversion. *Neuron*, *73*(6), 1173-1183.

Van Zessen, R., Phillips, J. L., Budygin, E. A., & Stuber, G. D. (2012). Activation of VTA GABA neurons disrupts reward consumption. *Neuron*, *73*(6), 1184-1194.

Wise, R. A. (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nature reviews neuroscience*, *5*(6), 483-494.

Witten, I. B., Steinberg, E. E., Lee, S. Y., Davidson, T. J., Zalocusky, K. A., Brodsky, M., ... & Deisseroth, K. (2011). Recombinase-driver rat lines: tools, techniques, and optogenetic application to dopamine-mediated reinforcement. *Neuron*, *72*(5), 721-733.

Wright, C. I., & Groenewegen, H. J. (1996). Patterns of overlap and segregation between insular cortical, intermediodorsal thalamic and basal amygdaloid afferents in the nucleus accumbens of the rat. *Neuroscience*, *73*(2), 359-373.

Yagishita, S. (2020). Transient and sustained effects of dopamine and serotonin signaling in motivation-related behavior. *Psychiatry and clinical neurosciences*, *74*(2), 91-98.

Yan, L., & Okamura, H. (2002). Gradients in the circadian expression of Per1 and Per2 genes in the rat suprachiasmatic nucleus. European Journal of Neuroscience, 15(7), 1153-1162.

Yoo, S. H., S. Yamazaki, et al. (2004). "PERIOD2::LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues." Proc Natl Acad Sci U S A 101(15): 5339-5346.

Zaborszky, L., Alheid, G. F., Beinfeld, M. C., Eiden, L. E., Heimer, L., & Palkovits, M. (1985). Cholecystokinin innervation of the ventral striatum: a morphological and radioimmunological study. *Neuroscience*, *14*(2), 427-453.

Zahm, D. S., & Brog, J. S. (1992). On the significance of subterritories in the “accumbens” part of the rat ventral striatum. *Neuroscience*, *50*(4), 751-767.

Capítulo I

Modulación circadiana de la motivación por una recompensa de comida

I.1 Introducción

I.1.1 Modulación circadiana de comportamientos relacionados con la obtención de una recompensa

Existen evidencias previas e indicios de la regulación del sistema circadiano sobre el sistema de recompensa. La mayoría de las investigaciones circadianas sobre comportamientos motivados se enfocan en el análisis del consumo y la adicción a sustancias de abuso [revisado en DePoy et al., 2017; Webb, 2017; Freyberg & Logan, 2018; Becker-Krail et al., 2022]. Estas sustancias tienen como blanco de acción los circuitos neuronales de la recompensa, y actúan como ligandos naturales estimulando el sistema dopaminérgico (entre muchos otros efectos) afectando así las conductas motivadas en distintos niveles. A pesar de que todavía queda mucho por descubrir, las investigaciones en esta área nos han llevado a conocer buena parte de cómo funciona el sistema de recompensa y la importancia de su regulación circadiana. Sin embargo, es interesante notar que muchas drogas de abuso modifican los patrones de expresión de los genes reloj presentes en áreas cerebrales del circuito de recompensa [Webb et al., 2015], alterando no sólo la neuroquímica sino también el reloj circadiano a nivel molecular. Adicionalmente, en contextos neuropatológicos en donde los problemas emocionales y la anhedonia forman parte de la sintomatología, en general, el sistema en su conjunto suele estar desregulado y suele existir comorbilidad con trastornos en los patrones de sueño y la alteración de los ritmos circadianos. Esta complejidad añadida complica el entendimiento de la vinculación entre los sistemas y la relación de causalidad. Es por ello que, para comprender cómo se ve afectado el sistema en el contexto del consumo de drogas o de enfermedades neuropsiquiátricas, es primero necesario entender cómo funciona esta regulación en presencia de recompensas naturales y bajo condiciones no patológicas.

En relación a la influencia circadiana en la motivación y los comportamientos relacionados con la obtención de recompensas naturales, la literatura existente es un poco más limitada. Por ejemplo, Webb y colaboradores (2009) mostraron que tanto el rendimiento sexual como el comportamiento de apareamiento presentan una variación rítmica a lo largo del día en ratas, con un máximo para la recompensa sexual durante la porción nocturna del ciclo de luz/oscuridad. Por otro lado, se reportó un ritmo diario y circadiano en el consumo de sacarosa en ratones, con mayores valores de ingesta durante la fase nocturna del ciclo LD. Además, se demostró que estos

ritmos se abolían en los ratones arrítmicos con una mutación en el gen reloj *per2* [Bainier et al., 2017], lo que sugiere que los ritmos asociados al componente hedónico de la ingesta de alimentos podrían estar bajo el control de la maquinaria molecular circadiana. Adicionalmente, se ha demostrado que el receptor nuclear REV-ERBα (un represor transcripcional y uno de los componentes claves del mecanismo molecular del reloj circadiano, como se mencionó en la Introducción General) es importante en la modulación de la actividad de las neuronas orexinérgicas (ORX) del hipotálamo lateral [Feillet et al., 2017]. Estas neuronas regulan el metabolismo, la alimentación y la recompensa, por lo tanto, forman parte del circuito de control de los componentes de la alimentación tanto homeostáticos como hedónicos. Asimismo, se sabe que la actividad de las ORX está regulada circadianamente a través de vías dependientes de los NSQ. En este trabajo, los autores muestran que REV-ERBα actúa como un posible inhibidor de la transcripción de la proteína ORX en el hipotálamo, atenuando la activación de las neuronas orexinérgicas y, en consecuencia, afectando la ingesta y la preferencia de los ratones por comidas con alto valor hedónico. En línea con estos hallazgos, existen varios trabajos que han sugerido un rol importante para *Rev-erbα* como mediador en la regulación circadiana del metabolismo, y en los patrones diarios en la ingesta de comida y la actividad locomotora [Vieira & Quesada, 2015; Sen et al., 2018].

I.1.2 Expresión de genes reloj en áreas cortico-límbicas

Los ritmos circadianos que se han reportado en los distintos comportamientos asociados a la obtención de recompensas podrían tener una explicación a nivel molecular, dada la presencia de genes reloj dentro de las áreas involucradas en el sistema de recompensa. En este sentido, se ha reportado la expresión de muchos de los genes circadianos principales en áreas cortico-límbicas del cerebro, y en algunos casos se ha evidenciado su expresión rítmica, tanto génica como proteica, en estos tejidos. Un ejemplo de ello es la oscilación de las proteínas reloj PER1 y PER2 en regiones cerebrales involucradas en el circuito de la recompensa tales como el núcleo accumbens, el núcleo del lecho de la estría terminal, la amígdala, el hipocampo y la corteza prefrontal [Webb et al., 2009; Amir et al., 2004; Lamont et al., 2005; Verwey et al., 2007; Feillet et al., 2008]. Además, en el NAc también se ha documentado la presencia y la oscilación de la

proteína reloj BMAL1 [Webb et al., 2009]. Por otro lado, en el área tegmental ventral (VTA, la región principal que envía la información dopaminérgica al NAc para regular los comportamientos motivados) se observó la expresión de BMAL1 y PER1, pero su expresión parece ser constitutiva en esta región [Abe et al., 2002; Webb et al., 2009]. Sin embargo, otro trabajo ha evidenciado un ritmo diario en la actividad eléctrica de las neuronas de VTA, sugiriendo que esta actividad rítmica podría estar regulada por proyecciones indirectas desde los NSQ [Luo & Aston-Jones, 2009]. Dadas estas evidencias, es posible hipotetizar que la ritmicidad observada en los comportamientos asociados a la obtención de una recompensa sean mediados, al menos en parte, por las oscilaciones locales de los genes reloj presentes el NAc o por oscilaciones a nivel del control dopaminérgico que llega al NAc desde VTA.

Por otro lado, existen estudios realizados en ratones con mutaciones en los genes reloj que sugieren y refuerzan la idea de la participación de componentes circadianos en la modulación de las respuestas conductuales a las recompensas. Por ejemplo, los ratones mutantes para los genes reloj *per1* y *per2* presentaron respuestas opuestas cuando se usan drogas como recompensa. El primero (per1) mostró una falta completa de respuesta motivada por la cocaína, mientras que el segundo (per2), evidenció una respuesta hipersensibilizada a la cocaína [Abarca et al., 2002] y un aumento en el consumo de alcohol [Spanagel et al., 2005]. Hasta donde sabemos, estos ratones mutantes (y otros mutantes de genes reloj) no han sido evaluados con recompensas naturales como la comida. Dadas las diferencias que las recompensas naturales y no naturales pueden producir en el funcionamiento neuronal del circuito de recompensa, sería interesante abordar este interrogante en el futuro. Además, este tipo de ratones *knockout* son mutantes completos (es decir, el gen reloj se encuentra mutado en todo el organismo), lo que dificulta la interpretación de los resultados. En este sentido, llevar a cabo mutaciones dirigidas de genes del reloj en regiones específicas del cerebro relevantes para el procesamiento de la recompensa (por ejemplo, en NAc y VTA) podría ser de gran importancia para dilucidar el papel de las oscilaciones circadianas locales en las respuestas conductuales motivadas.

I.1.3 Modulación circadiana de la señalización dopaminérgica en los circuitos neuronales de la recompensa

La literatura actual respalda la idea de que la expresión rítmica de genes reloj dentro de las áreas cortico-límbicas del cerebro podría ser la responsable de las variaciones diurnas que se observan en la motivación por recompensas naturales y no naturales. Aunque aún no se han descifrado completamente los mecanismos moleculares subyacentes a esta hipótesis, el sistema dopaminérgico emerge como un candidato altamente prometedor para actuar como intermediario entre las oscilaciones locales de los genes del reloj, la actividad neuronal rítmica y las variaciones diarias en las conductas motivadas.

Durante décadas, el estudio de la regulación circadiana en el sistema dopaminérgico ha sido de gran interés para la comunidad científica, debido principalmente a la importante implicación de la neurotransmisión dopaminérgica en diversas afecciones humanas. Se sabe que los componentes del reloj molecular circadiano actúan como factores de transcripción promoviendo la expresión rítmica de una gran cantidad de genes, entre ellos, aquellos que codifican diversos componentes del sistema dopaminérgico. Específicamente, como vimos en la Introducción General, las proteínas producto de los genes reloj se unen a sitios *E-boxes* y elementos RORE en las regiones promotoras del DNA de genes controlados por el reloj. Este tipo de secuencias reguladoras han sido identificadas en genes involucrados en el metabolismo, la síntesis y la recaptación de dopamina (DA), y en receptores dopaminérgicos, lo que sugiere que la expresión de estos componentes está bajo regulación circadiana. Así, se ha reportado la expresión rítmica de la monoamino oxidasa A (MAO-A) [Hampp & Albrecht, 2008] y la tirosina hidroxilasa (TH) [Yoon & Chikaraishi, 1992], ambas enzimas claves en la síntesis y degradación de la DA. Adicionalmente, el transportador de dopamina (DAT) [Kawarai et al., 1997], necesario para la recaptación de DA en la hendidura sináptica, y el receptor de dopamina tipo 3 (D3) [Ozburn et al., 2015], encargado de mediar la señalización dopaminérgica, presentan también una expresión cíclica (**Figura I.1.1**). Además, los niveles de DA muestran oscilaciones de 24 horas en el estriado de ratones [Hood et al., 2010; Bussi et al., 2014]. En ratas con lesiones en los NSQ, se observó que los ritmos de DAT son abolidos en la corteza prefrontal medial (mPFC) y atenuados en el NAc [Sleipness et al., 2007]. En conclusión, todos estos estudios sugieren una regulación circadiana a

nivel de varios componentes del sistema dopaminérgico. Esto podría generar un control rítmico en la síntesis del neurotransmisor en las neuronas provenientes de VTA, así como también, un control circadiano a nivel de la señalización dopaminérgica en regiones *target* como el NAc.

Figura I.1.1. Regulación circadiana del metabolismo dopaminérgico. El sistema circadiano regula los ritmos diarios de diversos componentes relacionados con la neurotransmisión dopaminérgica. En el esquema se muestra una neurona presináptica dopaminérgica de VTA que proyecta y señaliza a las regiones del estriado ventral, como el NAc. Las proteínas reloj circadianas actúan como factores de transcripción uniéndose a los sitios *E-box* y RORE en las regiones promotoras de genes *target*. Algunos ejemplos implican la síntesis rítmica de DA por la enzima TH, la liberación rítmica de DA (bajo el control de los autorreceptores D2), y la degradación rítmica de DA mediada por la enzima MAO. Esta regulación circadiana también afecta a la neurona postsináptica. Por ejemplo, se han descriptos ritmos diarios en la expresión del transportador DAT en el estriado y en el contenido total de DA. Abreviaturas: COMT, catecol-O-metiltransferasa; D1R, receptor de dopamina tipo 1; D2R, receptor de dopamina tipo 2; D3, receptor de dopamina tipo 3; DA, dopamina; DAT, transportador de dopamina; DDC, DOPA descarboxilasa; DOPAC, ácido 3,4-dihidroxifenilacético; HVA, ácido homovanílico; MAO, monoaminooxidasa; ROR, receptor relacionado con los retinoides; RORE, elemento de respuesta ROR; TH, tirosina hidroxilasa; TYR, tirosina; VTA, área tegmental ventral; NAc, núcleo accumbens. Imagen adaptada de [Agostino, Acosta & Meck, 2017].

Es importante hacer una breve mención de los hallazgos que se han reportado sobre el control circadiano en otros sistemas de neurotransmisores y péptidos que también están implicados en el circuito de procesamiento de la recompensa. La liberación de serotonina

también se ha reportado como rítmica en roedores nocturnos, con una mayor liberación durante la fase de actividad [Dudley et al., 1998]. Asimismo, y al igual que la DA, diferentes componentes del metabolismo y la señalización serotoninérgica presentan ritmos de expresión diarios en regiones cerebrales del mesencéfalo [Ushijima et al., 2012] y la corteza prefrontal [Nakayama, 2002]. Por otro lado, estudios muy recientes sobre el sistema de péptidos opioides sugerirían una vinculación entre este sistema y el circadiano, modulando la expresión rítmica del proteoma en el NAc de ratones mediante los receptores de opioides presentes en dicha región [Ketchesin et al., 2023]. Sin embargo, esta relación sigue siendo, en gran medida, inexplorada en la actualidad.

I.1.4 Vías de señalización indirectas desde los NSQ hacia el sistema de recompensa

Como se ha expuesto en la introducción general de esta tesis, los NSQ coordinan a otros osciladores secundarios dentro del sistema nervioso central, así como también a osciladores periféricos en el resto del cuerpo, a través de salidas neuronales y humorales. En la actualidad, no se han reportado vías neuronales directas desde los NSQ hacia VTA o el NAc que puedan transmitir directamente la información de la regulación temporal a estas áreas tan importantes dentro del sistema de recompensa. Sin embargo, en la literatura existen evidencias sobre posibles conexiones indirectas (**Figura I.1.2**).

Se ha reportado un circuito de salida desde los NSQ hacia el área preóptica medial (mPOA) [Luo et al., 2009] y el núcleo hipotalámico dorsomedial (DMH) [Aston-Jones et al, 2009], ambas regiones situadas en el hipotálamo que, a su vez, proyectan hacia VTA modulando indirectamente la activación rítmica de estas neuronas. Por ejemplo, dentro del DMH, las neuronas orexinérgicas codifican información sobre los ritmos de reposo- actividad, el balance energético y la motivación, enviando esta información hacia VTA.

Por otro lado, los núcleos dorsales del rafe (DRN) en el mesencéfalo (la región principal donde se sintetiza la serotonina) reciben información de la entrada de luz ambiental de forma directa a través del tracto-retino hipotalámico e indirectamente desde los NSQ [Morin 2013].

Figura I.1.2. Circuitos cerebrales principales involucrados en la modulación circadiana de la motivación por la recompensa. El NAc recibe entradas glutamatérgicas del PFC, la AMG y el hipocampo, y proporciona entradas GABAérgicas hacia VTA, así como hacia el GP. VTA también envía aferencias al PFC. Una vía de salida indirecta conectaría a los NSQ con las áreas del sistema de recompensa, pudiendo estar involucrad en la regulación circadiana de los comportamientos motivados. Los NSQ proyectan de manera directa al mPOA, LBh y DHM y, a su vez, estas estructuras proyectan hacia VTA. Además, las neuronas en el DRN reciben información de la luz ambiental a través del sistema visual circadiano y envían aferentes serotoninérgicos a VTA. En las regiones donde se muestra un símbolo de una oscilación, es en las que existen evidencias de la presencia de ritmos a nivel de su actividad, o en la expresión de distintos componentes de su señalización o que presentan expresión de genes y proteínas reloj que oscilan dentro de estas estructuras. Las líneas de color indican diferentes señalizaciones de neurotransmisores. Abreviaturas: AMG, amígdala; CPu, caudado-putamen; DMH: hipotálamo dorsomedial; DRN, núcleos dorsales del raphe; GABA, ácido gamma-aminobutírico; GP, globo pálido; Hip, hipocampo; LHb, habénula lateral; mPOA, área preóptica medial; PFC, corteza prefrontal; NAc, núcleo accumbens; NSQ, núcleos supraquiasmáticos; VTA, área tegmental ventral. Modificado de [Acosta, Golombek & Agostino, 2020].

Asimismo, las neuronas del DRN proyectan hacia VTA modulando la actividad dopaminérgica [Wang et al., 2019]. En este último trabajo, se demuestra también que la activación de las eferencias neuronales desde DRN hacia VTA evoca la liberación de dopamina en el NAc promoviendo las conductas vinculadas a la obtención de recompensas.

Finalmente, la habénula lateral (LHb) en el mesencéfalo, también recibe una entrada directa desde los NSQ y, a su vez, actúa como un importante inhibidor de la actividad dopaminérgica en VTA, ejerciendo así un control adicional sobre la regulación de las emociones y la recompensa [Parekh et al., 2016]. De hecho, se ha demostrado que la LHb es un oscilador circadiano *per se*, es decir, es capaz de generar oscilaciones autosostenidas con independencia de los NSQ [Guilding et al., 2010]. En este sentido, y debido a las proyecciones directas de la LHb hacia VTA, es posible que el reloj de la LHb module la activación neuronal rítmica observada en las neuronas de VTA [revisado en Mendoza, 2017]. Además, la LHb inerva a los núcleos del rafe regulando posiblemente la liberación rítmica de serotonina en regiones del cerebro relacionadas con el circuito de recompensa.

Por último, se ha descripto recientemente una nueva vía neuronal que lleva información lumínica del ambiente de forma directa hacia regiones del sistema de recompensa [Fernández et al., 2018]. Esta vía utiliza una subpoblación de células ganglionares de la retina (que no es la misma que conecta con los NSQ, dado que esta vía elude al reloj central), llevando información de las condiciones de iluminación hacia una región conocida como el núcleo perihabenular (PHb). A su vez, el PHb tiene conexiones directas con los circuitos reguladores de las emociones y los comportamientos motivados, tales como la corteza prefrontal, y el estriado dorsal y ventral (incluido el NAc). La importancia de este nuevo circuito radica en experimentos que sugieren que es responsable de mediar los efectos adversos de la luz sobre el sistema de recompensa. Específicamente, la exposición a la luz en momentos inadecuados del ciclo de sueño-vigilia (por ejemplo, luz durante la noche) provoca alteraciones en las emociones, así como en las conductas hedónicas y motivadas [Walker et al., 2020].

I.2 Objetivos

Objetivo general

El objetivo general del presente capítulo fue determinar si la motivación por una recompensa de comida en ratones se encuentra sujeta al control del sistema circadiano.

Objetivos específicos

1. Evaluar si la motivación por una recompensa de comida presenta un ritmo diario en condiciones normales de luz/oscuridad.

2. Determinar si la motivación por una recompensa de comida presenta una variación (endógena) en condiciones de oscuridad constante, condición en la cual los ritmos circadianos expresan su período en libre curso.

3. Determinar si las variaciones diarias y endógenas en la motivación por una recompensa de comida se ven afectadas en el envejecimiento.

4. Evidenciar si el componente hedónico, que guía parte de la conducta de motivación por obtener una recompensa de comida, presenta una variación diaria y que, a su vez, se mantiene en el envejecimiento.

I.3 Materiales y Métodos

I.3.1 Animales y condiciones de alojamiento

Para todos los experimentos del siguiente capítulo se utilizaron ratones macho de la cepa C57BL/6J adquiridos de proveedores comerciales (provenientes de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Buenos Aires) y mantenidos en el Bioterio de la Universidad Nacional de Quilmes. Para los experimentos se utilizaron animales jóvenes adultos (3-4 meses de edad) y adultos viejos (más de 18 meses de edad). Los ratones fueron mantenidos bajo un fotoperiodo de 12 horas de luz seguido de 12 horas de oscuridad (denominado ciclo LD 12:12, del inglés *light-dark* 12:12) con el encendido de las luces a las 8 AM y el apagado a las 8 PM. Las condiciones de la temperatura ambiental se mantuvieron constantes (20 ± 2 °C) y los animales tuvieron libre acceso a agua y comida (alimento balanceado comercial), salvo durante determinados protocolos comportamentales (especificado en cada experimento) en los que el acceso a la comida fue restringido con el fin de mantener a los animales en un 85% de su peso original. En estos casos, la restricción fue calórica, es decir, se limitó la ingesta de calorías diarias (cantidad de comida) de los animales a fin de que los mismos reduzcan su peso hasta alcanzar un nuevo valor de peso que sea 15% inferior al determinado en condiciones de *ad libitum.* Una vez alcanzado este peso, la cantidad de comida diaria otorgada a los animales se mantuvo fija a fin de mantener dicho nuevo pesaje. Una vez finalizado el protocolo comportamental que ameritó la restricción calórica, los animales fueron alimentados nuevamente *ad libitum*.

En los casos en que los animales debieron ser manipulados en la oscuridad (cambio de lecho, peso de los mismos, estudios conductuales, etc.), se utilizó una luz roja (de intensidad < 5 lux) a fin de no afectar sus ritmos circadianos.

Los procedimientos y protocolos utilizados en esta tesis se ajustan estrictamente a las recomendaciones establecidas en las guías para cuidado y mantenimiento de animales de laboratorio emitidas por el Instituto Nacional de Salud de USA (NIH) y han sido aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAL) de la Universidad Nacional de Quilmes. El uso de modelos animales fue necesario debido a que las variables conductuales y fisiológicas que se estudiaron no pueden obtenerse in vitro. Por otra parte, el protocolo utilizado fue diseñado de manera tal de minimizar el número de animales involucrados en cada experimento.

I.3.2 Registro de actividad locomotora

Al inicio de los experimentos, los animales fueron alojados en jaulas individuales de plexiglás equipadas con sensores infrarrojos (ubicados en la parte superior de la jaula) para detectar la actividad locomotora de cada animal. La actividad locomotora fue registrada mediante el sistema de adquisición de datos Archron versión 2.1, diseñado en el laboratorio de Cronobiología de la Universidad Nacional de Quilmes. El recuento total de actividad para cada ratón se cuantificó como el número total de interrupciones del haz de sensor infrarrojo y se almacenó en intervalos de 5 minutos para su posterior análisis.

I.3.3 Protocolo de motivación hacia una recompensa

I.3.3.1 Equipo de entrenamiento

El equipo de entrenamiento y registro de la motivación hacia una recompensa consistió en cuatro jaulas de testeo modulares diseñadas específicamente para ratones (modelo ENV-307A; Med Associates, St. Albans, VT, USA) alojadas cada una dentro de cubículos atenuadores de sonido (modelo ENV-021M; Med Associates). Las dimensiones de cada jaula son 21.59 cm x 17.78 cm x 12.70 cm. El techo, las paredes laterales y la puerta frontal de cada jaula están hechos de Plexiglás transparente. La pared frontal y la pared posterior están formadas por paneles de acero inoxidable, y el piso está hecho de barras paralelas de acero inoxidable. Sobre la pared frontal de cada una de las jaulas se encuentran dos palancas ultrasensibles a las presiones (requieren sólo 2 gramos de fuerza para generar una respuesta) y retráctiles. Una de las palancas se encuentra ubicada del lado derecho y la otra del lado izquierdo de la pared, y ambas están ubicadas a 2,2 cm del suelo. Entre ambas palancas, se localiza un comedero en donde se depositan las recompensas por medio de un sistema dispensador de pellets. La recompensa consiste en un pellet de comida a base de granos de 20 mg (Bio-Serv, Frenchtown, NJ, USA) o pellets de chocolate de 20 mg, dependiendo del experimento. En la parte superior de la pared posterior se sitúa una luz blanca (14-W, 100 mA) dirigida hacia el techo de la jaula. En todos los experimentos aquí mencionados, esta luz se mantuvo apagada durante toda la sesión. El

ventilador, ubicado dentro de los cubículos atenuadores de sonido, se mantuvo encendido durante todas las sesiones.

Las jaulas están controladas por el paquete de Software Med-PC® IV (Med Associates). Este software permite al operador modificar los valores de diversos parámetros durante el experimento (tales como encendido y apago de la luz, extensión o retraimiento de una palanca, control de la ventilación, etc.) así como también, elegir el tipo de protocolo de entrenamiento que se quiere utilizar. El manejo y control del equipo experimental y el registro de los datos comportamentales se realizaron por medio de una PC compatible que se encontraba conectada a una interfase electrónica (modelo DIG-700 y SG-215; Med Associates). El tiempo de cada presión de palanca se registró con una precisión de 10 ms y se colocó en intervalos de tiempo de 1 s.

Las jaulas de entrenamiento están ubicadas en un cuarto aislado, provisto de un generador de ruido constante para atenuar los sonidos externos que pudieran influir en el experimento comportamental. Durante los experimentos realizados en la fase diurna, la luz del cuarto de entrenamiento se mantuvo encendida durante toda la sesión. Para los experimentos realizados en la fase nocturna, la luz del cuarto se mantuvo apagada y una luz roja tenue (< 5 lux) se utilizó al momento de colocar o retirar a los ratones de las jaulas de entrenamiento.

Las jaulas fueron higienizadas cuidadosamente luego de cada sesión de entrenamiento primero con una solución de agua y detergente para eliminar todo rastro de olor, y luego desinfectadas con una solución de alcohol y agua al 70%.

I.3.3.2 Procedimiento

Se utilizó el protocolo de motivación hacia una recompensa conocido como entrenamiento de **tasa progresiva** (**PR**, por sus siglas en inglés *Progressive Ratio training*) descripto ampliamente en la literatura [Richardson and Roberts, 1996; Drew et al., 2007]. Este protocolo permite evaluar el esfuerzo que un ratón está dispuesto a realizar (al hacer presiones de palanca) para obtener una recompensa, en este caso, un *pellet* de comida.

El protocolo consiste en entrenar y evaluar a los animales en dos fases consecutivas:

1) **Entrenamiento de Condicionamiento Operante (CO):** durante esta fase, los ratones aprenden a asociar las presiones de la palanca con la obtención de un pellet de comida como recompensa. En todos los casos, los animales recibieron una sesión diaria de CO por tres días consecutivos. Durante la sesión de CO, se extiende una sola palanca, izquierda o derecha, que es equilibrada entre los sujetos en cada condición experimental. Cada presión de palanca resulta en la entrega de un único pellet de alimento depositado en el comedero de la jaula. La sesión de CO finaliza después de que el ratón recibió 60 pellets o después de que transcurrieron 60 minutos, lo que ocurra primero. Sólo los animales que aprendieron efectivamente esta asociación de palanca-recompensa son los que fueron entrenados en la siguiente fase (PR). Es decir, aquellos animales que no realizaron 60 presiones de palanca, al menos en la última sesión de CO, fueron descartados del entrenamiento y del experimento.

2) **Entrenamiento de tasa progresiva (*PR training*):** luego del entrenamiento de CO, los ratones recibieron una sesión diaria de entrenamiento PR durante dos días consecutivos. En este protocolo, cuando inicia la sesión, la palanca se encuentra extendida y sólo luego de que el ratón haya hecho un determinado número de presiones de la misma se le otorga la recompensa (un único pellet de comida de 20 mg). El número de presiones de palanca necesarias para obtener la recompensa en cada prueba (*trial*) dentro de una sesión de PR se deriva de la siguiente ecuación [Richardson & Roberts, 1996]:

$$P = [5 \times e^{(i \times 0,2)}] - 5$$

donde **P** es el número requerido de presiones de palanca (redondeado al número entero más cercano) e **i** se refiere al número de prueba (*trial*). Esta ecuación da como resultado la siguiente serie aritmética: 1, 2, 4, 9, 12, 15, 20, 25, 32, 40, 50, 62, 77, 95, 118, 145,178, 219, 268, 328, 402, 492, 603, 737, 901, 1102, 1347, 1647, 2012, etc. Por lo tanto, el umbral se establece en una presión de palanca para obtener la recompensa de comida en la primera prueba, dos presiones de palanca para la segunda prueba, cuatro presiones de palanca para la tercera prueba, nueve presiones de palanca para

la cuarta prueba, y así sucesivamente. La sesión de PR tiene una duración total de 120 minutos.

Los animales que fueron entrenados en condiciones de oscuridad fueron transportados al cuarto de entrenamiento en sus jaulas individuales envueltas en una tela de tipo *blackout* negra que no permite el paso de la luz externa.

A todos los animales se les permitió habituarse a las jaulas de entrenamiento durante 5 minutos antes de dar inicio a la sesión. Una vez finalizado el entrenamiento, los animales fueron devueltos inmediatamente a sus jaulas individuales, transportados a su cuarto de alojamiento, y se les dio acceso a su alimento balanceado diario (en la cantidad apropiada para mantener la restricción calórica necesaria durante el entrenamiento, para el caso que aplique).

Los animales fueron pesados antes de cada sesión de entrenamiento, ya sea de CO o de PR.

I.3.3.3 Procesamiento de los datos y análisis de los resultados de motivación

Los criterios de procesamiento de los datos obtenidos en el test comportamental fueron establecidos previamente y se aplicaron por igual a todos los grupos experimentales. En primer lugar, los datos analizados (y, en consecuencia, los resultados que se mostrarán en las figuras en la sección de resultados) corresponden a la segunda sesión de entrenamiento de PR. Es decir, la primera sesión de PR es considerada como parte del entrenamiento, mientras que la segunda es considerada la sesión de testeo. En segundo lugar, aquellos animales que realizaron menos de 10 presiones totales en la sesión de testeo fueron descartados del análisis. Por último, se llevó a cabo un chequeo del intervalo de tiempo entre presiones (IRT, por i*nter-response time*) para cada ratón, con el fin de detectar si había intervalos prolongados (10 minutos o más) de inactividad por parte del animal durante la sesión de testeo. En el caso que los hubiera, todas las presiones realizadas por el animal posterior al IRT ≥ 10 min fueron descartadas, y se consideró como última presión aquella realizada inmediatamente antes de dicho intervalo de inactividad. Este criterio se aplicó teniendo en cuenta la literatura previa [Drew et al., 2007] en donde se considera que luego de un IRT ≥ 10 min el animal deja de estar motivado por obtener la recompensa.

Los resultados obtenidos del test comportamental fueron analizados mediante dos métodos:

1) **Análisis de los niveles motivacionales:** la motivación de cada ratón se midió registrando el número total de presiones de palanca realizadas, el número total de recompensas obtenidas, y el *breaking point* (cuya traducción al castellano sería el "punto de quiebre") obtenidos al finalizar la sesión de testeo. El *breaking point* se define como la última prueba (*trial*) de la serie aritmética (descripta anteriormente) que el animal llegó a completar satisfactoriamente, obteniendo así la recompensa [Drew et al., 2007]. Para ilustrarlo de manera sencilla: si el ratón debía realizar 200 presiones de palanca para obtener la recompensa en el *trial* número 10 de la serie, pero sólo logró realizar 150 presiones antes de que se agotara el tiempo de la sesión, el *breaking point* registrado para dicho animal sería el número 9. En conjunto, los tres parámetros de análisis (N° de presiones, N° de recompensas y *breaking point*) permiten establecer el nivel motivacional del ratón, dado que reflejan el máximo esfuerzo que el animal está dispuesto a hacer para obtener un pellet de comida.

2) **Análisis de la dinámica de la respuesta:** se analizó cómo fue la respuesta del ratón a lo largo de los 120 minutos de duración de la sesión de motivación. Es decir, se tiene en cuenta al tiempo como variable en el análisis, dado que la forma de la distribución de la respuesta (presiones de palanca) de los animales puede variar a medida que transcurre el tiempo en la sesión de PR. Para este análisis, se graficó la distribución de la frecuencia promedio de las presiones de palanca a lo largo del tiempo de la sesión para todos los ratones dentro de un mismo grupo experimental. Estos gráficos dan una idea cualitativa de la forma que toma de la respuesta a lo largo del tiempo. La cuantificación de dicha distribución, se realizó mediante el cálculo del área bajo la curva para los datos divididos en tres intervalos de tiempo: 0 a 40 minutos (bloque 1), 40 a 80 minutos (bloque 2), y 80 a 120 minutos (bloque 3). Esta división permite evidenciar y comparar cambios en la magnitud (mayor o menor frecuencia) de la respuesta entre el inicio, la mitad y el final de la sesión. Por último, en el análisis de la

dinámica se incluyeron también las curvas de persistencia de los animales en la tarea comportamental a lo largo del tiempo de la sesión. Se realizaron mediante las conocidas "curvas de supervivencia", pero en este caso, cada punto sobre la curva representa la última presión de palanca que realizó un ratón antes de abandonar la tarea, es decir, de dejar de estar motivado por obtener la recompensa de comida. De esta forma, se compara cómo es la "caída" de la curva entre los distintos grupos de un experimento.

I.3.4. Grupos y condiciones experimentales

Se evaluó la motivación por una recompensa de comida mediante el protocolo de PR en ratones de diferentes edades: jóvenes (3-4 meses) y viejos (más de 18 meses), que se encontraban bajo dos ciclos ambientales distintos: uno de luz/oscuridad de 12:12 horas (LD) y otro de oscuridad constante (denominado DD, del inglés *dark-dark*). El testeo comportamental se realizó en dos o más puntos horarios de un ciclo. Asimismo, según el experimento, se utilizaron dos tipos de condiciones de alimentación y dos tipos de recompensas: restricción calórica previa con un *pellet* (20 mg) de comida regular como recompensa, o alimentación *ad libitum* con un *pellet* (20 mg) de chocolate como recompensa.

Bajo condiciones de LD, se utilizó como referencia la hora de apagado de las luces, denominada por convención como hora del sincronizador o *zeitgeber* 12 (es decir, ZT12). En consecuencia, ZT0 corresponde el horario de encendido de las luces. En condiciones de oscuridad constante (DD), el horario de referencia fue el del comienzo de la actividad locomotora de cada uno de los animales, llamado convencionalmente hora circadiana (*Circadian Time*) 12 (CT12). Consecuentemente, el CT0 indica el cese de la actividad locomotora y el inicio del reposo.

Para los experimentos en los que se llevó a cabo la restricción calórica, los animales recibieron una cantidad reducida de alimento durante los 7 días previos al inicio de la evaluación comportamental y durante los 5 días de entrenamiento en el protocolo de PR, con el fin de mantenerlos en un 85% de su peso normal con alimentación *ad libitum*. El objetivo de esta restricción fue que los ratones estuvieran dispuestos a trabajar (presionar la palanca) para obtener como recompensa un *pellet* de comida regular durante la prueba comportamental. En

todos los casos, la comida diaria se proporcionó después de las sesiones de entrenamiento y de testeo. Para los experimentos sin restricción calórica, los animales fueron alimentados *ad libitum* antes y durante el entrenamiento de PR. Durante el test comportamental, recibieron un *pellet* de chocolate como recompensa por presionar la palanca.

Se testearon diferentes cohortes de ratones en cada experimento, en cada condición, y en cada punto horario dentro de una misma condición, con el objetivo de minimizar los efectos de la exposición múltiple al entrenamiento de PR y evitar que los animales desarrollen un comportamiento de habituación al presionar las palancas de las jaulas comportamentales [Rossi & Yin, 2012].

En los siguientes párrafos se describirán, con mayor detalle, los grupos y las condiciones experimentales utilizadas.

Experimento 1:

En primer lugar, a modo de evidenciar si la motivación por una recompensa presentaba un ritmo diario bajo condiciones normales de iluminación, se evaluó en el protocolo de PR a ratones jóvenes que se encontraban bajo un ciclo LD 12:12 en distintos puntos horarios del día y de la noche. Los puntos horarios (o ZTs) elegidos para el testeo fueron:

- Fase diurna (día): ZT2, ZT4 y ZT6.
- Fase nocturna (noche): ZT14, ZT16 y ZT18.

En este sentido, por ejemplo, para los ratones evaluados a ZT2, el testeo de la motivación comenzó dos horas (ZT2) luego del encendido de las luces (que es en ZT0) y finalizó dos horas más tarde (lo que correspondería a ZT4), dado que la duración del test comportamental es de 120 minutos. En esta tesis, por cuestiones de simplificación, se indicarán los horarios de testeo solo mediante el ZT de inicio de la prueba. No obstante, es importante tener en cuenta que la evaluación comportamental se extiende por un periodo de dos horas. Para una expresión más precisa, se deberían considerar los siguientes rangos horarios de evaluación: ZT2-4, ZT4-6, ZT6-8, ZT14-16, ZT16-18 y ZT18-20.

El tamaño muestral utilizado en este experimento fue de N=9 para ZT2, N=12 para ZT4, N=9 para ZT6, N=11 para ZT14, N=11 para ZT16, y N=9 para ZT18.

Para este experimento, todos los ratones fueron sometidos a una restricción calórica con el fin de que estuvieran dispuestos a presionar la palanca para obtener la recompensa.

Para los experimentos que siguen a continuación, se evaluó la motivación en un solo punto horario por fase del ciclo (día/noche) con el objetivo de minimizar el número de animales a utilizar.

Experimento 2:

A modo de evidenciar la naturaleza endógena de la variación en el comportamiento de motivación y, a su vez, de evaluar si esta variación se veía afectada por el envejecimiento, se evaluó la motivación por una recompensa de comida en los siguientes grupos:

- Ratones jóvenes:
    a) bajo un ciclo LD 12:12.
    b) bajo condiciones de oscuridad constante (DD).
- Ratones viejos:
    c) bajo un ciclo LD 12:12.
    d) bajo condiciones de oscuridad constante (DD).

Para todos los grupos de ratones bajo un ciclo LD, la evaluación comportamental se realizó a mitad del día (ZT6) y a mitad de la noche (ZT18). En el caso de los grupos en DD, se mantuvieron en oscuridad constante durante al menos 7 días antes del inicio del entrenamiento de PR y se evaluaron en la mitad de su día subjetivo (CT6) o en la mitad de su noche subjetiva (CT18). El CT se determinó manualmente para cada ratón, a partir de la observación de los registros de actividad locomotora (actogramas) individuales y la estimación del inicio (CT12) y el final (CT0) de la actividad locomotora. El tamaño muestral utilizado en este experimento fue:

- Ratones jóvenes: N=18 para LD ZT6 y ZT18, N=13 para DD CT6, y N=15 para DD CT18.
- Ratones viejos: N=13 para LD ZT6, N=23 para LD ZT18, N=15 para DD CT6 y CT18.

Para este experimento, todos los grupos de ratones fueron sometidos a una restricción calórica con el fin de que estuvieran dispuestos a presionar la palanca para obtener la recompensa.

Experimento 3:

Con el propósito de determinar si la restricción calórica tuvo o no un impacto en los resultados comportamentales obtenidos en los experimentos previos, se evaluó la motivación por una recompensa apetitosa (*pellets* de chocolate) en ratones alimentados *ad libitum*. Los grupos consistieron en ratones jóvenes y viejos bajo condiciones de LD 12:12, evaluados en el entrenamiento de PR a mitad del día (ZT6) o a mitad de la noche (ZT18). El tamaño muestral utilizado consistió en:

- Ratones jóvenes: N=15 para ZT6, y N=21 para ZT18.
- Ratones viejos: N=16 para ZT6, N=15 para ZT18.

Previo al inicio de la evaluación comportamental, los grupos de ratones jóvenes y viejos fueron pesados y el consumo de comida (alimento balanceado regular) fue medido a lo largo de dos semanas, realizando seis mediciones en total para ambos indicadores. Los datos fueron luego promediados para obtener el peso corporal promedio y el consumo de comida diario.

Adicionalmente, en la semana previa al inicio del entrenamiento de PR, se proporcionó a los ratones 2 horas de acceso diario a los *pellets* de chocolate en sus jaulas individuales, con el propósito de confirmar la preferencia y el consumo del alimento. Asimismo, la intención fue reducir la "novedad" del alimento, minimizando así cualquier influencia que la falta de familiaridad pudiera tener en la prueba comportamental subsiguiente. Este período de exposición previa tuvo como objetivo asegurar que la respuesta comportamental estuviera más relacionada con la motivación intrínseca que con la sorpresa o aversión hacia el alimento introducido durante el entrenamiento de PR.

I.3.5 Análisis de datos

En todos los casos, se corroboró previamente que los datos cumplieran con los supuestos de normalidad, mediante el test de Shapiro-Wilk, y con la homogeneidad de varianzas, mediante el test de Levene, de Bartlett, o test F (según corresponda en cada caso). Cuando los datos no cumplieron uno o ambos supuestos, se realizaron correcciones o se utilizaron tests estadísticos no paramétricos adecuados a la naturaleza de los datos y el diseño del estudio. Asimismo, en casos de falta de normalidad, se consideraron transformaciones de datos apropiadas.

El cálculo de *outliers* para las distribuciones de los datos normales se realizó siguiendo la regla de 3-sigma, donde se calculan los límites superiores e inferiores basados en ± 3 desviaciones estándar (media ± SD*3). Para las distribuciones no normales se llevó a cabo el método de Tukey, donde se calculan los limites superiores e inferiores ± el rango intercuartílico (IQR) multiplicado por el factor k=1.5 (Q1 o Q3 ± IQR*1.5). Los valores que cayeron fuera de estos límites fueron considerados valores atípicos y fueron eliminados del análisis final de los datos.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando Graphpad Prism (GraphPad Software Inc., CA, USA), IBM SPSS Statistics (IBM Corp., Armonk, NY, USA) y R [CORE TEAM, R. C. T. R., et al. 2019]. En todos los casos, el valor de alfa (α) se estableció en $p < 0.05$.

I.3.5.1 Análisis de los datos para la cuantificación de los niveles motivacionales

Para el análisis de los datos de los niveles motivacionales (el número de presiones de palanca, el número de recompensas obtenidas y el *breaking point*) se utilizaron test o modelos estadísticos específicos dependiendo de los factores y grupos que se planificó comparar en cada caso. Por lo tanto, en los siguientes párrafos, estarán descriptos para cada experimento por separado.

Para el **experimento 1**, los resultados de las presiones de palanca y el *breaking point* se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) de una vía con corrección de Welch seguido del test para comparaciones múltiples de Games-Howell. Los datos de las recompensas obtenidas se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de test de Tukey para comparaciones múltiples.

Para el **experimento 2**, los datos obtenidos de los índices medidos (presiones de palanca, recompensas obtenidas y *breaking point*) fueron ajustados a un modelo lineal (ML) en el que se compararon los parámetros Ciclo [LD, DD], Edad [Joven, Viejo] y Fase [Día, Noche] utilizando el paquete "*nlme*" en R [CORE TEAM, R. C. T. R., et al. 2019; Pinheiro et al., 2019]. Para asegurar la normalidad de los datos se aplicó una escala logarítmica a los conjuntos de datos del número de presiones realizadas y del *breaking point*. El modelo se construyó evaluando cada variable en función de la Edad interactuando con la Fase y el Ciclo. Luego, el modelo se ajustó un test de Wald (distribución F) analizando los efectos principales y las interacciones dobles y triples. Se realizaron

comparaciones múltiples *post hoc* entre pares seleccionados de variables (Día vs Noche en LD, y Día s. vs Noche s. en DD para ratones jóvenes; Día vs Noche en LD, y Día s. vs Noche s. en DD para ratones viejos) utilizando el test de Tukey contenido en el paquete "*multcomp*" en R [Hothorn et al., 2008]. Cuando se produjeron interacciones significativas entre los parámetros de interés, se aplicó un modelo lineal de efectos simples para abordar la fuente de la interacción. Para estos casos, se aplicaron correcciones de Bonferroni a los valores de p obtenidos. Se calcularon los tamaños del efecto (*effect sizes*) utilizando la función *Eta Squared* contenida en el paquete "*lsr*" en R [Navarro, 2015]. Los valores obtenidos se compararon con una tabla obtenida de [Cohen, 1998] para interpretar el tamaño del efecto. Resumidamente, el eta cuadrado (η^2, o e*ta squared*) es una medida del tamaño del efecto y puede tomar valores entre 0 y 1. Valores pequeños del eta cuadrado indican un efecto débil, mientras que valores más cercanos a 1 indican un efecto más fuerte

Para el **experimento 3**, los datos obtenidos se evaluaron utilizando un ANOVA de dos vías para los factores Edad [Jóvenes, Viejos] y Puntos horarios [Día, Noche]. Las comparaciones múltiples *post hoc* se realizaron mediante el test de Bonferroni.

I.3.5.2 Análisis de los datos de la dinámica de la respuesta

El procesamiento y análisis de los datos de la dinámica de la respuesta se realizó de la misma forma para todos los experimentos. Se detallará a continuación su procedimiento.

Para generar los gráficos de distribución de frecuencias de presiones, se utilizaron los datos de tiempo (en minutos) correspondientes a cada presión de palanca realizada durante la sesión de PR. Estos datos se recopilaron para cada ratón evaluado en un mismo punto horario. A continuación, se construyó una tabla de distribución de frecuencias (histograma) agrupando los datos en intervalos de 1 minuto. Utilizando esta tabla, se crearon gráficos que representan la distribución de la frecuencia promedio de las presiones. En estos gráficos, se ha elegido mostrar únicamente la media de la frecuencia (sin el SEM ni los datos superpuestos de todos los animales) con el objetivo de facilitar la observación. Esto se hizo con la intención de generar una apreciación cualitativa de la forma de la distribución para cada punto horario. La cuantificación de esta distribución se realizó mediante el cálculo del área bajo la curva. Para este proceso, se consideró

la distribución de las frecuencias de todos los replicados dentro de un mismo punto horario, en lugar de utilizar simplemente el promedio. Para realizar el análisis, los datos de la distribución de frecuencias se dividieron en tres intervalos: 0 a 40 minutos (bloque 1), 40 a 80 minutos (bloque 2) y 80 a 120 minutos (bloque 3). Esta segmentación se realizó para detectar posibles diferencias en la respuesta en el inicio, la mitad y el final de la sesión, respectivamente. Luego, se calculó el área bajo la curva para cada uno de los intervalos de tiempo. Los valores obtenidos de área total, error estándar y tamaño muestral fueron utilizados en el análisis estadístico mediante un ANOVA a dos vías seguido de test de Tukey para comparaciones múltiples. Este enfoque permitió comparar los grupos experimentales correspondientes en los distintos experimentos.

Los gráficos de persistencia a lo largo de la sesión de PR se construyeron utilizando datos de tiempo (en minutos) correspondientes a la última presión de palanca realizada por los animales de un mismo punto horario. Estos datos fueron luego evaluados mediante la función de supervivencia de Kaplan-Meier [Drew et al., 2007], y se aplicó el test de rangos logarítmicos de Mantel-Cox para determinar las diferencias de persistencia entre grupos. En comparaciones que involucraron más de dos grupos, se realizaron tests de Mantel-Cox de a pares de curvas por separado, aplicando la corrección de Bonferroni a los valores de p, teniendo en cuenta el número total de comparaciones realizadas (valor de α corregido = α típico/n° comparaciones). Cada punto en la curva de persistencia representa el momento (tiempo) de la última presión de palanca realizada por un ratón antes de abandonar la tarea comportamental. El total de los puntos sobre la curva representa el total de ratones en ese grupo, siendo por esta razón que la persistencia se muestra como un porcentaje (% de animales que persisten o continúan activos realizando la tarea). Se utilizaron los datos de la mediana de supervivencia (cuya definición es: “el tiempo en el cual el 50% de los sujetos evaluados no sobrevivió”; que aplicado a este caso sería: “el tiempo en el cual el 50% los sujetos evaluados abandonaron la tarea”) ofrecidos como resultados del test de Mantel-Cox a modo de ejemplificar numéricamente las diferencias observadas entre las curvas a comparar.

I.4 Resultados

I.4.1 Experimento 1: Ritmo diario en la motivación por una recompensa de comida

El objetivo del experimento detallado a continuación fue evidenciar si el comportamiento de motivación presentaba una variación a lo largo del día. Para ello, se evaluó en el protocolo de tasa progresiva (PR) a ratones jóvenes (3-4 meses de edad) que se encontraban alojados bajo un ciclo normal de luz/oscuridad 12:12, en tres puntos horarios distintos durante la fase diurna (ZT2, ZT4 y ZT6) y durante la fase nocturna (ZT14, ZT16 y ZT18) del ciclo (ver esquema en la **Figura I.4.1 A**). Los animales fueron restringidos calóricamente durante el entrenamiento y el testeo en el protocolo de motivación, con el objetivo de que se encontraran dispuestos a realizar un esfuerzo (presionar la palanca) por la recompensa de comida.

Los resultados de la tarea comportamental evidenciaron que los ratones presentaban niveles altos de motivación por una recompensa de comida durante la fase nocturna del ciclo LD. Los ratones testeados durante los puntos horarios de la noche presentaron un mayor número de presiones de la palanca respecto a los ratones testeados durante los horarios de día (**Figura I.4.1 B;** $p=0.0001$, ANOVA de una vía). El número total de recompensas obtenidas y el *breaking point* también mostraron valores significativamente más altos para los grupos nocturnos (**Figura I.4.1. C**; $p<0.0001$, ANOVA de una vía para las recompensas; **Figura I.4.1 D**, $p<0.0001$, ANOVA de una vía con corrección de Welch para el *breaking point*). Las comparaciones *post hoc* de los distintos parámetros analizados revelaron que no hubo diferencias significativas entre los puntos horarios (ZTs) evaluados dentro de la misma fase del ciclo, es decir, los ratones no presentaron diferencias en la motivación entre los horarios evaluados en el día (ZT2-6) o en la noche (ZT14-18) (ver la estadística correspondiente a las comparaciones múltiples *post hoc* en la leyenda de la Figura I.4.1). Estos resultados indicaron que, bajo un ciclo ambiental natural, los ratones presentan un ritmo diario en la motivación por comida que es coincidente con su naturaleza nocturna, es decir, los mayores niveles motivacionales se observan durante la fase de actividad (noche) de los animales.

Figura I.4.1. Ritmo diario en la motivación por una recompensa de comida en ratones jóvenes. (A) Ratones jóvenes bajo un ciclo de luz/oscuridad (LD) 12:12 fueron evaluados en el protocolo de tasa progresiva (PR) a ZT2, ZT4 y ZT6 (día) y a ZT14, ZT16 y ZT18 (noche). En el esquema, los distintos horarios en los que se evaluó la tarea de PR se encuentran indicados con una flecha de distinto color. En cada ZT se evaluó un grupo independiente de ratones. Los animales mostraron una mayor motivación por obtener la recompensa durante los horarios nocturnos, tal como lo indica **(B)** el número total de presiones de palanca realizadas (p=0.0001, ANOVA de una vía con corrección de Welch), **(C)** el número total de recompensas obtenidas (p<0.0001, ANOVA de una vía), y **(D)** el *breaking point* (p<0.0001, ANOVA de una vía con corrección del Welch). Los datos se encuentran expresados como la media ± SEM (N=9-12 por ZT). Comparaciones *post hoc* para el Nº de presiones: *p<0.05 para ZT2 vs ZT14 y ZT16, para ZT4 vs ZT14, ZT16 y ZT18, y para ZT6 vs ZT16. Para el Nº de recompensas: *p<0.05 para ZT6 vs ZT14 y ZT16; **p<0.01 para ZT6 vs ZT18; ***p<0.001 para ZT2 vs ZT14, ZT16 y ZT18, y para ZT4 vs ZT14, ZT16 y ZT18. Para el *breaking point*: *p<0.05 para ZT2 vs ZT14, ZT16 y ZT18, y para ZT4 vs ZT14, ZT16 y ZT18. Post test de Tukey o de Games-Howell para comparaciones múltiples.

Adicionalmente, si nos centramos en el análisis de la dinámica de la respuesta (**Figura I.4.2**), podemos comparar cómo se distribuyen las presiones de palanca, entre los grupos evaluados durante el día y durante la noche, a lo largo de los 120 minutos de duración del test comportamental. Un análisis cualitativo de la distribución de la frecuencia de las presiones de palanca (**Figura I.4.2 A**) permite observar que los ratones evaluados en los horarios diurnos tienen una menor frecuencia de presiones a lo largo de toda la sesión, y que, además, las presiones tienden a disminuir conforme avanza el tiempo, siendo casi nulas para el final de la tarea. Por el

contrario, la respuesta de los animales testeados en los horarios nocturnos presenta una alta frecuencia de presiones (con un pico dentro de los primeros 40 minutos de iniciada la sesión) que se mantiene hasta el final de la sesión. La cuantificación de esta respuesta, como el área total debajo de la curva dividida en intervalos de 40 minutos (**Figura I.4.2 B**) corrobora lo antes dicho (factor ZT: $p<0.0001$, factor Intervalos de tiempo: $p<0.0001$, Interacción: $p=0.0046$, ANOVA a dos vías). Dado que la interacción entre los factores fue significativa, debemos tener en cuenta que el efecto del horario es distinto según el bloque que se analice de la sesión de motivación. Los valores de área de los ZT diurnos fueron menores a los nocturnos en los tres intervalos de tiempo elegidos (ver la estadística de las comparaciones múltiples *post hoc* correspondiente en la leyenda de la Figura I.4.2). Asimismo, los resultados de la cuantificación corroboran que para los ratones evaluados durante la noche, el patrón observado en los histogramas con un pico en los primeros 40 minutos y un decaimiento progresivo de la respuesta conforme avanza el tiempo en la sesión, es significativo (ZT14: $p=0.0335$ para 0-40 min vs 40-80 min, $p<0.0001$ para 0-40 min vs 80-120 min; ZT16: $p<0.0001$ para 0-40 min vs 80-120 min; ZT18: $p<0.0001$ para 0-40 min vs 40-80 min, $p<0.0001$ para 0-40 min vs 80-120 min, post test de Tukey).

Por otro lado, el porcentaje de animales que persisten en la tarea (**Figura I.4.2 C**) apunta en la misma dirección. Los animales testados durante el día tuvieron una menor persistencia (es decir, abandonaron la tarea antes) que los testados durante la noche ($p<0.0001$, test de Mantel-Cox; ver estadística de comparaciones múltiples en la leyenda de la Figura 4.1.2). De hecho, para los puntos de día, la mitad de los animales abandonaron la tarea dentro de la primer hora de iniciada la sesión de motivación (mediana de supervivencia: 67.5 min para ZT2, 46.4 min para ZT4, y 54.3 min para ZT6), mientras que la mitad de los animales testeados en la noche se mantuvieron presionando activamente la palanca hasta el final de la tarea (mediana de supervivencia: 119.3 min para ZT14, 118.4 min para ZT16, y 118.1 min para ZT18).

Figura I.4.2. Dinámica de la respuesta motivacional a distintos horarios durante las fases diurna y nocturna. (A) Distribución de la frecuencia de presiones de palanca realizadas durante los 120 minutos de duración de la sesión de PR para los horarios de testeo diurnos (ZT2-6) y nocturnos (ZT14-18). Las líneas verticales punteadas denotan los intervalos de tiempo (de 40 min) en los que se dividió los datos para su cuantificación posterior. **(B)** Área bajo la curva de la distribución de frecuencia de presiones para los tres intervalos de tiempo elegidos (factor ZT: $p<0.0001$, factor Intervalos de tiempo: $p<0.0001$, ANOVA a dos vías). **(C)** Porcentaje de animales que persisten en la tarea en función del tiempo que dura la sesión de motivación ($p<0.0001$, test de Mantel-Cox). Cada punto graficado representa la última presión de palanca realizada por un ratón antes de abandonar la tarea. Los datos en (A) se encuentran expresado como la media de la frecuencia, los datos en (B) se expresan como la media ± SEM (N=9-12 por ZT). Comparaciones *post hoc* para el <u>área bajo la curva</u>: intervalo de 0-40 min: ***$p<0.001$ para ZT2, ZT4 y ZT6 vs ZT14, ZT16 y ZT18; intervalo 40-80 min: ***$p<0.001$ para ZT2 vs ZT14 y ZT16, para ZT4 vs ZT14, ZT16 y ZT18, ZT6 vs ZT14 y ZT16, **$p<0.01$ para ZT2 vs ZT18 y ZT6 vs ZT18; intervalo 80-120 min: ***$p<0.001$ para ZT2 vs ZT14, ZT4 vs ZT14 y ZT16, **$p<0.01$ para ZT2 vs ZT16, ZT6 vs ZT16 y ZT18, para ZT4 vs ZT18. Comparaciones *post hoc* para <u>porcentaje de</u> <u>persistencia</u>: ***$p<0.001$ para ZT2 vs ZT14 y ZT16, para ZT4 vs ZT14, ZT16 y ZT18, para ZT6 vs ZT14 y ZT16; *$p<0.05$ para ZT2 vs ZT18 y para ZT6 vs ZT18. Post test de Tukey para comparaciones múltiples y comparaciones de a pares para test de Mantel-Cox con corrección de Bonferroni (α corregido=0.0033).

En conjunto, estos resultados indicaron un ritmo diario en la motivación por una recompensa de comida en ratones jóvenes bajo un ciclo ambiental natural. Además, los niveles motivacionales más altos se observaron durante la noche, coincidente con el patrón de comportamiento nocturno de esta cepa de ratones. Adicionalmente, los ratones evaluados durante los horarios de día no sólo presentaron una menor respuesta en promedio, sino que abandonan mucho antes la tarea en comparación con los de la noche.

Debido a que no se encontraron diferencias en la motivación entre los distintos horarios dentro de una misma fase del ciclo, y con el objetivo de minimizar la cantidad de animales utilizados, los experimentos siguientes se realizaron en sólo dos puntos horarios representativos de la mitad de la fase diurna y la mitad de la fase nocturna.

I.4.2. Experimento 2: Variación día-noche de la motivación por una recompensa en ratones jóvenes y viejos bajo condiciones de LD y DD

Una de las características principales de un ritmo circadiano es que mantenga su naturaleza oscilatoria en ausencia del agente sincronizador o *zeitgeber*. Dado que la luz es uno de los principales sincronizadores del reloj biológico en mamíferos [Golombek & Rosenstein, 2010], su ausencia permanente a lo largo de varios días permite evidenciar la naturaleza circadiana de las distintas variables fisiológicas. Bajo estas condiciones de oscuridad constante (o DD) las variables rítmicas se encuentran en libre curso y oscilan con su periodo endógeno. Esto quiere decir que, a pesar de que no haya indicios lumínicos externos (ni indicios de ningún otro agente sincronizador) que indiquen qué hora del día es, el animal bajo estas condiciones experimenta un "día y una noche subjetivos" en los cuales su comportamiento y fisiología cambia periódicamente. Teniendo en cuenta esto, nos propusimos evidenciar si las diferencias día-noche en la motivación por una recompensa observadas previamente mostraban una naturaleza circadiana al mantenerse en condiciones constantes.

Por otro lado, se sabe que la robustez de los ritmos circadianos se ve afectada por el envejecimiento. Estos efectos se evidencian, por ejemplo, en la amplitud de la oscilación del ritmo circadiano, la cual se ve disminuida con la edad. Adicionalmente, la actividad del sistema dopaminérgico experimenta un decaimiento como consecuencia del envejecimiento [Beckman

et al., 2006]. Esta disminución en el correcto funcionamiento del sistema dopaminérgico podría, a su vez, estar afectando el estado motivacional de los animales. Teniendo en cuenta lo expuesto, se hipotetizó que los niveles motivacionales podrían estar viéndose afectados en ratones viejos, así como también, podría ocurrir que la diferencia día-noche sea inexistente o su amplitud se vea afectada. Para corroborar dichas hipótesis, se incluyó un grupo experimental de ratones viejos (18 meses de edad) para el estudio circadiano de la motivación.

Los resultados detallados en los párrafos a continuación, fueron analizados en conjunto en un modelo estadístico lineal con el objetivo de poder comparar el desempeño en la tarea de motivación, bajo distintos ciclos y a distintos horarios, de los grupos de ratones jóvenes y viejos. Para ello, los resultados de los indicadores principales de la prueba de motivación (Nº de presiones de palanca, recompensas obtenidas y *breaking point*) se ajustaron a un modelo lineal teniendo en cuenta tres parámetros de análisis: el ciclo [LD, DD], la fase de evaluación [Día, Noche], y la edad de los animales [Jóvenes, Viejos]. Luego, se estudiaron las interacciones entre los distintos parámetros y se realizaron comparaciones múltiples *post hoc* entre pares seleccionados de variables (para mayor detalle ver la sección I.3.5.1 en materiales y métodos). Por cuestiones de simplicidad en la observación, los resultados se mostrarán gráficamente por separado entre los grupos de ratones jóvenes y viejos. Sin embargo, es importante tener presente que el diseño del análisis estadístico incluyó ambos grupos y es por eso que se establecerán comparaciones entre ellos. La significancia estadística (valores de p) que se mostrarán en las figuras corresponde a las comparaciones múltiples *post hoc*. En la **Tabla I.4.3** a continuación, se muestra la estadística completa obtenida del modelo lineal.

Parámetros		Presiones de palanca (Log)			Recompensas			*Breaking Point* (Log)		
		F	p	η2	F	p	η2	F	p	η2
Edad [Jóvenes, Viejos]		2,202	0.14	0.022	2,505	0.116	0.023	2,644	0.106	0.024
Ciclo [LD, DD]		20,535	**<0.001**	0.103	18,629	**<0.001**	0.093	20,031	**<0.001**	0.100
Fase [Día, Noche]		87,803	**<0.001**	0.374	90,123	**<0.001**	0.385	89,444	**<0.001**	0.380
Interacciones	**Edad:Ciclo**	4,175	**0.043**	0.019	4,022	**0.047**	0.017	4,181	**0.043**	0.019
	Edad:Fase	0.004	0.947	<0.003	0.256	0.614	<0.003	0.017	0.896	<0.003
	Ciclo:Fase	4,873	**0.029**	0.02	2,967	0.087	0.012	4,077	**0.046**	0.017
	Edad:Ciclo:Fase	0.021	0.886	<0.003	0.223	0.637	<0.003	0.027	0.869	<0.003

Tabla I.4.3. Resultados del test de Wald (estadístico F) ajustado a los modelos lineales completos para los índices de motivación: presiones de palanca, recompensas y *breaking point*. Los valores de p por debajo del umbral de significancia de alfa (α) del 5% se indican en negrita. Se muestran los valores de Eta cuadrado (η^2, del inglés *Eta squared*) como indicador del tamaño del efecto. El valor de Eta cuadrado para cada factor (o interacción entre factores) indica la proporción de la variabilidad total en la variable dependiente que es explicada por ese factor, teniendo en cuenta los otros factores en el modelo. Puede tomar valores entre 0 y 1, cuanto más cercano a 1 el efecto es mucho mayor. En este caso, notar que el valor de η^2 para la Fase es mayor que para el Ciclo, aunque ambos tengan valores de p significativos. Esto sugiere que el factor Fase tiene un efecto moderadamente grande en las variables dependientes (presiones de palanca, recompensas o *breaking point*), en comparación con el factor Ciclo.

Los grupos de ratones jóvenes y viejos fueron expuestos a condiciones de oscuridad constante durante una semana y, luego, su motivación fue evaluada mediante el protocolo de PR en dos momentos distintos: a mitad de su día subjetivo (CT6) y a mitad de su noche subjetiva (CT18). Dado que la cepa de ratones utilizada presenta un periodo en libre curso (T, tau) menor a 24 horas (T entre 23.7 y 23.9 horas [Cutler et al., 2003; Takasu et al., 2012]) los horarios (CTs) de entrenamiento y testeo en el protocolo de PR debieron ser estimados previamente de forma manual. Esto quiere decir que se llevó a cabo una evaluación de los actogramas de cada ratón para predecir y determinar el momento que correspondería a CT6 o CT18 para cada animal. Por otro lado, a modo de grupos control, se evaluó la motivación en ratones jóvenes y viejos bajo condiciones normales de LD 12:12 en la mitad del día (ZT6) y en la mitad de la noche (ZT18) (ver esquema representativo de los grupos y horarios en la **Figura I.4.4 A**).

Del mismo modo que se observó en el primer experimento, los ratones jóvenes bajo un ciclo LD mostraron una diferencia día-noche en su motivación, con niveles significativamente

mayores durante la mitad de la noche (ZT18) comparado con la mitad del día (ZT6), tal como se puede observar en la cantidad de presiones de palanca, las recompensas obtenidas y el *breaking point* (**Figura I.4.4 B, C y D**; p <0.001 para los tres indicadores, test de Tukey). Más interesante aún, se encontró que está variación se mantenía en condiciones de oscuridad constante, indicando su naturaleza circadiana endógena. El número total de presiones de palanca (**Figura I.4.4 B**, p=0.006, test de Tukey), las recompensas obtenidas (**Figura I.4.4 C**, p=0.002, test de Tukey) y el *breaking point* (**Figura I.4.4 D**, p=0.004, test de Tukey) mostraron valores más altos durante la noche subjetiva (CT18) en comparación con el día subjetivo (CT6).

Para el grupo de ratones viejos, los resultados mostraron que estos también presentaban una variación día-noche en la motivación por una recompensa para ambos ciclos ambientales (LD y DD). Nuevamente, se encontró que los niveles motivaciones fueron mayores durante la noche bajo LD y durante la noche subjetiva en DD, tal como lo indicaron la cantidad de presiones de palanca hechas (**Figura I.4.4 E**, p<0.001 para LD y p=0.002 para DD, test de Tukey), las recompensas obtenidas (**Figura I.4.4 F**, p<0.001 para LD y p=0.001 para DD, test de Tukey), y el *breaking point* (**Figura I.4.4 G**, p< 0.001 para LD y p=0.002 para DD, test de Tukey). En resumen, estos resultados evidenciaron que los ratones viejos mantenían la variación diaria en la motivación por una recompensa e incluso, esta diferencia estaba presente de manera endógena aún en ausencia de señales de sincronización.

Al analizar la dinámica de la respuesta en los ratones jóvenes, se observó que la distribución de la frecuencia de las presiones a lo largo del tiempo es mucho menor para los horarios correspondientes tanto al día para LD y al día subjetivo para DD en comparación con las fases nocturnas (**Figura I.4.5 A**). La cuantificación del área bajo la curva de esta distribución de frecuencias mostró una significancia estadística tanto para el horario como para los intervalos de tiempo en los que se dividió los datos (**Figura I.4.5 B**, factor Horario: p<0.0001, factor Intervalo de tiempo: p<0.0001, Interacción: p=0.2675, ANOVA a dos vías). Para los tres intervalos de tiempo, los valores de área obtenidos durante las fases diurnas son significativamente menores a las nocturnas (ver estadística de comparaciones *post hoc* en la leyenda de la Figura I.4.5). Adicionalmente, solo en el grupo de ratones bajo un ciclo LD evaluados durante la noche (ZT18) se evidencia una caída significativa en la frecuencia de las presiones de palanca conforme avanza

Figura I.4.4. La variación diaria en la motivación por una recompensa persiste en condiciones de oscuridad constante en ratones jóvenes, y se mantiene en ratones viejos tanto en LD como en DD. (A) Ratones jóvenes (3-4 meses) y viejos (18 meses) fueron sometidos a un ciclo luz/oscuridad (LD) 12:12 o a condiciones de oscuridad constante (DD) y, luego, fueron evaluados en el protocolo de tasa progresiva (PR) a ZT6 (mitad del día) y a ZT18 (mitad de la noche) para LD, y a CT6 (mitad del día subjetivo) y CT18 (mitad de la noche subjetiva) para DD. Los animales jóvenes mostraron una mayor motivación por obtener la recompensa durante los horarios correspondientes a la fase nocturna en ambas condiciones experimentales, tal como se puede observar para **(B)** el número total de presiones de palanca ($p<0.001$ para día LD vs noche LD, $p=0.006$ para día subjetivo DD vs noche subjetiva. DD, test de Tukey), **(C)** el número total de recompensas obtenidas ($p<0.001$ para día LD vs noche LD, $p=0.002$ para día subjetivo DD vs noche subjetiva DD, test de Tukey), y **(D)** el *breaking point* ($p<0.001$ para día LD vs noche LD, $p=0.004$ día subjetivo DD vs noche subjetiva DD, test de Tukey). Asimismo, los ratones envejecidos mostraron diferencias día-noche en su motivación bajo ambos ciclos ambientales, mostrando mayores niveles durante los horarios correspondientes a la noche (LD) y a la noche subjetiva (DD), tal como se observa para **(E)** el número total de presiones de palanca ($p<0.001$ para día LD vs noche LD, $p=0.002$ para día subjetivo DD vs noche subjetiva DD, test de Tukey), **(F)** el número total de recompensas obtenidas ($p<0.001$ para día LD vs noche LD, $p=0.001$ para día subjetivo DD vs noche subjetiva. DD, test de Tukey), y **(G)** el *breaking point* ($p<0.001$ para día LD vs noche LD, $p=0.002$ para día subjetivo. DD vs noche subjetiva. DD, test de Tukey). Los datos se expresan como la media ± SEM (ratones jóvenes: N=18 para día y noche LD, N=15 para noche subjetiva DD, y N=13 para día subjetivo DD; ratones viejos: N=13 para día LD, N=23 para noche LD, y N=15 para día y noche subjetivos DD). **$p<0.01$, ***$p<0.001$, modelo lineal seguido del test de Tukey para comparaciones múltiples. Consultar la Tabla 4.2.1 para obtener la estadística completa del modelo lineal.

el tiempo en la sesión de motivación (LD Noche: p=0.0065 para 0-40 min vs. 40-80 min, p<0.0001 para 0-40 min vs 80-120 min, ANOVA a dos vías seguido de post test de Tukey). Por el contrario, en los ratones en DD testeados durante la noche subjetiva (CT18), la frecuencia de las presiones de palanca se mantiene alta y constante a lo largo de los 120 minutos de duración de la sesión de motivación (DD Noche subjetiva: p=0.5940 para 0-40 min vs. 40-80 min, p=0.2634 para 0-40min vs 80-120 min, y p=0.9261 para 40-80 min vs 80-120 min, ANOVA a dos vías seguido de post test de Tukey). En este sentido, es interesante notar que, a pesar de que los animales testeados en los horarios nocturnos en ambos ciclos presentan niveles elevados de motivación, la respuesta a lo largo de la sesión de motivación es distinta. Los ratones en condiciones de oscuridad constante parecerían tener una mayor persistencia y vigor a presionar la palanca para obtener la recompensa durante toda la sesión comportamental. Por otro lado, para los ratones evaluados en las fases diurnas de ambos ciclos (ZT6 y CT6, **Figura I.4.5 A**), a pesar de que a simple vista parecería evidenciarse una tendencia a una mayor frecuencia de presiones en el grupo DD, no se encontraron diferencias significativas entre estos horarios en ninguno de los intervalos de tiempo analizados (LD día vs LD día subjetivo: p=0.4975 para 0-40 min, p=0.7077 para 40-80 min, y p=0.9447 para 80-120 min, ANOVA a dos vías seguido de post test de Tukey).

Las curvas de persistencia en la tarea comportamental a lo largo del tiempo (**Figura I.4.5 C**) mostraron nuevamente las diferencias día-noche tanto para el ciclo LD como para el DD (p<0.0001, test de Mantel-Cox). Los ratones testeados en el día (ZT6) y en el día subjetivo (CT6) dejan de presionar la palanca, y por lo tanto abandonan la tarea, mucho antes que los animales testados en la noche (ZT18) y la noche subjetiva (CT18), respectivamente (medianas de supervivencia: 51.3 min para LD Día, 91.8 min para DD Día subjetivo, 118.3 min para LD Noche, y 119.1 min para DD Noche subjetiva). Al comparar las medianas y la caída de las curvas entre los grupos testeados en las fases diurnas parecería haber una tendencia hacia una mejora en la persistencia para los ratones evaluados en el día subjetivo de DD, sin embargo, no se identificaron diferencias significativas entre estos grupos.

Figura I.4.5. Dinámica de la respuesta motivacional en condiciones de LD y DD en ratones jóvenes. (A) Distribución de la frecuencia de presiones de palanca realizadas durante la sesión de motivación para ratones jóvenes bajo un ciclo LD 12:12 o bajo condiciones de oscuridad constante (DD). Los animales fueron testeados a mitad del día (ZT6) o la noche (ZT18) en LD, y a mitad del día subjetivo (CT6) o la noche subjetiva (CT18) en DD. Las líneas verticales punteadas denotan los intervalos de tiempo (de 40 min) en los que se dividió los datos para su cuantificación posterior. **(B)** Área bajo la curva de la distribución de frecuencia de presiones para los tres intervalos de tiempo elegidos (factor Horario: $p<0.0001$, factor Intervalo de tiempo: $p<0.0001$, ANOVA a dos vías). **(C)** Porcentaje de animales que persisten en la tarea en función del tiempo que dura la sesión de motivación ($p<0.0001$, test de Mantel-Cox). Cada punto graficado representa la última presión de palanca realizada por un ratón antes de abandonar la tarea. Los datos en (A) se encuentran expresados como la media de la frecuencia, los datos en (B) se expresan como la media ± SEM (N=18 para LD Día y Noche, N=13 para DD Día subjetivo y N=15 para DD Noche subjetiva). Comparaciones *post hoc* para el área bajo la curva: intervalo de 0-40 min: ***$p<0.001$ para LD Día vs Noche, **$p<0.01$ para DD Día s. vs Noche s.; intervalo 40-80 min: ***$p<0.001$ para LD Día vs Noche, y *$p<0.05$, para DD Día s. vs Noche s.; intervalo 80-120 min: ***$p<0.001$ para DD Día s. vs Noche s. y *$p>0.05$ para LD Día vs Noche. Comparaciones *post hoc* para porcentaje de persistencia: ***$p<0.001$ LD Día vs Noche y para DD Día s. vs Noche s. Post test de Tukey para comparaciones múltiples y comparaciones de a pares para test de Mantel-Cox con corrección de Bonferroni (α corregido=0.0083).

El análisis de la dinámica de la respuesta en el grupo de ratones viejos presentó algunas variaciones interesantes. Los ratones viejos evaluados en el día y la noche del ciclo LD mostraron una menor frecuencia en las presiones de palanca a lo largo de la sesión de motivación (**Figura I.4.6 A**) en comparación a los puntos horarios equivalentes bajo condiciones de DD. En particular, al observar los gráficos de frecuencias promedio, se puede ver que los ratones evaluados en la noche del LD (ZT18) no solo presentan menor frecuencia, sino que se mantiene constante a lo largo de la sesión. Por el contrario, los ratones evaluados en la noche subjetiva del DD (CT18) muestran un máximo en la respuesta a los pocos minutos de iniciada la sesión. Por otro lado, los ratones testeados en el día del LD (ZT6) no presentan presiones de palanca en los últimos 40 min de la sesión (tercer intervalo de tiempo: 80 a 120 minutos, **Figura I.4.6 A**). Esto quiere decir que, luego de 80 minutos de iniciada la sesión de motivación, todos los ratones del grupo LD Día habían dejado de responder y habían abandonado la tarea. La cuantificación del área bajo la curva de estas distribuciones de frecuencias, pudo corroborar las afirmaciones anteriores (**Figura I.4.6 B**, factor Horario: $p<0.0001$, factor Intervalos de tiempo: $p<0.0001$, Interacción: $p=0.3586$, ANOVA a dos vías). En principio, en el intervalo de tiempo de 0-40 minutos, sólo los animales en condiciones de DD presentaron una diferencia entre el día y la noche subjetivos ($p<0.0001$ para DD Día subjetivo vs DD Noche subjetiva, y $p=0.0967$ para LD Día vs LD Noche, post test de Tukey). Adicionalmente, en este intervalo, se corrobora lo antes expuesto: el área bajo la curva de la frecuencia de presiones de los ratones evaluados en la noche subjetiva del DD es mucho mayor que la de los evaluados en la noche del LD ($p<0.0001$ para DD Noche subjetiva vs LD Noche, post test de Tukey). La baja frecuencia de presiones de los ratones en la noche del LD sea, probablemente, la causa por la cual no se encontraron diferencias significativas entre el día y la noche de este ciclo. Para el segundo intervalo, 40-80 minutos, la cuantificación sí arrojó diferencias entre el día y la noche del LD ($p=0.0190$ para LD Día vs LD Noche, post test de Tukey), probablemente debido a la disminución de presiones de la palanca de los ratones testeados en el día del LD, como se mencionó anteriormente. Por último, en el intervalo de 80 a 120 minutos, no se encontraron diferencias significativas entre los horarios de testeo para ninguno de los ciclos. Finalmente, solo los ratones evaluados en la noche subjetiva de DD mostraron una caída significativa de la frecuencia de las presiones a lo largo del tiempo (DD Noche subjetiva: $p=0.0117$

para 0-40min vs 40-80min, y p=0.0001 para 0-40min vs 80-120min, post test de Tukey), mientras que los ratones testeados en la noche del LD presentaron una respuesta constante (LD Noche: p=0.7906 para 0-40min vs 40-80min, p=0.2606 para 0-40min vs 80-120min, y p=0.6323 para 40-80min vs 80-120min, post test de Tukey).

La persistencia de los animales en la tarea (**Figura I.4.6 C**, p<0.0001 test de Mantel-Cox) evidencia las diferencias día-noche tanto para LD como para DD (p<0.0001 para LD Día vs Noche, p=0.0080 para DD Día subjetivo vs Noche subjetiva, test de Mantel-Cox con corrección de Bonferroni). Otra comparación de interés mostró que las curvas de persistencia entre los ratones evaluados en el día subjetivo de DD y las de los evaluados en el día de LD son significativamente diferentes entre sí (p<0.0001 para LD día vs DD Día subjetivo, test de Mantel-Cox con corrección de Bonferroni). Como se observó con anterioridad, los ratones testeados en el día del LD tienen una menor persistencia a continuar presionando la palanca y, por lo tanto, abandonan la tarea mucho antes en comparación a los animales testados en el día subjetivo del DD (mediana de supervivencia: 37.7 min para LD Día, y 98.3 min para DD Día subjetivo). En cuanto a los puntos horarios nocturnos, no se observaron diferencias entre las curvas de persistencia de ambos ciclos (p=0.8492 para LD Noche vs DD Noche subjetiva, test de Mantel-Cox con corrección de Bonferroni) y, en ambos casos, la mitad de los animales persistieron en la tarea hasta casi el final de la misma (medianas de supervivencia: 117.2 min para LD Noche, y 118.6 min para DD Noche subjetiva).

Por otro lado, al analizar los efectos del modelo lineal (ML, ver la **Tabla I.4.3**) y las interacciones entre los distintos parámetros (ciclo, fase de evaluación y edad de los animales) se observó que la variación diaria y circadiana de la motivación no se ve afectada por la edad (ML; factor Fase: p<0.001 para presiones de palanca, recompensas, y *breaking point*; factor Edad: p=0.140 para presiones de palanca, p=0.116 para recompensas, y p=0.106 para *breaking point*). La interacción entre los factores Edad y Fase no fue significativa para ninguno de los índices comportamentales medidos.

Figura I.4.6. Dinámica de la respuesta motivacional en condiciones de LD y DD en ratones viejos. (A) Distribución de la frecuencia de presiones de palanca realizadas durante la sesión de motivación para ratones viejos bajo un ciclo LD 12:12 o bajo condiciones de oscuridad constante (DD). Los animales fueron testeados a mitad del día (ZT6) o la noche (ZT18) en LD, y a mitad del día subjetivo (CT6) o la noche subjetiva (CT18) en DD. Las líneas verticales punteadas denotan los intervalos de tiempo (de 40 min) en los que se dividió los datos para su cuantificación posterior. **(B)** Área bajo la curva de la distribución de frecuencia de presiones para los tres intervalos de tiempo elegidos (factor Horario: $p<0.0001$, factor Intervalo de tiempo: $p<0.0001$, ANOVA a dos vías). **(C)** Porcentaje de animales que persisten en la tarea en función del tiempo que dura la sesión de motivación ($p<0.0001$, test de Mantel-Cox). Cada punto graficado representa la última presión de palanca realizada por un ratón antes de abandonar la tarea. Los datos en (A) se encuentran expresado como la media de la frecuencia, los datos en (B) se expresan como la media ± SEM (N=18 para LD Día y Noche, N=13 para DD Día s. y N=15 para DD Noche s.). Comparaciones *post hoc* para el área bajo la curva: intervalo de 0-40 min: ***$p<0.001$ para DD Día s. vs DD Noche s. y para LD Noche vs DD Noche s.; intervalo 40-80 min: *$p<0.05$, para LD Día vs LD Noche. Comparaciones *post hoc* para porcentaje de persistencia: ***$p<0.01$ LD Día vs LD Noche y para LD Día vs DD Día s.; *$p<0.05$ para DD Día s. vs DD Noche s. Post test de Tukey para comparaciones múltiples y post test de Mantel-Cox con corrección de Bonferroni (α corregido=0.0083).

Adicionalmente, se encontró que el ciclo al que los ratones fueron expuestos durante el experimento comportamental (LD u oscuridad constante DD) afectó significativamente el rendimiento en la tarea de PR para todos los índices medidos. Así, los ratones sometidos a oscuridad constante mostraron niveles de motivación más altos en comparación con los que estaban bajo un ciclo LD (ML; factor Ciclo: $p<0.001$ para presiones de palanca, recompensas y *breaking point*).

En cuanto a las interacciones del factor Ciclo con los otros factores, el modelo reveló algunas dobles interacciones significativas. La interacción entre el Ciclo y la Fase fue significativa para las variables presiones de palanca y *breaking point* (ML; interacción Ciclo*Fase: $p=0.029$ para presiones de palanca, $p=0.087$ para recompensas, y $p=0.046$ para *breaking point*). Esto sugirió que los ciclos ambientales (LD o DD) a los que se expuso a los animales ejercieron un efecto diferencial en el comportamiento de motivación dependiendo del momento (día o noche) en el cual se evaluó este comportamiento. Esta última interacción fue de particular interés, dado que un estudio previo de Fernández y colaboradores (2018) demostró que la luz puede ejercer un efecto agudo en los comportamientos relacionados con el estado de ánimo y la obtención de una recompensa pasando por alto al reloj biológico (es decir, produciendo lo que se conoce como "enmascaramiento"). Es por esto que, para abordar y poder explicar la fuente de la interacción entre los factores Ciclo y Fase se aplicó un modelo lineal de efectos simples para las fases de evaluación (día y noche). El modelo mostró que el ciclo LD afectó negativamente la respuesta motivacional de los ratones en ambos momentos de evaluación. Sin embargo, la motivación que mostraron los ratones en el día fue la más afectada por el efecto del ciclo LD, tal como indicaron los tamaños del efecto (η^2, *Eta Squared*)[2] para todas las variables medidas (ML; Factor Ciclo para las presiones de palanca: Fase=Día: $p<0.001$, $\eta^2=0.266$; Fase=Noche: $p=0.026$, $\eta^2=0.073$; para recompensas: Fase=Día: $p>0.001$, $\eta^2=0.271$; Fase=Noche: $p=0.034$, $\eta^2=0.067$; para *breaking point*: Fase=Día: $p>0.001$, $\eta^2=0.271$; Fase=Noche: $p=0.028$, $\eta^2=0.071$). En conjunto, estos resultados indicaron que los niveles de motivación se vieron afectados en los ratones bajo un ciclo LD en comparación con los ratones en condiciones de oscuridad constante. Además de este efecto

[2] Recordar que el η2 puede tomar valores entre 0 y 1, siendo los más cercanos a uno los que indican un efecto muy grande. En este caso, los valores de Eta cuadrado obtenidos para el Día son mucho mayores que los de la Noche, lo que indica que la fase de evaluación del Día tiene un efecto moderadamente grande en las variables dependientes.

global del ciclo LD sobre el comportamiento de motivación, la luz del día parecería tener un efecto agudo en dicho comportamiento.

Por último, la interacción entre el Ciclo y la Edad fue significativa para todos los índices comportamentales medidos (ML; interacción Edad*Ciclo: p=0.043 para presiones de palanca, p=0.047 para recompensas, y p=0.043 para *breaking point*). Esto sugirió que el efecto de la edad en los niveles motivacionales varía dependiendo del ciclo al cual los animales están expuestos. En otras palabras, los ratones jóvenes y viejos tendrían un desempeño distinto en la tarea motivacional cuando están bajo un ciclo de luz/oscuridad o en oscuridad constante.

En conjunto, estos resultados demostraron que los ratones jóvenes y viejos bajo un ciclo normal LD 12:12 presentan una variación diaria en la motivación por una recompensa de comida, que se mantiene bajo condiciones de oscuridad constante (DD) y que no se ve afectada por el envejecimiento.

I.4.3. Experimento 3: Variación día-noche en la motivación por una recompensa de chocolate en ratones jóvenes y viejos alimentados *ad libitum*

La regulación de la ingesta de alimentos está influenciada por mecanismos complementarios homeostáticos y hedónicos. Mientras que los núcleos hipotalámicos del cerebro desempeñan un rol predominante en la regulación del impulso homeostático de la alimentación (hambre), las estructuras cortico-límbicas controlan los comportamientos alimentarios asociados a recompensas [DePoy et al., 2017; Feillet et al., 2017]. La homeostasis se encarga de satisfacer las necesidades fisiológicas del organismo, mientras que el sistema de recompensa contribuye a la experiencia placentera y emocional asociada con la alimentación. A su vez, ambos sistemas no funcionan de manera aislada, sino que interactúan de manera compleja para regular la ingesta de forma efectiva y adaptativa según las demandas del entorno.

En los experimentos descriptos con anterioridad, los animales fueron sometidos a una restricción calórica (reduciendo la cantidad diaria de alimento recibido) durante la semana previa y durante el entrenamiento en el protocolo de PR. De esta forma, todos los grupos evaluados tenían de base un déficit energético que los motivaba a obtener la recompensa de comida. Cuando se evalúa la motivación por obtener comida en animales saciados, las propiedades de la

recompensa (o su valor hedónico) deben ser lo suficientemente atractivas como para que los animales estén dispuestos a trabajar por ella. En este sentido, experimentos previos de nuestra línea de investigación mostraron que los ratones alimentados *ad libitum* no muestran interés en hacer un esfuerzo para obtener *pellets* regulares (misma composición que el alimento balanceado regular) como recompensa. Estos resultados no se muestran en la presente tesis dado que los animales no generan la asociación básica presión-recompensa, es decir, no hay un aprendizaje en la primera etapa del entrenamiento que corresponde a condicionamiento operante y, por lo tanto, no pueden ser evaluados luego en la etapa de PR propiamente dicha.

Por otro lado, al evaluar animales alimentados *ad libitum* de distintas edades, se debe tener en cuenta que pueden existir diferencias respecto a los requerimientos nutricionales asociados con la edad, y que podrían influir en el comportamiento de motivación. En este sentido, nuestros resultados evidenciaron una diferencia en el peso corporal y en el consumo diario de comida entre ratones jóvenes y viejos alimentados *ad libitum* bajo un ciclo normal de luz/oscuridad (**Figura I.4.7**). En particular, los ratones viejos muestran un mayor peso, pero su ingesta diaria es menor en comparación a los ratones jóvenes. Esto podría indicar posibles

Figura I.4.7. Pesos y consumo de comida en ratones jóvenes y viejos alimentados *ad libitum* bajo un ciclo de luz/oscuridad. Se realizaron medidas del pesaje corporal y del consumo de comida (alimento balanceado regular) a lo largo de dos semanas. Los ratones se encontraban alojados en jaulas individuales, alimentados *ad libitum* y bajo un ciclo LD 12:12. **(A)** Los ratones viejos presentan un mayor peso corporal respecto a los ratones jóvenes ($p<0.0001$, t-test a dos colas con corrección del Welch). **(B)** El consumo de comida diario es mayor en ratones jóvenes en comparación a los ratones viejos ($p<0.0001$, t-test a dos colas). Los datos se expresan como la media ± SEM (Jóvenes: N=15, Viejos: N=16). ***$p<0.001$.

desregulaciones en el procesamiento de nutrientes, así como una menor demanda para satisfacer los requerimientos energéticos diarios en los ratones viejos.

Ahora bien, como se mencionó en párrafos anteriores, la ingesta de alimentos también está regulada por un componente hedónico. Para evidenciar si este componente hedónico presenta variaciones diarias independientemente del estado metabólico, es necesario ofrecer una recompensa con un mayor valor intrínseco a distintos horarios del día. Asimismo, para evaluar si esta característica se mantiene en el envejecimiento, a pesar de las diferencias en los requerimientos energéticos encontradas previamente, es necesario establecer comparaciones adecuadas entre animales jóvenes y viejos. Para satisfacer estos objetivos, en el presente experimento se evaluó la motivación en ratones jóvenes y viejos alimentados *ad libitum* y alojados bajo un ciclo LD 12:12, utilizando como recompensa un alimento altamente apetitoso para los animales (*pellets* de 20 mg de chocolate). La evaluación comportamental en el protocolo de tasa progresiva (PR) se llevó a cabo en dos momentos: mitad del día (ZT6) y mitad de la noche (ZT18) (ver esquema en la **Figura I.4.8 A**).

El análisis estadístico de los índices motivacionales evidenció diferencias significativas en relación al horario de testeo (día vs noche) pero no así para la edad (jóvenes vs viejos) de los ratones, tal como se puede observar para las presiones totales de palanca (**Figura I.4.8 B**, factor Edad: $p=0.6380$, factor Horario: $p<0.0001$, Interacción: $p=0.0633$, ANOVA a dos vías), las recompensas obtenidas (**Figura I.4.8 C**, factor Edad: $p=0.0791$, factor Horario: $p<0.0001$, Interacción: $p=0.0444$, ANOVA a dos vías), y el *breaking point* (**Figura I.4.8 D**, factor Edad: $p=0.4180$, factor Horario: $p<0.0001$, Interacción: $p=0.0665$, ANOVA a dos vías). Para todos los índices, se observó una diferencia día-noche en la motivación por obtener la recompensa de chocolate tanto en los ratones jóvenes como en los viejos, tal como se observa en los análisis *post hoc* (Presiones: día vs noche: $p=0.0185$ para jóvenes y $p<0.0001$ para viejos; Recompensas: día vs noche: $p=0.0172$ para jóvenes y $p<0.0001$ para viejos; *Breaking point*: día vs. Noche: $p=0.0361$ para jóvenes y $p<0.0001$ para viejos; ANOVA a dos vías seguido de post test de Bonferroni). Como se observó en los experimentos previos, los niveles motivacionales fueron mayores durante la mitad de la noche (ZT18) en comparación con la mitad del día (ZT6). Asimismo, estos resultados demostraron que la variación día-noche en la motivación por una recompensa apetitosa se

mantiene en el envejecimiento con independencia de las distintas demandas energéticas asociadas con la edad.

Figura I.4.8. La diferencia día-noche en la motivación persiste en animales alimentados *ad libitum* y con chocolate como recompensa. (A) Ratones jóvenes (3-4 meses) y viejos (<18 meses) bajo un ciclo luz/oscuridad (LD) 12:12 y con comida *ad libitum* fueron evaluados en el protocolo de tasa progresiva (PR) a: ZT6 (mitad del día) y a ZT18 (mitad de la noche). Los animales recibieron pellets de chocolate como recompensa. Ambos grupos mostraron una mayor motivación por obtener la recompensa durante los horarios nocturnos, tal como se puede observar en **(B)** el número total de presiones de palanca (factor Edad: p=0.6380, factor Horario: p<0.0001, ANOVA a dos vías), **(C)** el número total de recompensas obtenidas (factor Edad: p=0.0791, factor Horario: p<0.0001, ANOVA a dos vías) y **(D)** el *breaking point* (factor Edad: p=0.4180, factor Horario: p<0.0001, ANOVA a dos vías). Los datos se expresan como la media ± SEM (Jóvenes: N=15 para Día y N=21 para Noche LD; Viejos: N=16 para Día y N=15 para Noche). Comparaciones *post hoc* para presiones, recompensas y *breaking point*: *p<0.05 para Jóvenes Día vs Noche, ***p<0.001 para Viejos Día vs Noche. Post test de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Al analizar la dinámica de la respuesta de los ratones jóvenes y los viejos, lo que primero capta la atención es la disminución en la frecuencia de presiones, principalmente durante el horario nocturno (**Figura I.4.9 A**). En ambos casos, la frecuencia de la respuesta durante la noche (ZT18) es baja, pero se mantiene relativamente constante. En los horarios diurnos (ZT6), se puede evidenciar un leve decaimiento y cese de la respuesta hacia el final de la sesión de motivación (más evidente en los ratones viejos). La cuantificación de esta respuesta, como el área bajo la curva de las distribuciones de frecuencias, evidenció una diferencia significativa en el horario de testeo, así como también, para los intervalos de tiempo en los que se subdividieron los datos (**Figura I.4.9 B**, factor Horario: $p<0.0001$, factor Intervalos de tiempo: $p=0.0211$, Interacción: $p=0.9479$, ANOVA a dos vías). El análisis *post hoc* de comparaciones múltiples sólo evidenció diferencias significativas día-noche dentro de los datos del grupo de ratones viejos para los últimos dos intervalos de tiempo, que se atribuyen a la disminución en la frecuencia de presiones de los ratones evaluados en el día (viejos Día vs Noche: $p=0.0141$ para 40-80 min, y $p=0.0090$ para 80-120 min, post test de Bonferroni). Esto indicó que el efecto del horario de testeo es significativo para el conjunto de datos, siendo la frecuencia de presiones de palanca realizas en la noche mayores a las del día, pero no es lo suficientemente grande como para evidenciarse en las comparaciones múltiples dentro de cada uno de los intervalos de tiempo elegidos.

Por otro lado, las curvas de persistencia en la tarea comportamental mostraron la misma tendencia (**Figura I.4.9 C**, $p<0.0001$, test de Mantel-Cox). Tanto para los ratones jóvenes como viejos se evidenció una clara diferencia día-noche ($p=0.0025$ para jóvenes día vs noche, $p<0.0001$ para viejos día vs noche, test de Mantel-Cox con corrección de Bonferroni), siendo la mitad de ratones testeados durante el día los que abandonan la tarea antes en comparación a los de la noche (medianas de supervivencia: 47.7 min para viejos Día, 89.4 min para jóvenes Día, 116.7 min para jóvenes Noche, y 117.4 min para viejos Noche). A pesar de observarse una tendencia respecto a que las curvas de persistencia para el día podrían ser distintas entre los ratones jóvenes y los viejos, no se observaron diferencias significativas ($p=0.0380$ para jóvenes Día vs viejos Día, pero resulta no significativo dado que el nuevo valor de alpha, corregido por el número de comparaciones múltiples, es $\alpha = 0.0083$ y, por lo tanto, el valor de p no es menor al de alpha).

Figura I.4.9. Dinámica de la respuesta motivacional en ratones jóvenes y viejos alimentados *ad libitum* con chocolate como recompensa. (A) Distribución de la frecuencia de presiones de palanca realizadas durante la sesión de motivación para ratones jóvenes y viejos bajo un ciclo LD 12:12 con comida *ad libitum*. Los animales fueron testeados a mitad del día (ZT6) o la noche (ZT18) y se les ofreció un pellet de chocolate como recompensa por apretar la palanca en la tarea de motivación. Las líneas verticales punteadas denotan los intervalos de tiempo (de 40 min) en los que se dividió los datos para su cuantificación posterior. **(B)** Área bajo la curva de la distribución de frecuencia de presiones para los tres intervalos de tiempo elegidos (factor Edad: $p<0.0001$, factor Intervalo de tiempo: 0.0211, ANOVA a dos vías). **(C)** Porcentaje de animales que persisten en la tarea en función del tiempo que dura la sesión de motivación ($p<0.0001$, test de Mantel-Cox). Cada punto graficado representa la última presión de palanca realizada por un ratón antes de abandonar la tarea. Los datos en (A) se encuentran expresados como la media de la frecuencia, los datos en (B) se expresan como la media ± SEM (Jóvenes: N=15 para Día y N=21 para Noche; Viejos: N=16 para Día y N=15 para Noche). Comparaciones *post hoc* para el <u>área bajo la curva</u>: intervalo de 40-80 min: *$p<0.05$ para Viejos Día vs Noche; intervalo 80-120 min: **$p<0.01$ para Viejos Día vs Noche. Comparaciones *post hoc* para el <u>porcentaje de persistencia</u>: ***$p<0.001$ para Viejos Día vs Noche, *$p<0.05$ para Jóvenes Día vs Noche. Post test de Tukey para comparaciones múltiples y comparaciones de a pares para test de Mantel-Cox con corrección de Bonferroni (α corregido=0.0083).

En conjunto, estos resultados corroboraron las variaciones día-noche observadas en los experimentos previos en los que se aplicó una restricción calórica. Asimismo, en ratones sin un déficit energético y al usar *pellets* de chocolate como recompensa se activan las vías de los componentes hedónicos en el circuito de recompensa. En consecuencia, estos resultados demuestran que la diferencia diaria en la motivación no solo se ve influenciada por los déficits nutricionales, sino que también persiste en animales jóvenes y viejos alimentados *ad libitum* cuando se utiliza comida apetecible como recompensa, por consiguiente, los componentes hedónicos de la motivación también presentan una variación diaria.

I.5 Discusión

La finalidad de los experimentos en este capítulo fue evidenciar si el comportamiento de motivación por obtener una recompensa de comida presentaba una variación a lo largo del día y, a su vez, determinar si esta variación era endógena, es decir, se encontraba bajo regulación del sistema circadiano. En la literatura, se pueden encontrar una gran cantidad de experimentos que tratan de demostrar que determinados comportamientos o procesos fisiológicos presentan variaciones a lo largo del día. Sin embargo, la mayoría de ellos sólo toma las mediciones pertinentes bajo un ciclo de luz/oscuridad. Aunque la alternancia cíclica entre la luz y la oscuridad constituye el ciclo natural presente en la naturaleza, no es suficiente para sugerir que una conducta o variable está regulada por el reloj biológico y representa un ritmo circadiano. Asumir esto es desestimar, en efecto, los criterios principales que definen un ritmo circadiano como tal:

1. Que la variable sea capaz de ser sincronizada por un *zeitgeber* o sincronizador ambiental.
2. Que la variable posea un comportamiento rítmico en ausencia de sincronizadores ambientales, condición en la cual los ritmos circadianos oscilan en libre curso con la periodicidad endógena dictada por el oscilador biológico.

Estos dos criterios hacen referencia a dos términos muy utilizados en la Cronobiología que definen las propiedades de un oscilador biológico circadiano: la sincronización y el entrenamiento (*entrainment*). A pesar de que en la Introducción General de esta tesis ya hemos enunciado estos conceptos, es relevante volver a traerlos aquí para discutir la finalidad de los experimentos presentados en este capítulo. Bittman (2021) discute muy acertadamente sobre la diferencia en el significado cronobiológico de estos términos y cómo, muchas veces, su aplicación en la literatura es errónea. En su publicación, define al entrenamiento como un término que se utiliza para describir situaciones en las que dos o más osciladores coinciden en el período (e inevitablemente, en la fase). Por otro lado, define a la sincronización como “dos eventos que ocurren al mismo tiempo, que coinciden en un punto en el tiempo y son simultáneos”. La diferencia clave entre estas definiciones es que el entrenamiento requiere la presencia de osciladores mientras que la sincronización no. Dos eventos pueden estar sincronizados entre sí, ocurrir al mismo tiempo, pero no estar controlados por un oscilador. Para ilustrarlo de manera sencilla, muchas de las luces de la calle se apagan cuando sale el sol y se prenden cuando éste se oculta en el horizonte, debido a que tienen una fotocélula para censar la cantidad de luz. Podría

decirse que estas luces están sincronizadas con el ciclo de luz/oscuridad externo, pero no están entrenadas. Esta respuesta oscilatoria es un mecanismo pasivo a la presencia o ausencia de luz, pero no tiene la capacidad de oscilar en condiciones constantes porque no depende de un mecanismo endógeno dictado por un oscilador. En este sentido, pueden existir comportamientos y procesos fisiológicos que estén sincronizados con el ciclo de luz/oscuridad (u otro *zeitgeber*) y varíen a lo largo del día, pero que no tengan un oscilador endógeno que guíe su ritmicidad intrínseca en ausencia del agente sincronizador. De hecho, cuando observamos este tipo de sucesos estamos evidenciando un claro ejemplo de enmascaramiento (*masking*). En el enmascaramiento, la periodicidad de un comportamiento o evento fisiológico es una respuesta pasiva a un estímulo ambiental recurrente. Por ejemplo, los ratones *knockout* del gen circadiano *per2* (ratones *per2-/-*), que no tienen un reloj biológico funcional y son arrítmicos en condiciones de oscuridad constante, muestran ritmos diarios en la actividad locomotora con una periodicidad de 24 horas cuando son expuestos a un ciclo de luz/oscuridad 12:12 [Feillet et al., 2006]. En este ejemplo, la sincronicidad de los patrones de actividad locomotora con el ciclo ambiental ocurre por un proceso de enmascaramiento (es decir, la luz impactando directamente sobre la actividad locomotora y modulando su salida) pero no hay un oscilador funcional involucrado en el proceso, razón por la cual en condiciones de libre curso el comportamiento no es rítmico. Asimismo, como se explicó con mayor detalle en la Introducción General, se puede diferenciar entre el enmascaramiento positivo y el negativo, según la dirección del efecto causada por el estímulo "enmascarador" sobre la variable rítmica: un aumento o una disminución, respectivamente [Mrosovsky, 1999].

Retomando los experimentos que competen a este capítulo, nuestro objetivo fue no sólo demostrar que la motivación por una recompensa natural tiene un patrón rítmico diario, sino que, además, está bajo regulación del sistema circadiano. Para ello, y teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, es necesario no sólo testear el comportamiento en diferentes horarios bajo un ciclo ambiental natural (LD 12:12) sino que también es necesario hacerlo en ausencia de agentes sincronizadores, tal como ocurre en condiciones de oscuridad constante (DD), para evidenciar la endogeneidad del patrón cíclico.

I.5.1. Existe un ritmo diario en la motivación por una recompensa de comida

En el primer experimento, el objetivo fue determinar si efectivamente existía un ritmo diario en el comportamiento motivado medido a través del paradigma de tasa progresiva - que como vimos en la Introducción General, es el patrón de referencia o "*gold standard*" para medir la motivación en roedores. Para ello, evaluamos distintos ratones, alojados bajo un ciclo LD 12:12, en seis puntos horarios (ZTs) a lo largo del ciclo: tres en la fase diurna y otros tres en la fase nocturna. Los resultados mostraron una evidente variación diaria en la motivación por una recompensa de comida, con mayores niveles motivacionales durante la noche en comparación con el día (**Figura I.4.1**). Asimismo, el análisis de la dinámica de las presiones a lo largo de la sesión de motivación permitió identificar algunos patrones generales en la respuesta. Cuando los animales son evaluados en la fase nocturna, se observa una máxima respuesta (pico) cercano al inicio de la prueba comportamental que va disminuyendo conforme pasa el tiempo (**Figura I.4.2**). Este patrón de respuesta es similar al observado en las respuestas de extinción. En las pruebas de extinción, un comportamiento que anteriormente era recompensado deja de serlo. En consecuencia, se evalúa la flexibilidad cognitiva del animal para extinguir la respuesta que previamente le proporcionaba la recompensa pero que ahora ha sido eliminada. Antes de extinguir la respuesta, los animales suelen mostrar un aumento muy significativo en la misma hasta que se establece la nueva asociación cognitiva. A pesar de que la prueba de PR no es un test de extinción propiamente dicho, su diseño podría asemejarse. Durante los primeros minutos de la sesión, los animales consiguen las recompensas con mayor frecuencia, es decir, un mínimo esfuerzo (presiones) es requerido para completar los primeros *trials* y obtener las recompensas. Conforme los animales completan estos *trials* iniciales, la cantidad de presiones que deben realizar es cada vez mayor, por consiguiente, la frecuencia de recompensas disminuye drásticamente. Sin embargo, los animales evaluados en el protocolo de PR en los horarios nocturnos no extinguen completamente la respuesta, en parte porque (aunque con menor frecuencia) el comportamiento sigue siendo recompensado, y en otra parte porque es la fase de su ciclo en la que están altamente motivados a trabajar por la comida. Esto último, podría hacer referencia al "vigor" motivacional, es decir, la intensidad con la que el individuo se compromete a realizar un esfuerzo para alcanzar una meta u objetivo. El vigor motivacional está estrechamente

relacionado con la motivación intrínseca (incentiva), instrumental (en la cual se debe realizar una acción para obtener la recompensa) y con el componente activacional de la motivación. En resumen, evidenciar este tipo de patrones y la intensidad con la que se manifiesta el comportamiento resulta interesante para descartar posibles efectos en la respuesta observada que no necesariamente involucran la motivación. Esto significa que, la existencia de un patrón similar a la extinción de la respuesta nos habla de una flexibilidad cognitiva y de un aprendizaje asociativo durante la tarea, que es típico del circuito de procesamiento de la información en el sistema de recompensa (ver sección 2.2 de la Introducción General). Por consiguiente, sugiere que se podría descartar que la respuesta observada en los animales se deba simplemente a un comportamiento repetitivo por habituación [Wright & Wiediger, 2007] o de tipo ansioso.

Continuando con el análisis de los resultados de la dinámica de la respuesta (**Figura I.4.2**), y en contraposición a lo antes observado, los ratones evaluados durante los horarios de día mostraron un patrón de respuesta con una muy baja frecuencia de presiones, pero sostenido hasta casi los 80 minutos de iniciada la sesión. Esta respuesta luego se extingue casi por completo antes de que finalice la prueba comportamental. Se podría decir que estos ratones realizan el mínimo esfuerzo requerido para obtener algunas recompensas, pero que cuando la prueba requiere que se realice un esfuerzo mayor, abandonan la tarea. En este sentido, el vigor motivacional de estos animales podría decirse es bajo. Y aquí, es importante mencionar que tantos los ratones testeados en el día como los de la noche, están restringidos calóricamente. Los dos grupos presentan el mismo déficit energético que podría incrementar los niveles motivacionales por obtener comida en ambos casos (dado que, como ya vimos, el sistema de recompensa está en estrecha relación con las señales homeostáticas del organismo). Sin embargo, el vigor y los niveles motivacionales de los ratones evaluados en el día son comparativamente inferiores a la noche.

Se podría pensar también que los resultados obtenidos tienen sentido si tenemos en cuenta que la cepa de ratones utilizada tiene una naturaleza nocturna, por lo que están activos de noche y descansan durante el día. Es lógico, desde un punto de vista etológico, que la mayor motivación por la búsqueda y el consumo de comida sea coincidente con la fase de actividad. Siguiendo esta lógica, se podría deducir que los bajos niveles motivaciones durante el día son una

consecuencia de que los animales están poco activos, porque es el momento en donde deberían estar descansando. Sin embargo, todos los ratones evaluados durante el día (así como los de la noche) pasan por un proceso de entrenamiento de 4 días consecutivos. Durante este entrenamiento, la etapa de condicionamiento operante es en donde ocurre la asociación presión-recompensa. Esto requiere un compromiso activo por parte del ratón para que el aprendizaje asociativo ocurra. Todos aquellos animales que no aprendieron o no presionaron activamente la palanca son descartados del testeo de la motivación. Además, cabe mencionar que las jaulas de entrenamiento están diseñadas para que los animales no puedan descansar en ellas (el piso está hecho de barras de mental lo suficientemente separadas para que los animales tengan que mantenerse en pie). Asimismo, el simple hecho de sacar al animal de su jaula individual y situarlo dentro de un entorno distinto, produce un aumento en los niveles exploratorios y en la actividad. Por lo que, a partir de esto, podríamos inferir que la baja respuesta de los animales durante el día tampoco se debe al simple hecho de que no se encuentran "lo suficientemente despiertos".

Habiendo expuesto lo anterior, podríamos hipotetizar cuatro posibles situaciones que nos permitan explicar las diferencias día-noche en la respuesta motivacional observada: 1) que el metabolismo del organismo no se encuentre en su momento de máxima actividad, dado que las funciones metabólicas se encuentran reguladas por el sistema circadiano y, en consecuencia, los animales "no consideren necesario" consumir alimentos en ese momento a pesar del déficit calórico; 2) que la respuesta esté puramente regulada por el sistema de recompensa, cuya menor o mayor activación podría estar modulada circadianamente (dado que ya existen evidencias de circuitos neuronales que podrían modular circadianamente la motivación); 3) una combinación de las dos opciones anteriores, en cuyo caso, el sistema circadiano está involucrado en ambas; o 4) que la presencia de luz durante la fase diurna tenga un efecto de enmascaramiento drástico sobre el comportamiento, disminuyendo sobremanera la respuesta motivacional de los ratones en el día respecto a la noche. En el caso de que alguna de las tres primeras situaciones sean las correctas, los resultados obtenidos revelarían que la respuesta observada no se limita únicamente a la presencia de una recompensa (estímulo exógeno) y la necesidad de satisfacer un déficit energético (homeostasis), sino que indicarían que existe un componente interno (endógeno) que regula de manera diferencial la motivación entre el día y la noche. Por otro lado, si la cuarta

situación propuesta resultara ser la acertada, no estaríamos evidenciando un mecanismo endógeno para regular la motivación, sino simplemente ante un efecto de las condiciones de iluminación que inhiben el comportamiento de un roedor nocturno. Por esta razón, en el segundo experimento de este capítulo, se buscó esclarecer si efectivamente existe dicho mecanismo endógeno circadiano que influiría en la respuesta diferencial de la motivación, o si, por el contrario, estamos observando un efecto de enmascaramiento causado por la luz. Posteriormente, en el tercer experimento, nos propusimos clarificar si la variación en la respuesta motivacional se debía a los ritmos metabólicos y de ingesta, o si se trataba, de hecho, de una auténtica modulación circadiana en el circuito de recompensa.

I.5.2. Las variaciones diarias en la motivación por una recompensa de comida tienen carácter endógeno y persisten en el envejecimiento

En el segundo experimento, el objetivo principal fue determinar si la variación diaria en la motivación por una recompensa se mantenía en condiciones de oscuridad constante y, por consiguiente, dilucidar si presentaba una naturaleza endógena circadiana. Asimismo, se consideró incluir en el experimento un grupo de ratones viejos (1.5 años) con el objetivo de evidenciar si el ritmo diario y endógeno de motivación por comida se mantenía en el envejecimiento. Los grupos de ratones jóvenes y viejos fueron sometidos a condiciones de oscuridad constante o a un ciclo LD 12:12, y fueron evaluados en dos puntos horarios: mitad del día (LD) o día subjetivo (DD), y mitad de la noche (LD) o noche subjetiva (DD).

En el diseño de estos experimentos se planificó poder evaluar de manera conjunta todos los parámetros involucrados (edad, ciclo y horario de testeo/fase) para poder establecer comparaciones apropiadamente. Es por ello que los resultados de los índices de motivación fueron analizados mediante un modelo lineal que se construyó para entender el comportamiento de los datos en función de la edad interactuando con el ciclo y la fase. Los resultados de este modelo indicaron un efecto significativo del horario de testeo en el comportamiento (**Tabla I.4.3**). Los ratones jóvenes en condiciones de LD mostraron nuevamente la diferencia día-noche evidenciada en el experimento anterior (**Figura I.4.4 B, C y D**). Bajo condiciones constantes (DD)

esta variación se mantuvo mostrando mayores niveles motivacionales durante la noche subjetiva. Asimismo, los ratones viejos mostraron resultados similares: una variación diaria en los niveles motivacionales tanto en LD como en DD (**Figura I.4.4 E, F y G**), con mayores valores durante la noche y la noche subjetiva, respectivamente.

Sorprendentemente, la ritmicidad diaria y endógena se mantuvo en el envejecimiento, tal como confirmaron los resultados del modelo, siendo el factor edad no significativo para ninguno de los índices motivacionales medidos. En otras palabras, los niveles motivacionales entre los ratones jóvenes y viejos son similares. En la literatura se pueden encontrar numerosos trabajos que sugieren que el envejecimiento es un proceso que involucra diversos cambios a nivel fisiológicos y bioquímico en el cerebro. Como consecuencia de estas alteraciones, podemos explicar los cambios en el comportamiento y la cognición que se suelen observar en la vejez. Mientras que varios estudios han encontrado que el envejecimiento implica un declive cognitivo general, así como cambios en la robustez, estabilidad y amplitud de los ritmos circadianos, el efecto de este proceso en las conductas hedónicas y motivadas no está todavía comprendido en su totalidad [Valentinuzzi et al., 1997; Bishop & Yankner, 2010; Nakamura et al., 2011]. Los experimentos aquí realizados aportan nuevas evidencias mostrando que las variaciones diarias y endógenas en la motivación por una recompensa de comida se preservan en ratones envejecidos. Asimismo, estos resultados resaltan la importancia del sistema de recompensa para la supervivencia a lo largo de la vida.

Por otro lado, el modelo también reveló un efecto significativo del ciclo ambiental sobre el comportamiento de motivación. Esto es: los niveles motivacionales son distintos dependiendo de si los ratones (tanto jóvenes como viejos) son evaluados bajo un ciclo normal de luz/oscuridad o bajo condiciones de oscuridad constante. En particular, se encontró que el ciclo LD causa una disminución generalizada en la motivación en ambas fases testeadas (día y noche). Aún más, el modelo mostró una interacción significativa entre el ciclo y la fase, lo que llevó a determinar que el efecto de la alternancia del ciclo de luz/oscuridad ejerce una consecuencia más drástica aún en la motivación evaluada durante el día. En otras palabras, los niveles motivacionales de los ratones durante el día se ven aún más disminuidos cuando los animales están bajo un ciclo LD, en comparación a los niveles de motivación de los animales en el día subjetivo del DD.

El efecto de la luz afectando en mayor medida a la motivación en el día del LD es un aspecto interesante a analizar. Otros estudios previos han indicado que la luz es capaz de afectar los estados de ánimo, las emociones y la capacidad cognitiva al impactar directamente en el sistema de recompensa por una vía neuronal independiente del reloj biológico [LeGates et al., 2012; Fernández et al., 2018]. En estos trabajos se demuestra que la luz ingresa a través de una subpoblación de células ganglionares de la retina (ipRGCs, el mismo tipo de células de la retina que llevan la información lumínica a los NSQ), y que por medio de esta vía llega a una región cerebral talámica, el núcleo perihabenular (PHb), que tiene salidas neuronales directas hacia las cortezas prefrontales y prelímbicas, el estriado dorsomedial y el núcleo accumbens (como ya se mencionó en la Introducción General, todas estas estructuras forman parte del circuito cortico-límbico del sistema de recompensa). Utilizando un modelo de depresión y disrupción cognitiva causado por ciclos anormales de luz/oscuridad, los autores demuestran que los ratones que tienen una ablación en el circuito neuronal ipRGC-PHb no presentan características depresivas ni anhedonias. Los autores concluyen entonces, que se requiere de este circuito para mediar los efectos de la luz en las emociones y los comportamientos motivados, en contextos en donde la luz tiene consecuencias nocivas (por ejemplo, la luz durante la noche). En consecuencia, estos trabajos sugieren que la luz puede impactar por una vía neuronal directa (e independiente del reloj central en los NSQ) para regular los circuitos implicados en los comportamientos recompensados y las emociones. Los resultados del presente capítulo aportan nueva información a esta hipótesis, mostrando que la luz no sólo tendría un efecto negativo sobre el circuito de recompensa en contextos de ciclos de iluminación anormales, sino que también, podría afectar el comportamiento motivado y la regulación emocional bajo un ciclo natural de luz/oscuridad. En este sentido, parte de los fenómenos observados en este capítulo podrían ser explicados por la existencia de este circuito neuronal directo. Podríamos hipotetizar que, aunque la variación diaria en la motivación está modulada por el reloj circadiano, también podría ser afectada por la presencia de la luz ambiental de manera aguda, disminuyendo aún más los niveles motivaciones durante el día (efecto que, por el contrario, no se observa en el día subjetivo del DD). Bajo esta hipótesis, tanto el reloj circadiano endógeno como las condiciones de iluminación podrían tener un efecto sinérgico modulando la motivación.

Por otro lado, el análisis de la dinámica de la respuesta de los ratones durante la sesión de motivación, nos brinda información adicional del comportamiento. Al analizar el patrón de presiones de los animales jóvenes a lo largo del tiempo (**Figura I.4.5**), la frecuencia de las presiones tanto para el día como la noche del LD tiene un patrón similar al observado en el experimento previo. Durante la noche, los animales tienen una respuesta de tipo curva de extinción mientras que, en el día, la frecuencia es mucho menor y los ratones tienden a abandonar la tarea antes de finalizada la sesión. En condiciones de DD, durante la noche subjetiva, los ratones presentan una frecuencia alta y constante a lo largo de toda la sesión de motivación. Parecería que los animales tienen un alto vigor motivacional o una alta tolerancia a la disminución en la frecuencia a la que obtienen las recompensas. De la misma manera, los animales evaluados en el día subjetivo del DD, muestran una tendencia hacia una mayor frecuencia de presiones y persistencia en la tarea en comparación con los ratones evaluados en el día del LD. En conjunto, en los patrones de respuesta de los ratones jóvenes estamos evidenciando, de manera visualmente más directa, el efecto del ciclo sobre la respuesta motivacional. Vemos cómo las condiciones de oscuridad constante tienen ese efecto "desinhibitorio" sobre la motivación global, y cómo la respuesta bajo un ciclo LD se ve afectada, principalmente en el día.

En el análisis de la dinámica de la respuesta en los ratones viejos (**Figura I.4.6**) el efecto del ciclo LD en la disminución global de los niveles motivacionales es mucho más evidente. Los animales evaluados en la noche (ZT18) muestran una frecuencia de presiones baja y constante, mientras que las presiones en el día (ZT6) caen drásticamente con los animales abandonando la tarea por completo casi 40 minutos antes de que finalice la sesión de motivación. Esto parecería lógico si tenemos en cuenta que, en general, los niveles de actividad de los ratones disminuyen con el envejecimiento [Valentinuzzi et al., 1997], y si pensáramos que esta menor actividad general podría ser un factor influyente al presionar la palanca. Sin embargo, la respuesta de los ratones viejos bajo condiciones de DD (en donde el vigor, la persistencia y los niveles motivacionales son mayores) deja en evidencia nuevamente que esto se deba probablemente al efecto negativo en la motivación del ciclo LD. A simple vista, los animales envejecidos parecerían verse particularmente más afectados por la influencia del ciclo que los jóvenes.

Esta observación final del párrafo anterior, podría tener un abordaje por la interacción significativa que se observó entre los factores Edad y Ciclo. Cabe aclarar que en el modelo lineal se analizaron los datos de los indicadores de los niveles motivacionales (presiones, recompensas y *breaking point*) y no los resultados de la dinámica de la respuesta. Sin embargo, los gráficos de la distribución de frecuencias permiten visualizar de manera más simple lo que se va a exponer a continuación. El modelo sugiere que el factor edad no explica la variabilidad observada en los datos mientras que el factor ciclo sí. En otras palabras, la edad de los animales no tiene un efecto sobre los índices motivacionales mientras que el ciclo al que los animales están expuestos sí influye, con el ciclo LD afectando negativamente la motivación global tanto en ratones jóvenes como viejos. Sin embargo, lo que revela la significancia de la interacción es que el efecto del ciclo es distinto según la edad de los animales. La edad modifica cómo el ciclo afecta las variables de estudio. En este sentido, los gráficos de distribución de la frecuencia de presiones ilustran de manera más evidente este efecto diferencial. Si vemos el patrón de respuesta en la noche del LD, los ratones jóvenes muestran una alta respuesta con un pico al inicio de la sesión, mientras que los ratones viejos presentan una frecuencia más baja pero constante. En el día del LD, la respuesta de los ratones viejos se ve aún más afectada que en los jóvenes. Bajo condiciones de DD, durante la noche subjetiva, los ratones jóvenes mantienen una respuesta alta y constante a lo largo de toda la sesión, mientras que los viejos incrementan la frecuencia con un pico al principio de la sesión. Independientemente de la forma del patrón de respuesta, en general, mientras que en los ratones jóvenes la respuesta bajo ambos ciclos es siempre alta durante la noche, en los ratones viejos el ciclo de luz/oscuridad afecta en mayor medida su motivación nocturna (observación que también se puede apreciar comparando los valores medios para los índices motivacionales en la Figura 4.2.2). El porqué de este efecto diferencial del ciclo según la edad no puede ser explicado con los experimentos aquí realizados. Podría hipotetizarse que quizás la vía neuronal que lleva información directa de la luz ambiental hacia el circuito de recompensa se vea alterada en los ratones envejecidos y genere una mayor sensibilidad a los efectos de la luz en estos animales. Es decir, que se observe una especie de efecto de enmascaramiento negativo por luz sobre la respuesta motivacional global dependiente de la edad. De todas formas, para probar si estas hipótesis son ciertas será necesario realizar experimentos adicionales en el futuro.

En resumen, en el presente experimento pudimos demostrar que la variación diaria en la motivación por comida es de carácter endógeno y se mantiene en el envejecimiento. Adicionalmente, evidenciamos un efecto de los ciclos ambientales en la motivación, con el ciclo de luz/oscuridad influenciando de manera significativa en la respuesta motivacional en general, y particularmente, ejerciendo un mayor impacto negativo en la motivación durante el día.

Es necesario mencionar una posible limitación del presente experimento. Particularmente bajo condiciones de oscuridad constante, hubiese sido ideal poder evaluar la motivación en múltiples horarios durante la fase diurna y nocturna, y a lo largo de varios días sucesivos, para evidenciar cómo el ritmo motivacional ajusta su fase en función de la periodicidad endógena de los animales. Como el período en libre curso de esta cepa de ratones es menor a 24 horas, el ritmo de motivación "se iría corriendo" ajustándose a los días y noche subjetivos, y se podría evidenciar el entrenamiento (*entrainment*) del ritmo con el ciclo LD previo – característica que, como vimos, define a un ritmo circadiano. Sin embargo, un experimento de tal magnitud requiere de una gran cantidad de animales, dado que para cada punto horario y para cada día de testeo se necesitan diferentes cohortes de ratones para evitar que los animales desarrollen un comportamiento de habituación en la tarea de PR [Rossi & Yin, 2012]. Sin embargo, aunque la medición en solo dos puntos horarios no nos permite confirmar el *entrainment* ni hablar de un ritmo circadiano en la motivación propiamente dicho, nos brinda la oportunidad de observar la sincronización entre la motivación y el ciclo de luz/oscuridad (motivación baja/alta coincidente con día/noche en una especie nocturna). Además, nos permite descartar la posibilidad de que la variación diaria sea simplemente una respuesta pasiva a un estímulo ambiental ya que, en ausencia del estímulo ambiental, los niveles diferenciales en la motivación se mantienen.

I.5.3 Experimento 3: El componente hedónico de la alimentación presenta una variación diaria

La alimentación está influenciada por mecanismos tanto homeostáticos como hedónicos, y es un comportamiento altamente motivado. El consumo de alimentos satisface los déficits nutricionales del organismo necesarios para la supervivencia, y a la vez, el placer derivado de

comer, especialmente alimentos que son ricos en grasas y azúcares, puede impulsar el consumo más allá de lo que es necesario para la supervivencia. Como se expuso en la Introducción General de esta tesis, el sistema de recompensa integra las señales homeostáticas del organismo, y a la vez, controla los estados motivados y las emociones vinculadas con las recompensas naturales, como la comida. En conjunto, la interacción entre los mecanismos homeostáticos y hedónicos permite una regulación integral de la ingesta de alimentos.

Con el objetivo de evaluar si los componentes hedónicos de la motivación también podrían presentar una variación diaria en la tarea de tasa progresiva, se evaluaron ratones con requerimientos nutricionales satisfechos y se utilizó como recompensa un alimento con un mayor valor hedónico y altamente palatable, como el chocolate. Asimismo, con este experimento, nuestro objetivo fue descartar que los niveles diferenciales entre el día y la noche no sean una mera consecuencia de la regulación circadiana sobre el metabolismo. En los experimentos previos, los ratones evaluados tanto en el día como en la noche se encontraban restringidos calóricamente. Una de las hipótesis planteadas anteriormente respecto a los resultados obtenidos, tenía en cuenta la posibilidad de que la regulación circadiana de las hormonas, vías y procesos metabólicos del organismo "le estén indicando" al animal cuál es el momento apropiado para comer. Esto podría ser en parte cierto porque, como se mencionó, el sistema de recompensa recibe información de los centros encargados del control homeostático para modular la intensidad de las conductas motivadas. Sin embargo, la motivación está guiada también por un componente intrínseco y hedónico, que invita al individuo a involucrarse en llevar a cabo una determinada conducta por el simple hecho de obtener placer y satisfacción de ello. Nuestro interrogante, entonces, se centró también en dilucidar si este componente hedónico de la motivación por la comida seguía la variación diaria observada con independencia del control homeostático del organismo.

Para este experimento utilizamos ratones jóvenes y viejos bajo un ciclo LD 12:12, alimentados *ad libitum* durante todo el protocolo. Evaluamos su motivación por obtener un pellet de chocolate como recompensa a mitad del día (ZT6) y a mitad de la noche (ZT18). Nuestros resultados revelaron que la diferencia día-noche persiste independientemente de la edad de los ratones, tanto en jóvenes como viejos, sugiriendo que esta variación se conserva aún en el

envejecimiento (**Figura I.4.8**). Estos resultados están en concordancia con un estudio previo, en donde se demuestra que el aprendizaje asociativo (condicionamiento), la motivación y la preferencia de alimentos con altas propiedades hedónicas se mantienen intactas durante el envejecimiento en ratones [Harb, et al., 2014]. En uno de los experimentos, los autores realizan un test de preferencia por alimentos altamente palatables (agua azucarada y leche) en ratones jóvenes-adultos (6 meses) y viejos (13 meses) alimentados *ad libitum*. Los animales tenían libre acceso a estos alimentos líquidos isocalóricos por 24 horas. Es interesante notar que, durante las horas nocturnas, no se observan diferencias entre el consumo de estos alimentos entre ratones jóvenes y viejos, y ambos grupos mantienen una preferencia por consumir los alimentos ricos. Sin embargo, cuando comparan el consumo durante las horas diurnas, los animales jóvenes tienen un mayor consumo respecto a los viejos. A pesar de que el foco del estudio no es circadiano (y por eso los autores hacen caso omiso de este detalle) es interesante notar que, en el total, los mecanismos hedónicos que incitan el consumo de alimentos se mantienen intactos en ratones viejos, pero la respuesta es distinta según el momento del día en que se mida. De la misma forma, nuestros resultados evidencian esta respuesta conservada en el envejecimiento, pero dependiente del horario.

Otro trabajo previo [Bainier et al., 2017] muestra resultados concordantes con los obtenidos en el presente experimento, pero utilizando una metodología distinta. En este caso, los autores demuestran que ratones jóvenes alimentados *ad libitum* presentaban un ritmo diario (en LD) y endógeno (en DD) en la ingesta de sacarosa utilizando el paradigma de elección de dos botellas (o *two-bottle choice preference test*). En este test, se les ofrece a los animales dos botellas en sus jaulas, una con agua y otra con agua y sacarosa, y se mide luego el consumo en ambas. Realizando mediciones del consumo cada 6 horas a lo largo 24 hs, los autores demostraron que los animales tienen un mayor consumo y preferencia por la solución azucarada durante la fase nocturna. Adicionalmente, en este trabajo también se demuestra que este ritmo diario en la ingesta de sacarosa se ve abolido en ratones doble mutantes de los genes reloj *Per1* y *Per2*, lo que sugiere la necesidad de un reloj circadiano molecular funcional para evidenciar ritmos circadianos en los comportamientos alimentarios hedónicos. Nuestros resultados apoyan esta idea y, además, demuestran que, incluso en un paradigma conductual donde los animales deben

esforzarse para acceder al alimento con propiedades hedónicas, la modulación circadiana diaria persiste.

Es sabido que la composición corporal, la distribución y almacenamiento del tejido adiposo, los requerimientos metabólicos y energéticos, entre otros factores, no son los mismos entre animales jóvenes y viejos [Frutos et al., 2012]. Los resultados obtenidos en el presente capítulo mostraron que los ratones viejos presentan un mayor peso corporal y una menor ingesta diaria de alimento en comparación a los ratones jóvenes (**Figura 4.3.1**). Sin embargo, estas posibles demandas energéticas distintas, no afectaron la motivación de los animales por obtener una recompensa con un alto valor hedónico (y calórico). Aún más, dado que el factor edad no fue significativo, la respuesta motivacional en el día y en la noche es comparativamente la misma entre los ratones jóvenes y viejos. Una posible explicación a estos resultados, podría ser una regulación diferencial en la ingesta de calorías diarias según la edad. En este contexto, y en línea con nuestros resultados, Harb y colaboradores (2014) también encontraron que los ratones viejos tienen un mayor peso corporal, pero consumen menos calorías diarias en comparación con los jóvenes. Cuando se les ofrece libre acceso a alimentos isocalóricos además de su dieta regular, ambos grupos de animales consumen cantidades similares del alimento más apetecible. Sin embargo, los ratones jóvenes aumentan su consumo total de calorías diarias, mientras que los viejos lo mantienen estable. Esto se debe a que los ratones viejos reducen su consumo de la dieta regular para equilibrar su ingesta total de calorías diarias. En este sentido, en nuestros experimentos podría estar ocurriendo algo similar, y por ello, la motivación por obtener la recompensa de chocolate es independiente de la edad a pesar de los distintos requerimientos energéticos y la diferente cantidad diaria de alimento consumida. En nuestro caso, esto último sólo supone una posible hipótesis dado que las mediciones de consumo de comida se realizaron las semanas previas al entrenamiento en el protocolo de PR. Esto se debe a que consideramos pertinente evitar todo tipo de manipulaciones o perturbaciones en el ambiente de los ratones durante el entrenamiento. Sin embargo, en futuros experimentos se podría considerar la posibilidad de medir el consumo de comida balanceada regular de los animales durante el entrenamiento en el protocolo de motivación para dilucidar si lo antes expuesto aplica a nuestros resultados.

A pesar de que en el diseño de estos experimentos no se planificó comparar la motivación entre los animales restringidos calóricamente y los alimentados *ad libitum*, resulta evidente que el tipo de respuesta es diferente (por ejemplo, una simple comparación cualitativa entre las medias de presiones de palanca en el horario nocturno entre ratones restringidos, Figura I.4.4, y no restringidos, ver Figura I.4.8, permite observar rápidamente lo expuesto). Esto resulta coherente al considerar que existe un límite en la ingesta de calorías adicionales en animales ya saciados, manteniéndolos alejados de condiciones patológicas. Es quizás por ello que podemos evidenciar durante la fase de actividad (noche) de los animales, un patrón de respuesta con una frecuencia más baja pero constante en las presiones de la palanca para obtener la recompensa de chocolate (**Figura I.4.9**). Por otro lado, en rasgos generales, los patrones de respuesta motivacional en los horarios diurnos son similares en todas las condiciones evaluadas en este capítulo. Estos resultados, en conjunto, nos permiten hipotetizar dos cuestiones que están en concordancia con la literatura actual. Por un lado, que el estado de déficit calórico y nutricional (el hambre) influye directamente sobre el sistema de recompensa, aumentando el vigor, la persistencia y el impulso motivacional ("*motivational drive*") hacia la búsqueda de comida. Y, por otro lado, que en conjunto con la regulación de las señales homeostáticas del organismo, el sistema circadiano tiene una gran influencia al modular la respuesta motivacional según el momento del día y de acuerdo a la naturaleza etológica de la especie. En este sentido, la modulación circadiana del comportamiento de motivación es evidente y modula indefectiblemente el tipo de respuesta aún con independencia del estado nutricional de los animales.

I.5.4 Conclusiones del Capítulo I

Los comportamientos motivados son particularmente relevantes para el estudio de diversas patologías que afectan a la población humana. Asimismo, el sistema circadiano desempeña un rol esencial en el control y la compartimentalización temporal de procesos fisiológicos y conductas, garantizando así la máxima eficiencia del organismo en su interacción con el entorno y asegurando su supervivencia. Por lo tanto, creemos que los hallazgos aportados

en este capítulo realzan nuestra comprensión sobre la relevancia de considerar la ritmicidad de los comportamientos vinculados a la obtención de recompensas cuando se desarrollan tratamientos o se evalúan nuevas drogas terapéuticas para afrontar trastornos psiquiátricos, de adicciones y déficits de motivación.

En el presente capítulo, se presentaron evidencias de variaciones robustas a lo largo del día en la motivación por una recompensa de comida en ratones. Asimismo, se demostró que este ritmo diario se mantiene en condiciones de oscuridad constante, sugiriendo que esta variación en el comportamiento de motivación tiene un carácter endógeno regulado por el sistema circadiano. En todos los casos, los ratones mostraron una mayor motivación por la recompensa durante su fase activa (noche), coincidente con la naturaleza nocturna de la especie utilizada. Además, se evidenció que esta variación es independiente del estado nutricional (restricción calórica vs *ad libitum*) y del tipo de recompensa obtenida (*pellet* regular vs chocolate) sugiriendo que el componente hedónico de la motivación por comida también presenta una ritmicidad diaria. Finalmente, se demostró que las diferencias diarias y endógenas en la motivación por comida no se ven afectadas en el envejecimiento. En conjunto, estos resultados incorporan información novedosa sobre la modulación circadiana de los comportamientos relacionados con la obtención de recompensas naturales.

I.6 Referencias bibliográficas del Capítulo I

Abarca, C., Albrecht, U., & Spanagel, R. (2002). Cocaine sensitization and reward are under the influence of circadian genes and rhythm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(13), 9026-9030.

Abe, M., Herzog, E. D., Yamazaki, S., Straume, M., Tei, H., Sakaki, Y., ... & Block, G. D. (2002). Circadian rhythms in isolated brain regions. *Journal of Neuroscience*, *22*(1), 350-356.

Acosta, J., Bussi, I. L., Esquivel, M., Höcht, C., Golombek, D. A., & Agostino, P. V. (2020). Circadian modulation of motivation in mice. *Behavioural Brain Research*, *382*, 112471.

Acosta, J., Golombek, D.A., & Agostino, P.V. (2020). Circadian modulation of motivation-related behavior. *Sleep Science*. Special issue: Silva, A., & Torterolo, P. XV Latin-American Symposium on Chronobiology.

Agostino, P. V., Acosta, J., & Meck, W. H. (2017). Neurobiology of circadian and interval timing. *eLS*, 1-11.

Amir, S., Lamont, E. W., Robinson, B., & Stewart, J. (2004). A circadian rhythm in the expression of PERIOD2 protein reveals a novel SCN-controlled oscillator in the oval nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. *Journal of Neuroscience*, *24*(4), 781-790.

Aston-Jones, G., Smith, R. J., Moorman, D. E., & Richardson, K. A. (2009). Role of lateral hypothalamic orexin neurons in reward processing and addiction. *Neuropharmacology*, *56*, 112-121.

Bainier, C., Mateo, M., Felder-Schmittbuhl, M. P., & Mendoza, J. (2017). Circadian rhythms of hedonic drinking behavior in mice. *Neuroscience*, *349*, 229-238.

Becker-Krail, D. D., Walker, W. H., & Nelson, R. J. (2022). The ventral tegmental area and nucleus accumbens as circadian oscillators: implications for drug abuse and substance use disorders. *Frontiers in Physiology*, *13*, 886704.

Bishop, N. A., Lu, T., & Yankner, B. A. (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*, *464*(7288), 529-535.

Bittman, E. L. (2021). Entrainment is NOT synchronization: an important distinction and its implications. *Journal of biological rhythms*, *36*(2), 196-199.

Bussi, I. L., Levín, G., Golombek, D. A., & Agostino, P. V. (2014). Involvement of dopamine signaling in the circadian modulation of interval timing. *European Journal of Neuroscience*, *40*(1), 2299-2310.

Cohen, J. (1988) Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences, 2nd ed., Erlbaum, Hillsdale, NJ.

Core Team, R. C. T. R. (2013). R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for statistical computing, Vienna*.

Cutler, D. J., Haraura, M., Reed, H. E., Shen, S., Sheward, W. J., Morrison, C. F., ... & Piggins, H. D. (2003). The mouse VPAC2 receptor confers suprachiasmatic nuclei cellular rhythmicity and responsiveness to vasoactive intestinal polypeptide in vitro. *European Journal of Neuroscience*, *17*(2), 197-204.

DePoy, L. M., McClung, C. A., & Logan, R. W. (2017). Neural mechanisms of circadian regulation of natural and drug reward. *Neural plasticity*, *2017*.

Drew, M. R., Simpson, E. H., Kellendonk, C., Herzberg, W. G., Lipatova, O., Fairhurst, S., ... & Balsam, P. D. (2007). Transient overexpression of striatal D2 receptors impairs operant motivation and interval timing. *Journal of Neuroscience*, *27*(29), 7731-7739.

Dudley, T. E., DiNardo, L. A., & Glass, J. D. (1998). Endogenous regulation of serotonin release in the hamster suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neuroscience*, *18*(13), 5045-5052.

Feillet, C. A., Bainier, C., Mateo, M., Blancas-Velázquez, A., Salaberry, N. L., Ripperger, J. A., ... & Mendoza, J. (2017). Rev-erbα modulates the hypothalamic orexinergic system to influence pleasurable feeding behaviour in mice. *Addiction biology*, *22*(2), 411-422.

Feillet, C. A., Mendoza, J., Albrecht, U., Pévet, P., & Challet, E. (2008). Forebrain oscillators ticking with different clock hands. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *37*(2), 209-221.

Feillet, C. A., Ripperger, J. A., Magnone, M. C., Dulloo, A., Albrecht, U., & Challet, E. (2006). Lack of food anticipation in Per2 mutant mice. *Current Biology*, *16*(20), 2016-2022.

Fernandez, D. C., Fogerson, P. M., Ospri, L. L., Thomsen, M. B., Layne, R. M., Severin, D., ... & Hattar, S. (2018). Light affects mood and learning through distinct retina-brain pathways. *Cell*, *175*(1), 71-84.

Freyberg, Z., & Logan, R. W. (2018). The intertwined roles of circadian rhythmsand neuronal metabolism fueling drug reward and addiction. *Current opinion in physiology*, *5*, 80-89.

Frutos García-San, M., Pistell, P. J., Ingram, D. K., & Berthoud, H. R. (2012). Feed efficiency, food choice, and food reward behaviors in young and old Fischer rats. *Neurobiology of Aging*, *33*(1), 206-e41.

Golombek, D. A., & Rosenstein, R. E. (2010). Physiology of circadian entrainment. *Physiological reviews*, *90*(3), 1063-1102.

Guilding, C., Hughes, A. T. L., & Piggins, H. D. (2010). Circadian oscillators in the epithalamus. *Neuroscience*, *169*(4), 1630-1639.

Hampp, G., & Albrecht, U. (2008). The circadian clock and mood-related behavior. *Communicative & integrative biology*, *1*(1), 1-3.

Harb, M. R., Sousa, N., Zihl, J., & Almeida, O. F. (2014). Reward components of feeding behavior are preserved during mouse aging. *Frontiers in aging neuroscience*, *6*, 242.

Hood, S., Cassidy, P., Cossette, M. P., Weigl, Y., Verwey, M., Robinson, B., ... & Amir, S. (2010). Endogenous dopamine regulates the rhythm of expression of the clock protein PER2 in the rat dorsal striatum via daily activation of D2 dopamine receptors. *Journal of neuroscience*, *30*(42), 14046-14058.

Hothorn, T., Bretz, F., & Westfall, P. (2008). Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal: Journal of Mathematical Methods in Biosciences*, *50*(3), 346-363.

J. Pinheiro, B.D. DebRoy S, D. Sarkar, R Core Team. (2019). nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models, R package version 3.1-140.

Kawarai, T., Kawakami, H., Yamamura, Y., & Nakamura, S. (1997). Structure and organization of the gene encoding human dopamine transporter. *Gene*, *195*(1), 11-18.

Ketchesin, K. D., Becker-Krail, D. D., Xue, X., Wilson, R. S., Lam, T. T., Williams, K. R., ... & Logan, R. W. (2023). Differential Effects of Cocaine and Morphine on the Diurnal Regulation of the Mouse Nucleus Accumbens Proteome. *Journal of proteome research*, *22*(7), 2377-2390.

Lamont, E. W., Robinson, B., Stewart, J., & Amir, S. (2005). The central and basolateral nuclei of the amygdala exhibit opposite diurnal rhythms of expression of the clock protein Period2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(11), 4180-4184.

LeGates, T. A., Altimus, C. M., Wang, H., Lee, H. K., Yang, S., Zhao, H., ... & Hattar, S. (2012). Aberrant light directly impairs mood and learning through melanopsin-expressing neurons. *Nature*, *491*(7425), 594-598.

Luo, A. H., & Aston-Jones, G. (2009). Circuit projection from suprachiasmatic nucleus to ventral tegmental area: a novel circadian output pathway. *European Journal of Neuroscience*, *29*(4), 748-760.

Mendoza, J. (2017). Circadian neurons in the lateral habenula: clocking motivated behaviors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *162*, 55-61.

Morin, L. P. (2013). Neuroanatomy of the extended circadian rhythm system. *Experimental neurology*, *243*, 4-20.

Mrosovsky, N. (1999). Masking: history, definitions, and measurement. *Chronobiology international*, *16*(4), 415-429.

Nakamura, T. J., Nakamura, W., Yamazaki, S., Kudo, T., Cutler, T., Colwell, C. S., & Block, G. D. (2011). Age-related decline in circadian output. *Journal of Neuroscience*, *31*(28), 10201-10205.

Nakayama, K. (2002). Diurnal rhythm in extracellular levels of 5-hydroxyindoleacetic acid in the medial prefrontal cortex of freely moving rats: an in vivo microdialysis study. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *26*(7-8), 1383-1388.

Navarro, D. (2013). *Learning statistics with R: A tutorial for psychology students and other beginners: Version 0.5*. Adelaide, Australia: University of Adelaide.

Navarro, D. (2015). Learning statistics with R: A tutorial for psychology students and other beginners (version 0.6). *University of New South Wales*.

Ozburn, A. R., Falcon, E., Twaddle, A., Nugent, A. L., Gillman, A. G., Spencer, S. M., ... & McClung, C. A. (2015). Direct regulation of diurnal Drd3 expression and cocaine reward by NPAS2. *Biological psychiatry*, *77*(5), 425-433.

Parekh, P. K., & McClung, C. A. (2016). Circadian mechanisms underlying reward-related neurophysiology and synaptic plasticity. *Frontiers in psychiatry*, *6*, 174530.

R. Core Team, R: A Language and Enviroment for Statistical Computing, Available online at R Foundations for Statistical Computing: Vienna, Austria, (2019) https://www.R-project.org/.

Richardson, N. R., & Roberts, D. C. (1996). Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *Journal of neuroscience methods*, *66*(1), 1-11.

Rossi, M. A., & Yin, H. H. (2012). Methods for studying habitual behavior in mice. *Current protocols in neuroscience*, *60*(1), 8-29.

Sen, S., Dumont, S., Sage-Ciocca, D., Reibel, S., de Goede, P., Kalsbeek, A., & Challet, E. (2018). Expression of the clock gene Rev-erbα in the brain controls the circadian organisation of food intake and locomotor activity, but not daily variations of energy metabolism. *Journal of neuroendocrinology*, *30*(1), e12557.

Sleipness, E. P., Sorg, B. A., & Jansen, H. T. (2007). Diurnal differences in dopamine transporter and tyrosine hydroxylase levels in rat brain: dependence on the suprachiasmatic nucleus. *Brain research*, *1129*, 34-42.

Spanagel, R., Pendyala, G., Abarca, C., Zghoul, T., Sanchis-Segura, C., Magnone, M. C., ... & Albrecht, U. (2005). The clock gene Per2 influences the glutamatergic system and modulates alcohol consumption. *Nature medicine*, *11*(1), 35-42.

Takasu NN, Kurosawa G, Tokuda IT, Mochizuki A, Todo T, Nakamura W. Circadian regulation of food-anticipatory activity in molecular clock–deficient mice. PLoS One. 2012 Nov 7;7(11):e48892.

Ushijima, K., Koyanagi, S., Sato, Y., Ogata, T., Matsunaga, N., Fujimura, A., & Ohdo, S. (2012). Role of activating transcription factor-4 in 24-hour rhythm of serotonin transporter expression in the mouse midbrain. *Molecular pharmacology*, *82*(2), 264-270.

Valentinuzzi, V. S., Scarbrough, K., Takahashi, J. S., & Turek, F. W. (1997). Effects of aging on the circadian rhythm of wheel-running activity in C57BL/6 mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *273*(6), R1957-R1964.

Verwey, M., Khoja, Z., Stewart, J., & Amir, S. (2007). Differential regulation of the expression of Period2 protein in the limbic forebrain and dorsomedial hypothalamus by daily limited access to highly palatable food in food-deprived and free-fed rats. *Neuroscience*, *147*(2), 277-285.

Vieira, E., Merino, B., & Quesada, I. (2015). Role of the clock gene Rev-erbα in metabolism and in the endocrine pancreas. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *17*, 106-114.

Walker, W. H., Borniger, J. C., Gaudier-Diaz, M. M., Hecmarie Meléndez-Fernández, O., Pascoe, J. L., Courtney DeVries, A., & Nelson, R. J. (2020). Acute exposure to low-level light at night is sufficient to induce neurological changes and depressive-like behavior. *Molecular psychiatry*, *25*(5), 1080-1093.

Wang, H. L., Zhang, S., Qi, J., Wang, H., Cachope, R., Mejias-Aponte, C. A., ... & Morales, M. (2019). Dorsal raphe dual serotonin-glutamate neurons drive reward by establishing excitatory synapses on VTA mesoaccumbens dopamine neurons. *Cell reports*, *26*(5), 1128-1142.

Webb, I. C. (2017). Circadian rhythms and substance abuse: chronobiological considerations for the treatment of addiction. *Current psychiatry reports*, *19*, 1-8.

Webb, I. C., Baltazar, R. M., Wang, X., Pitchers, K. K., Coolen, L. M., & Lehman, M. N. (2009). Diurnal variations in natural and drug reward, mesolimbic tyrosine hydroxylase, and clock gene expression in the male rat. *Journal of biological rhythms*, *24*(6), 465-476.

Webb, I. C., Lehman, M. N., & Coolen, L. M. (2015). Diurnal and circadian regulation of reward-related neurophysiology and behavior. *Physiology & behavior*, *143*, 58-69.

Wright, J., & Wiediger, R. (2007). Motivated behaviours: The interaction of attention, habituation and memory. *Psychology of motivation*, 5-28.

Yoon, S. O., & Chikaraishi, D. M. (1992). Tissue-specific transcription of the rat tyrosine hydroxylase gene requires synergy between an AP-1 motif and an overlapping E box-containing dyad. *Neuron*, *9*(1), 55-67.

Capítulo II

Motivación por una recompensa de comida bajo condiciones de disrupción del sistema circadiano

II.1 Introducción

II.1.1 Modelos de sincronización fótica

En la Introducción General de esta tesis, mencionamos que la sincronización es el mecanismo mediante el cual el oscilador central ajusta su período endógeno al del ciclo ambiental para mantener una relación de fases coherente y constante entre los ritmos y el ambiente. Asimismo, sabemos que la luz es el principal agente sincronizador del reloj en los NSQ. Este tipo de sincronización es conocida como **sincronización fótica**. Asimismo, podemos definir la **sincronización no fótica** como aquella causada por estímulos ambientales cíclicos no lumínicos (como ciclos de temperatura, de ingesta de alimentos o de determinadas drogas, ciclos de interacciones sociales, etc.). De este tipo de sincronización hablaremos en detalle en el Capítulo III de esta tesis.

Poniendo el foco nuevamente en la sincronización fótica, en Cronobiología, existen dos modelos principales que intentan explicar la susceptibilidad del reloj circadiano a la luz y el mecanismo de sincronización. Por un lado, el **modelo no paramétrico** postula que la sincronización fótica ocurre por medio de efectos discretos o fásicos de la luz (es decir, pulsos de luz) sobre el oscilador endógeno [Dann & Pittendrigh, 1976]. En condiciones de libre curso, dependiendo de la fase (CT) en la que se encuentre oscilando el reloj endógeno al momento de la incidencia del pulso de luz, este último puede adelantar o retrasar la fase del reloj, o no tener efecto alguno. Esto ocurre porque el sistema circadiano no es igualmente sensible a la luz a cualquier hora del día [Czeisler et al., 1989]. Veamos un ejemplo más intuitivo: para un roedor nocturno, la administración de un pulso de luz durante el día (cuando hay luz) tiene un efecto prácticamente nulo sobre los ritmos circadianos del animal. Pero si el pulso de luz es administrado por la noche, tendrá un efecto significativo sobre los ritmos dado que es el momento en el que el reloj del animal es “más susceptible a la luz”. Si ponemos al roedor bajo condiciones de oscuridad constante, condición en la que sus ritmos circadianos están en libre curso y oscilan de acuerdo a los *días y noches subjetivos* del animal, el efecto de un pulso de luz dependerá, al igual que antes, del momento en el que se administre. La susceptibilidad al pulso de luz durante el *día subjetivo* del roedor será muy baja y el efecto será prácticamente nulo mientras que, durante la *noche subjetiva*, el pulso de luz tendrá una gran incidencia y modificará la fase de los ritmos en el animal.

Esta variabilidad del reloj biológico en la sensibilidad a la luz y sus efectos, es dependiente de la especie, su naturaleza (nocturna vs diurna) e incluso puede variar entre individuos. Una forma de estudiarla es mediante lo que se conoce como **curva de respuesta de fase** (**PRC**, por sus siglas en inglés *Phase Response Curve*). Este tipo de herramienta permite evidenciar cómo "reacciona" (es decir, modifica su fase) el reloj endógeno de acuerdo al momento en el que se administre un pulso de luz, mediante la observación de un ritmo de salida del reloj como, por ejemplo, la actividad locomotora. Para graficar una PRC fótica en un roedor nocturno, el experimento consiste en poner a los ratones bajo condiciones de oscuridad constante y administrar, en diferentes individuos, un pulso corto de luz a distintos horarios (CTs) del día y la noche subjetivos. La variable que nos indicará qué efecto tuvo el pulso de luz sobre el reloj será la actividad locomotora, por consiguiente, en los días posteriores a la administración del pulso de luz, vamos a observar en el actograma cómo la fase del ritmo de actividad se modifica. Recordemos que como fase podemos tomar cualquier punto sobre el ritmo, entonces, si definimos la fase como el *onset* de la actividad locomotora (que sería el CT12), según cuando hayamos administrado el pulso de luz, vamos a ver que el *onset* se corre hacia la izquierda (avance de fase), a la derecha (retraso de fase) o no se modifica. Luego, cuantificamos la dirección (avance o retraso) y la magnitud (cantidad de minutos u horas del avance o del retraso) del efecto producido por el pulso de luz, y lo graficamos obteniendo finalmente la PRC fótica característica de la especie utilizada. En la **Figura II.1.1** podemos observar que, en una PRC típica de roedores nocturnos, los pulsos de luz administrados en la primera parte de la noche subjetiva provocan retrasos de fase, mientras que los administrados en las últimas horas de la noche subjetiva provocan adelantos de fase. Por el contrario, si estos pulsos son administrados durante el día subjetivo (etapa de reposo) no tienen efecto alguno sobre el ritmo. De esta forma, hemos determinado los momentos en que el reloj endógeno es sensible a la luz, lo que nos permite ahora entender cómo ocurre la sincronización del reloj central a los ciclos ambientales de luz/oscuridad según el modelo no paramétrico. Este modelo, basándose en la PRC, infiere que el reloj recibe cada día pulsos de luz que impactan en momentos específicos ajustando diariamente la fase del reloj para que coincida y, mantenga una relación de fases estable, con el ciclo ambiental. Por último, cabe mencionar que la PRC es una propiedad intrínseca del oscilador

circadiano y su forma final es característica de cada estímulo (fótico o no fótico) y cada especie, inclusive la humana [Minors et al., 1991; Golombek & Rosenstein, 2010]. En cuanto a la PRC de sincronizadores no fóticos (como la disponibilidad de alimento), su forma suele ser opuesta a la observada para la sincronización fótica. Así, los estímulos no fóticos suelen causar adelantos de fase durante el día subjetivo y no tener efecto durante la noche subjetiva. Este efecto se puede observar fácilmente en roedores nocturnos cuando los cambios de viruta de la jaula se realizan durante el día o cuando el alimento se suministra sólo durante el horario diurno.

Figura II.1.1. Curva de respuesta de fase (PRC) a un estímulo fótico para un ratón. La curva de respuesta de fase permite evidenciar los mecanismos de sincronización fótica del modelo no paramétrico. En ella se grafica el cambio de fase evidenciado en un ritmo (por ejemplo, la actividad locomotora) luego de la administración de un pulso de luz corto en distintos momentos del ciclo circadiano. Por encima del 0 en el eje *X* se grafican los adelantos (valores positivos), mientras que por debajo se grafican los retrasos de fase (valores negativos). Los puntos sobre la curva representan el horario circadiano (CT) en el que se administró el pulso de luz para evidenciar el efecto consecuente. En el punto *a*, no hay cambio de fase, el pulso de luz se administró durante el día subjetivo que es una zona no sensible a los efectos de la luz. Por otro lado, en los puntos *b* y *c*, donde el pulso de luz se administró en la noche subjetiva temprana, se observan retrasos en la fase. Al administrar el pulso de luz en la noche tardía, puntos *d* y *e*, lo que se observan son adelantos de la fase.

El otro modelo cronobiológico para explicar la sincronización, es el **modelo paramétrico** (o continuo). Éste propone que el oscilador está continuamente bajo el efecto del *zeitgeber*, de acuerdo con la intensidad del mismo [Ruis et al., 1991]. El modelo postula que la luz tiene un efecto continuo sobre el reloj durante la sincronización, acelerándolo en los intervalos de luz y

desacelerándolo durante la oscuridad, teniendo un efecto entonces sobre el período del oscilador y no sobre la fase. Este modelo deriva de otras teorías cronobiológicas, que establecen que la velocidad del reloj en condiciones de luz constante depende de la intensidad de dicha luz.

II.1.1.1 Rangos de entrenamiento

Hemos establecido que el reloj y los ritmos circadianos son capaces de sincronizarse a los ciclos ambientales. Sin embargo, el reloj no es capaz de sincronizarse a todos los estímulos rítmicos del ambiente. La capacidad de un oscilador para sincronizarse a un determinado *zeitgeber* depende tanto de las características del propio oscilador como de factores del estímulo sincronizador. El oscilador posee un período endógeno y una cierta flexibilidad a adaptar su período al de un ciclo externo. En este sentido, le será "más fácil" al oscilador adaptarse y sincronizarse a ciclos externos con una periodicidad cercana a la suya. En particular, la capacidad del oscilador de sincronizarse a un *zeitgeber* va a depender de la combinación del período y la amplitud de este último [Abraham et al., 2010]. Así, los osciladores endógenos de una determinada especie u organismo, presentan un "rango de entrenamiento" dentro del cual pueden adaptar su fase y período a las de un determinado ciclo externo. Mientras más se aleje el período del *zeitgeber* al período endógeno del oscilador, o cuanto menor sea la amplitud del *zeitgeber*, más difícil le resultará al oscilador permanecer sincronizado al mismo.

El rango de entrenamiento es específico del sistema bajo estudio y del estímulo sincronizador. Por ejemplo, la cepa de ratones C57BL6 tiene un rango de entrenamiento reportado a ciclos LD de entre 23 a 26 horas [Ma et al., 2022]. Es decir, si se expone a estos ratones a un ciclo de LD con una periodicidad menor a 23 o mayor a 26 horas, los animales son incapaces de sincronizarse a dicho ciclo. En estos casos, lo que suele ocurrir es que el reloj comienza a oscilar con su período endógeno alternando con cambios en su fase (cuando la luz del ciclo incide en la zona de la PRC que es sensible a la luz) generando ritmos de salida con patrones mixtos.

II.1.2 Desincronización del sistema circadiano

Como ya hemos mencionado, el sistema circadiano consiste en osciladores acoplados entre sí que coordinan los ritmos de salida del organismo. El acoplamiento entre el reloj central, los relojes periféricos y los ritmos circadianos es indispensable para el mantenimiento de la sincronía interna del sistema. A su vez, cada reloj y cada ritmo tiene una fase determinada que está en armonía con el resto y que está perfectamente coordinada por el reloj central. Múltiples factores ambientales, así como diversas patologías, pueden afectar esta perfecta coordinación interna del sistema circadiano y desencadenar estados de desincronización con graves consecuencias para la salud.

La desincronización interna, es decir, la pérdida de sincronía entre los diversos osciladores que conforman el sistema circadiano y los ritmos biológicos controlados por éstos, puede ocurrir como consecuencia de situaciones en las que se alteran las condiciones de sincronización normales. Estas alteraciones pueden deberse a la imposibilidad de procesar la información del ciclo de luz/oscuridad ambiental, como ocurre en personas con ceguera, o por conflictos de ajuste entre la fase del reloj endógeno y el ciclo ambiental. Este último puede darse por alteraciones endógenas, como pueden ser desórdenes genéticos en el reloj circadiano, o por alteraciones exógenas, dadas por cambios en el ciclo de luz/oscuridad externo, o por alteraciones forzados en el ciclo de sueño-vigilia.

Nuestra forma de vida en las sociedades modernas, nos expone constantemente a diversas condiciones que generan disrupciones y alteraciones en el sistema circadiano y los ritmos biológicos. Esta desincronización interna está, la gran mayoría de las veces, mediada por una desincronización externa, como ocurre con la exposición alterada a ciclos de luz/oscuridad o por patrones de ayuno-ingesta inadecuados. Por ejemplo, en el trabajo en turnos rotativos, se altera considerablemente el ritmo de sueño-vigilia (y muchos otros ritmos conductuales), pero además esto causa la ingesta de alimentos en horarios inadecuados. Otro ejemplo, son los viajes frecuentes transmeridiano en donde debemos adaptarnos a un nuevo ciclo de luz/oscuridad sufriendo las desagradables consecuencias del *jet lag*. Asimismo, la exposición nocturna a la luz artificial en ambientes urbanos o por la permanente exposición a pantallas (computadoras, celulares, entre otros), y la exposición crónica a la luz como ocurre en salas de internación,

producen disrupciones y alteraciones de nuestros ritmos endógenos. Estos esquemas de luz conflictivos, a los que el reloj biológico debe resincronizarse permanentemente causando, a su vez, la desincronización interna del sistema circadiano, aumentan el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares [Peter et al., 1999], síndrome metabólico (Karlsson et al., 2001; Karlsson et al., 2003; Al-Naimi et al., 2004) y el riesgo de contraer cáncer [Schernhammer et al., 2003; Stevens, 2005].

Esta desincronización interna, transitoria o crónica, puede ser emulada en experimentos de laboratorio utilizando modelos animales para entender cómo se ve alterado el sistema circadiano y los posibles efectos negativos que esto conlleva. Por ejemplo, exponer a roedores a esquemas de iluminación constante o a protocolos experimentales de *jet lag* (por avances o retrasos de la fase) son metodologías muy utilizadas en el ámbito de la Cronobiología para estudiar todo tipo de variables fisiológicas y conductuales afectadas por la disrupción circadiana. En las siguientes secciones hablaremos en detalle de ellas.

II.1.3 Modelo de arritmicidad circadiana causada por luz constante (LL)

La exposición cónica a la luz o luz constante (**LL**, por *light/light*, es decir, 24 horas de exposición ininterrumpida a la luz) es frecuentemente utilizada como modelo para inducir la disrupción circadiana. Las consecuencias observadas en los ritmos circadianos de animales expuestos a esta condición varían de acuerdo a la especie, a la intensidad de la luz utilizada y al tiempo de exposición a la misma. En roedores, se ha observado que la exposición a LL causa un secuencial alargamiento en el período del ritmo de actividad locomotora que, al aumentar el tiempo de exposición, conlleva a la arritmicidad (es decir, la falta de ritmos observables, ver **Figura II.1.2**) [Maroni et al., 2018; Rumanova et al., 2020; Fonken et al., 2010; Gale et al., 2011]. Asimismo, el aumento de la intensidad de la iluminación (> a 200 lux) puede inducir la arritmicidad en roedores más rápidamente [Steinlechner et al., 2002]. Sin embargo, en la mayoría de los estudios, solo un porcentaje (cuyo valor no es reproducible y varía entre estudios) de los animales bajo condiciones de LL muestran arritmicidad [revisado en Rumanova et al., 2020]. Esta observación, podría indicar que las diferencias interindividuales podrían tener un rol importante en los cambios fisiológicos y conductuales causados por la exposición a luz constante. Por ejemplo, un

estudio realizado en ratones transgénicos Per1:GFP, los autores observaron tres fenotipos en el ritmo locomotor de los ratones bajo LL: un alargamiento del período, arritmicidad, y ritmos fragmentados (o "*splitting*"). Asimismo, no sólo el patrón de actividad locomotora variaba entre individuos, sino también la actividad neuronal en los NSQ se encontraba alterada y coincidía con las alteraciones en de los patrones comportamentales [Ohta et al., 2005]. En este sentido, se ha sugerido que el desacople (o la desincronización) de la actividad de las distintas neuronas en los NSQ podría ser uno de los mecanismos para explicar la arritmicidad en los patrones de actividad locomotora de los roedores expuestos a condiciones de luz constante.

Figura II.1.2. Patrones de actividad locomotora en rueda de un ratón C57BL6 en condiciones de luz constante (LL). Las barras superiores blancas y negras indican las condiciones previas de luz/oscuridad (LD) 12:12. La barra blanca indica el inicio de la condición de luz constante (LL). En LL, el ratón comienza su actividad cada día más tarde en los días sucesivos hasta que luego de aproximadamente veinte días sus patrones de actividad locomotora se vuelven arrítmicos.

Actualmente, el mecanismo molecular por medio del cual la exposición a luz constante produce un alargamiento del período seguido de arritmicidad circadiana es desconocido. Los estudios muestran, muchas veces, resultados opuestos y dependientes de la especie del modelo animal utilizado. Por ejemplo, se ha observado que, en ratas con un alargamiento del período bajo condiciones de LL, los ritmos de *bmal1* y *rev-erbα* en los NSQ se abolen, pero la expresión de los genes *per1* y *per2* mantiene su ritmicidad [Nováková et al., 2010]. Por otro lado, se ha

reportado que, en los NSQ de ratones expuestos a condiciones de LL durante 7 días, el ritmo de ARNm de *per2* se pierde mientras que el ritmo de la proteína PER2 se ve atenuado y su pico de expresión sufre un retraso de fase. Adicionalmente, en este experimento se demostró que, cuando los ratones presentan arritmicidad a causa de ser mantenidos bajo LL por largos periodos de tiempo, la proteína PER2 pierde por completo su expresión rítmica en los NSQ [Sudo et al., 2003].

A pesar de las discrepancias a nivel del mecanismo molecular, las investigaciones sugieren que las consecuencias negativas a causa de la exposición a la luz constante son variadas y afectan la fisiología a distintos niveles. Se ha evidenciado que la exposición a LL puede causar una alteración en los ritmos de hormonas glucocorticoides al afectar la regulación del eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal [Park et al., 2013], así como la pérdida de los ritmos diarios en distintas variables fisiológicas relacionadas con el metabolismo de la glucosa y los lípidos en el organismo [revisado en Rumanova et al., 2020]. En relación a la ingesta de alimentos, los estudios hechos en ratones bajo condiciones de LL mostraron, en general, que la exposición a la luz constante no afecta la cantidad total de alimentos consumidos en un período de 24 horas [Gale et al., 2011; Rumanova et al., 2020; Báez-Ruiz et al., 2017; Fonken et al., 2010], aunque otros estudios reportan que hay diferencias, y destacan un menor consumo de comida en LL respecto a LD [Wideman & Murphy, 2009]. Adicionalmente, cuando los ratones son alimentados con una dieta alta en grasa bajo condiciones de LL, la ingesta total de alimentos disminuye [Coomans et al., 2013]. Muchos trabajos demuestran que la exposición a luz constante suprime el ritmo de ingesta diario, principalmente debido a un aumento en el consumo de comida por parte de los ratones durante el 'día subjetivo'. Además, los resultados sugieren que la pérdida del patrón rítmico de ingesta de alimentos puede desencadenar un aumento significativo en el peso corporal de los animales, así como un aumento de los tejidos adiposos y la grasa corporal total. Incluso en aquellos estudios en los que se ha reportado igual peso corporal del grupo en LL respecto al grupo de control, se observa un incremento en la grasa corporal y el tamaño de los adipocitos [Fonken et al., 2010].

II.1.4 Modelo de desincronización circadiana causada por protocolos de *jet lag* experimental

El término *jet lag* se refiere a una serie de perturbaciones psicológicas y fisiológicas que se desarrollan cuando los ritmos circadianos internos y el tiempo externo no están sincronizados. Este síndrome es experimentado por individuos que realizan viajes transmeridianos (viajes hacia el este o el oeste atravesando diferentes zonas horarias) donde el ciclo de luz/oscuridad ambiental se adelanta o retrasa con respecto al reloj circadiano del individuo. El síndrome de *jet lag* se caracteriza en humanos por una disminución en el estado de alerta, insomnio, bajo rendimiento, pérdida de apetito, depresión y problemas gastrointestinales [Arendt & Marks 1982]. Una vez producido el adelanto o retraso de la fase por el cambio horario, los ritmos biológicos se resincronizan gradualmente con el nuevo ciclo de luz/oscuridad. A pesar de que los efectos de la luz sobre el oscilador molecular circadiano son instantáneos, la velocidad de ajuste del reloj y de los distintos ritmos circadianos del organismo es limitada, y la resincronización al nuevo ciclo LD demora varios días. Durante estos días de adaptación, el organismo se encuentra en una desincronía interna *transitoria*. Una vez el reloj biológico "se acomoda" al nuevo ciclo ambiental, los síntomas negativos desaparecen y el sistema vuelve a estar en perfecta armonía y coordinación.

Cuando el efecto del *jet lag* se repite crónicamente (lo que llamamos un ***Jet Lag* Crónico**, **JLC**), como sucede en el caso del trabajo en turnos rotativos o en pilotos de avión que realizan viajes transmeridiano con elevada frecuencia, el reloj central circadiano no logra resincronizarse por completo antes de sufrir un nuevo cambio de fase (por exposición a un nuevo ciclo ambiental), lo que genera que la desincronía interna *transitoria* se vuelva *crónica*. Como mencionamos previamente, durante la desincronización interna se pierden las relaciones de fase entre el oscilador central, los diferentes osciladores periféricos y las variables comportamentales. En palabras simples, todo el sistema circadiano se encuentra desregulado y en un estado caótico. Si esta situación se mantiene a lo largo de largos periodos de tiempo (años), las investigaciones han demostrado que la desincronía circadiana lleva a un incremento en la susceptibilidad a distintas patologías en humanos. Estudios epidemiológicos muestran que las alteraciones exógenas de los ritmos circadianos, ya sea por trabajo nocturno o rotativo o por JLC, aumentan

el riesgo de enfermedades cardiovasculares [Peter et al., 1999], aumentan el riesgo de padecer síndrome metabólico [Karlsson et al., 2003; Al-Naimi et al., 2004] y el riesgo de contraer distintos tipos de cánceres [Schernhammer et al., 2003; Stevens, 2001; Arafa et al., 2021]. Además, distintos estudios en modelos animales han demostrado que la desincronización circadiana crónica lleva a un aumento del peso corporal, de los niveles de triglicéridos y de la grasa corporal, así como también, a una disminución en los niveles de insulina y la alteración de los perfiles de expresión de genes reloj en tejidos periféricos [Iwamoto et al., 2014; Herrero et al., 2015; Casiraghi et al., 2016; Trebucq et al., 2023]. Adicionalmente, otros estudios muestran que la disrupción de los ritmos inducida por JLC incrementa la tumorigénesis en ratones [Aiello et al., 2020].

Los modelos de desincronización circadiana resultan de utilidad para estudiar los efectos del reloj sobre ciertos sistemas y funciones del organismo**.** En el presente capítulo, se utilizó un protocolo de JLC para inducir la desincronización circadiana crónica en ratones y evaluar cómo esto afecta al comportamiento de motivación y a otras conductas vinculadas con el sistema de recompensa y la gestión emocional. En este protocolo, la desincronización del sistema interno del animal *se fuerza* a través de una condición experimental impuesta (y de allí el término de desincronización forzada utilizado para este tipo de protocolos). Por lo general, los protocolos de desincronización forzada consisten en someter a los animales a esquemas de iluminación con períodos por fuera de su rango de entrenamiento. Como consecuencia, los animales presentan patrones alterados de actividad locomotora que se pueden correlacionar con el estado de desincronía interno. En particular, el protocolo utilizado aquí ha sido caracterizado y modelado previamente en nuestro grupo de investigación [Cashiragui et al., 2012]. El mismo consiste en adelantos de fase crónicos (es decir, adelantar el esquema de luz/oscuridad una cantidad fija de horas de forma recurrente), generando una desincronía en los patrones de actividad de los ratones que se evidencia en dos componentes muy marcados con distintos períodos (**Figura II.1.3**). El modelado de este tipo de esquema ha demostrado que la sumatoria de los avances crónicos de la fase es equivalente a someter a los animales a un ciclo de luz/oscuridad de 21 horas de período (LD 10.5:10.5). Como vimos al principio de esta introducción, esta periodicidad está por fuera del rango de entrenamiento de los ratones, lo que produce que los animales sean

incapaces de sincronizarse a dicho ciclo causando una desincronización sostenida. Adicionalmente, otros modelos similares de desincronización forzada en roedores han demostrado que este proceso ocurre también a nivel de las neuronas de los NSQ [de la Iglesia et al., 2004]. En este trabajo, los autores lograron identificar que los dos componentes evidenciados en los patrones de actividad locomotora estaban asociados a la actividad diferencial de dos conjuntos de osciladores neuronales en los NSQ, uno en la región del *core* y el otro en el *shell* del mismo. En resumidas palabras, la desincronización estaba dada a nivel celular por el desacople de los osciladores autónomos del reloj central.

Figura II.1.3. Actograma de actividad locomotora de un ratón bajo el protocolo de *jet lag* crónico (JLC) por adelanto de fase. Se puede observar cómo un ratón bajo el protocolo de JLC por avances de fase descompone sus ritmos de actividad locomotora en dos componentes con distintos períodos: uno corto de período menor a 24 hs (línea verde), y el otro largo con un período mayor a 24 hs (línea roja). La expresión de estos componentes muestra la incapacidad del animal de sincronizarse al esquema de iluminación y evidencia la desincronización interna. Adaptado de [Casiraghi et al., 2012].

II.2 Objetivos

Objetivo general

El objetivo general del presente capítulo fue determinar si la motivación por una recompensa de comida en ratones se ve afectada bajo condiciones de disrupción del sistema circadiano.

Objetivos específicos

1. Evaluar si la arritmicidad circadiana causada por la exposición a luz constante (LL) tiene un efecto negativo sobre la ritmicidad diaria del comportamiento de motivación por una recompensa de comida.

2. Determinar si la desincronización forzada de los ritmos circadianos causada por un modelo experimental de *jet lag* crónico (JLC) afecta la motivación por una recompensa de comida.

3. Evidenciar si el modelo experimental de *jet lag* crónico induce conductas de tipo ansiosas y depresivas en ratones, influyendo así negativamente sobre los circuitos del sistema de recompensa.

II.3 Materiales y Métodos

II.3.1. Animales y condiciones de alojamiento

Para los experimentos de este capítulo se utilizaron ratones macho de la cepa C57BL6/J adquiridos de proveedores comerciales (provenientes de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata). Para todos los experimentos se utilizaron ratones jóvenes adultos, que tenían entre 3 a 4 meses de edad al inicio de los protocolos experimentales.

Previo al inicio de los protocolos experimentales de desincronización circadiana, los ratones fueron alojados en jaulas individuales (cada una equipada con un sensor infrarrojo para el registro de la actividad locomotora) y mantenidos bajo un fotoperiodo de 12 horas de luz seguidos de 12 horas de oscuridad (LD 12:12), con el encendido de las luces a las 8 AM y el apagado a las 8 PM, en el Bioterio de la Universidad Nacional de Quilmes. Las condiciones de la temperatura ambiental se mantuvieron constantes (20 ± 2 °C). Asimismo, los ratones tuvieron libre acceso a agua y comida (alimento balanceado comercial). Este periodo de aclimatación duro al menos dos semanas antes del inicio de los protocolos experimentales.

Durante los protocolos experimentales, los ratones continuaron siendo alojados individualmente, con condiciones constantes de temperatura ambiental, y con libre acceso a agua y comida. La única excepción a la alimentación *ad libitum* fue durante los test conductuales que requieren una restricción calórica (como el protocolo de tasa progresiva para medir la motivación). En estos casos, los animales recibieron una cantidad reducida de alimento durante los 7 días previos al inicio de la evaluación comportamental y durante los 5 días de entrenamiento en el protocolo de PR. El objetivo fue mantener a los animales en un 85% de su peso original para que estuvieran dispuestos realizar un esfuerzo para obtener la recompensa de comida. En todos los casos, la comida diaria se proporcionó después de las sesiones de entrenamiento y de testeo. Una vez finalizado el protocolo conductual que ameritó la restricción calórica, los ratones fueron alimentados nuevamente *ad libitum*.

Durante los experimentos, cada vez que los ratones debieron ser manipulados en oscuridad, se utilizó una luz roja tenue (< 5 lux).

Los procedimientos y protocolos utilizados en esta tesis se ajustan estrictamente a las recomendaciones establecidas en las guías para cuidado y mantenimiento de animales de laboratorio emitidas por el Instituto Nacional de Salud de USA (NIH) y han sido aprobados por el

Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAL) de la Universidad Nacional de Quilmes. El uso de modelos animales fue necesario debido a que las variables conductuales y fisiológicas que se estudiaron no pueden obtenerse *in vitro*. Por otra parte, el protocolo utilizado fue diseñado de manera tal de minimizar el número de animales involucrados en cada experimento.

II.3.2. Registro de actividad locomotora

El registro de actividad locomotora se realizó de la misma forma que fue descripta en el capítulo anterior (ver sección I.3.2 del Capítulo I).

II.3.3 Protocolo experimental de arritmicidad circadiana causada por luz constante (LL)

Para inducir la arritmicidad circadiana en ratones se utilizó un protocolo experimental de exposición continua y crónica a la luz. Para ello, se sometió a un grupo de ratones a **condiciones de luz constante** (**LL**, por *light/light*) hasta evidenciar arritmicidad en el patrón de actividad locomotora, como medida indirecta de la arritmicidad en el sistema circadiano [Bussi et al., 2014]. Los animales fueron expuestos de manera continua a la luz (tubo fluorescente, 200 lux a nivel de la jaula) durante al menos 30 días antes del inicio de los experimentos conductuales con el fin de inducir la arritmicidad. Se utilizaron los registros de actividad locomotora de los animales (actogramas) cómo método para evidenciar visualmente los patrones arrítmicos que fueron confirmados mediante periodogramas. Para los periodogramas se utilizaron como datos la actividad locomotora de los 7 días previos al inicio de los experimentos conductuales. Solo los animales arrítmicos (es decir, que no mostraron un período significativo en el análisis de periodograma) fueron incluidos en el experimento conductual.

II.3.3.1 Grupos y diseño experimental

Para evaluar si la arritmicidad circadiana afecta la motivación por una recompensa de comida, se evaluó en el protocolo de tasa progresiva (PR) a los ratones arrítmicos bajo condiciones de luz constante (grupo LL) y sus controles. Dado que no es posible establecer un ZT en condiciones de luz constante o un CT en ratones arrítmicos, el grupo de LL fue evaluado en el protocolo de PR en distintos horarios ('hora reloj de los investigadores') a lo largo de 24 horas. Debido a que no se encontraron diferencias significativas entre los distintos momentos de evaluación (ver en resultados más adelante), los resultados del test de motivación del grupo LL se agruparon y se muestran como un único conjunto de datos independientes del momento de evaluación. El grupo control consistió en ratones bajo un ciclo LD 12:12, que estuvieron bajo estas condiciones la misma cantidad de días que el grupo LL. Los controles fueron evaluados en el protocolo de PR para medir su motivación por comida durante su fase de actividad (LD Noche) a ZT18, siendo ZT12 el horario de apagado de las luces.

Del total de ratones del grupo LL evaluados en la prueba de motivación, el 67.6% fue considerado para el análisis final de los datos. Entre los ratones que fueron descartados del análisis se incluyen animales que no aprendieron la tarea en la etapa de condicionamiento operante, que realizaron menos de 10 presiones en la sesión de testeo de PR, y 1 dato atípico (*outlier*). El tamaño muestral final utilizado en este experimento fue de: N=23 para LL y N=18 para LD Noche.

II.3.3.2 Mediciones del peso corporal y de ingesta de alimento

Previo al inicio de la evaluación comportamental, en condiciones de alimentación *ad libitum*, los grupos de ratones en LL y sus controles en LD fueron pesados y el consumo de comida (alimento balanceado regular) fue medido a lo largo de dos semanas. Se realizaron seis mediciones en total para ambos indicadores, y los datos obtenidos fueron promediados para obtener el peso corporal promedio por animal y el consumo de comida diario en cada caso.

II.3.3.3 Motivación por una recompensa de comida

Para evaluar la motivación en el grupo LL y sus controles en LD, se utilizaron el mismo equipamiento, procedimiento y análisis de resultados descriptos en la sección I.3.3 del Capítulo I.

II.3.3.4 Análisis de los datos

Se realizaron periodogramas de Lomb-Scargle para confirmar la arritmicidad circadiana en los patrones de actividad locomotora de los animales utilizando el software Actogram J (NIH, Bethesta, MD, USA)

En todos los casos, se corroboró previamente que los datos cumplieran con los supuestos de normalidad y de normalidad de los residuos, mediante el test de Shapiro-Wilk, y con la homogeneidad de varianzas, mediante el test de Brown-Forsythe. Cuando los datos no cumplieron los supuestos, se realizaron correcciones o se utilizaron tests estadísticos no paramétricos adecuados a la naturaleza de los datos y el diseño del estudio.

Para el análisis de los pesos y el consumo diario de comida se realizaron t-test no pareados a dos colas con y sin corrección de Welch (para los casos en los que las varianzas no eran iguales).

Para el análisis de los índices motivacionales entre ratones del grupo LL se realizaron test de ANOVA a una vía o test de Kruskal-Wallis (en los casos en donde no se cumplió con la normalidad de los residuos). Para el análisis de los datos de LL vs LD Noche se realizaron t-test no pareados a dos colas y test de Mann-Whitney a dos colas (para los casos en donde los datos no eran normales). El análisis de la dinámica de la respuesta realizó de la misma forma que se describe en la sección I.3.5.2 del Capítulo I.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando Graphpad Prism (GraphPad Software Inc., CA, USA). En todos los casos, el valor de alfa (α) se estableció en $p < 0.05$.

II.3.4 Protocolo experimental de desincronización circadiana mediante un modelo *jet-lag* crónico (JLC)

Para generar desincronización circadiana crónica en los ratones se utilizó un protocolo de *Jet Lag* Crónico (JLC) experimental desarrollado y ampliamente utilizado en nuestro laboratorio

[Casiraghi et al., 2012; Casiraghi et al., 2016; Aiello et al., 2020; Trebucq et al., 2023]. Este protocolo consiste en adelantar 6 horas el encendido y el apagado de las luces (es decir, un ciclo completo de luz/oscuridad) cada 2 días (**JLC$^{+6/2}$**, ver esquematización en **Figura II.3.1**). Este adelanto se logra reduciendo 6 horas la duración de la fase de oscuridad, logrando de esta manera modificar las condiciones de sincronización sin alterar la cantidad total de luz que reciben los animales. Como consecuencia, los animales bajo este protocolo experimentan una alternancia entre "noches cortas" (6 horas de oscuridad) y "noches largas" (12 horas de oscuridad).

La exposición crónica y prolongada a este tipo de protocolos produce una desincronización forzada del reloj y los ritmos circadianos, dado que el animal se encuentra continuamente tratando de ajustar su fase luego del adelanto, pero no logra hacerlo antes de que ocurra el nuevo adelanto (dos días después). Luego de varias semanas bajo este protocolo los ratones muestran un patrón segmentado de actividad locomotora que es indicativo de la desincronización interna [Casiraghi et al., 2012].

Figura II.3.1. Esquematización del protocolo de *jet lag* crónico (JLC) experimental. Las barras amarillas indican los momentos donde las luces están encendidas y las barras negras los momentos de oscuridad. A la izquierda se muestra un esquema de un ciclo normal luz/oscuridad 12:12 a modo de comparación con el esquema del protocolo de *jet lag* crónico (JLC) utilizado, que se muestra en el panel de la derecha. En este protocolo, se induce una desincronización forzada de los ritmos circadianos por medio de adelantos de fase crónicos que ocurren cada dos días. El adelanto se logra acortando 6 horas la duración de la fase de oscuridad. Esto genera que los ratones experimenten una alternancia entre noches cortas (6 horas de oscuridad) y noches largas (12 horas de oscuridad). Notar que el ciclo 'vuelve a empezar' cada 7 días. Para ejemplificarlo sobre el esquema, notar que el día 1 y el día 8 del JLC coinciden en los horarios de encendido y apagado de las luces.

II.3.4.1 Grupos y diseño experimental

En este experimento, los ratones estuvieron bajo el protocolo de $JLC^{+6/2}$ por un mínimo de 8 semanas antes de ser evaluados comportamentalmente. La desincronización interna fue evidenciada mediante la observación de los actogramas individuales y su análisis con periodogramas. Una vez evidenciada la desincronización interna, los animales fueron evaluados en una batería de tests comportamentales para estudiar posibles afecciones en la motivación por una recompensa de comida y en otros comportamientos relacionados con el estado de ánimo ("*mood-related behaviors*") como la anhedonia, el estrés y las conductas de tipo depresivas (**Figura II.3.2**). La secuencia en que se realizaron los diferentes tests comportamentales fue planificada a modo de minimizar cualquier posible efecto de estrés en los ratones que pudiera afectar los resultados del siguiente test. Esto significa que los mismos se ordenaron del menos estresante al más estresante en orden cronológico. Además, se estableció un período de descanso de una semana entre cada prueba conductual para asegurar la recuperación completa de los ratones. En cuanto a los horarios elegidos para la evaluación comportamental, como se mencionó previamente, los ratones bajo el protocolo de JLC experimentan un patrón de alternancia entre **noches cortas** y **largas** como consecuencia de los avances de fase crónicos. Es por ello que se decidió subdividir en dos al grupo de ratones bajo JLC y evaluarlos en los test comportamentales tanto durante la noche corta (**JLC-NC**) como durante la noche larga (**JLC-NL**). Para estandarizar la fase/momento de evaluación entre grupos, se tomó como referencia el horario de apagado de las luces en el protocolo de JLC, y tanto el grupo de JLC-NC como el JLC-NL fueron evaluados comportamentalmente dos horas luego del apagado de las luces. Por otro lado, los controles de este experimento consistieron en ratones alojados bajo un ciclo LD 12:12 durante el mismo tiempo y condiciones que el grupo JLC (mínimo de 2 meses, alojados en jaulas individuales con comida y agua *ad libitum*). El grupo control también fue evaluado comportamentalmente durante su fase de actividad, dos horas luego del apagado de las luces (a ZT14). El tamaño muestral utilizado en este experimento fue de: N=12 para LD Noche (controles), N=6 para JLC-NC y N=6 para JLC-NL, y se analizaron los resultados de todos los ratones que se incluyeron inicialmente en el experimento, con la excepción del test de motivación, en donde se descartó del análisis final 1 dato como atípico (*outlier*) correspondiente al grupo de JLC-NC.

Es importante mencionar que, dado que las evaluaciones conductuales se hicieron durante los momentos de oscuridad en los ratones de JLC y sus controles, toda la batería de test comportamentales se realizó bajo luz roja de baja intensidad (<5 lux) para minimizar el impacto de la exposición a la luz durante la fase nocturna y evitar sus consecuencias en los ritmos circadianos de los animales.

Figura II.3.2. Batería de test comportamentales. Se muestra el orden cronológico en el que se evaluó a los grupos experimentales de ratones en los distintos test comportamentales para evidenciar comportamientos relacionados con la recompensa y conductas de tipo ansiosas o depresivas. Luego de 8 semanas bajo condiciones de *jet lag* crónico (JLC) o bajo un ciclo LD (grupo control), los ratones fueron evaluados en el test de preferencia de sacarosa (SPT, por *sucrose preference test*), seguido del test de laberinto en cruz elevado (EPM, por *elevated pluz maze*), y luego en el test de campo abierto (OF, por *open field*). Durante la semana 12 a la 14 se evaluó la motivación por una recompensa mediante el test de tasa progresiva (PR) y, por último, se realizó el test de suspensión por la cola (TST, *por tail suspensión test*).

II.3.4.2 Mediciones del peso corporal y de ingesta de alimento

El peso corporal y la ingesta de comida se monitorearon una vez por semana desde el inicio del protocolo experimental hasta el comienzo de los estudios de comportamiento (semanas 1 a 8) y durante la semana posterior a la evaluación comportamental (semana 16). Los ratones no fueron perturbados para la medición del peso corporal durante los experimentos de comportamiento, excepto cuando fue necesario (por ejemplo, para la restricción calórica durante el test de motivación).

II.3.4.3 Test de preferencia de sacarosa (SPT)

La prueba de preferencia de sacarosa se utilizó para evaluar si la desincronización forzada ocasionaba anhedonia en los animales bajo un JLC. El protocolo utilizado fue una versión modificada de un protocolo previamente publicado [Sáenz et al., 2006]. El mismo consistió en presentar a los ratones en sus jaulas dos botellas con 100 ml de una solución de sacarosa al 2% o de agua de pura. Las botellas se dejaron en la jaula al inicio de la fase nocturna (luego del apagado de las luces) y los ratones tuvieron libre acceso a las mismas durante 24 horas. Luego, se midió el volumen del líquido restante en ambas botellas y se calculó la preferencia de los ratones por consumir la solución de sacarosa como un porcentaje del consumo total de líquido según la siguiente ecuación:

$$\frac{Consumo\ de\ la\ sc.\ de\ sacarosa\ (ml)}{Consumo\ total\ de\ líquido\ (ml)}\ x\ 100$$

II.3.4.4 Test de laberinto en cruz elevado (EPM)

Para detectar comportamientos de tipo ansiosos, los ratones fueron evaluados en el test de laberinto en cruz elevado (EPM, por sus siglas en inglés "*eleveted plus maze*"). El laberinto consistió en dos brazos abiertos y dos cerrados (50 × 10 × 40 cm) hechos de madera y colocados en forma de cruz, que se encontraban elevados a 50 cm del suelo en una sala aislada. Al inicio de la prueba, se colocó al ratón en la plataforma central del aparato, con la posición de la cabeza del animal en dirección a uno de los brazos cerrados. Se registró el movimiento libre del ratón entre los distintos brazos del laberinto por 5 minutos mediante una cámara de video montada en el techo. Las grabaciones fueron luego analizadas utilizando un software comercial de análisis comportamentales en animales (ANY-maze®, Stoelting CO, Estados Unidos). Se cuantificó para cada animal el número de entradas a los brazos abiertos del laberinto, así como el tiempo de exploración de los brazos abiertos y cerrados, y la distancia total recorrida. La entrada a un brazo del laberinto se estableció cuando las cuatro patas del ratón se encontraban dentro de dicho brazo. Entre animales, el laberinto se higienizó primero con un detergente sin olor y luego se sanitizó con una solución de agua y etanol al 70%.

II.3.4.5 Test de campo abierto (OF)

Para evaluar el comportamiento exploratorio y detectar posibles conductas de tipo ansiosas se utilizó el test de campo abierto (OF, por sus siglas en inglés "*Open Field*"). En este test se les permite a los animales explorar libremente una arena novedosa. La arena utilizada consistió en un área rectangular de 30 × 50 cm rodeada por una pared de 15 cm de altura, ubicada en una sala aislada. Al inicio de la prueba, se colocó al ratón en el centro de la arena y se registró su actividad y sus desplazamientos en la arena durante 5 minutos, mediante una cámara montada en el techo. Luego, se analizó la grabación del video utilizando un software comercial de análisis comportamentales en animales (ANY-maze®, Stoelting CO, Estados Unidos). Se calculó para cada ratón evaluado: el tiempo de permanencia en el centro de la arena, el tiempo de permanencia en la periferia y las esquinas de la arena, y la distancia total recorrida. Entre animales, la arena fue higienizada primero con un detergente sin olor y luego sanitizada con una solución de agua y etanol al 70%.

II.3.4.6 Motivación por una recompensa de comida (protocolo de tasa progresiva, PR)

Para evaluar la motivación los grupos de JLC y sus controles en LD, se utilizó el mismo equipamiento, procedimiento y análisis de resultados descriptos en la sección I.3.3 del Capítulo I.

II.3.4.7 Test de suspensión por la cola (TST)

Se evaluó la "desesperanza conductual" (del inglés "*behavioral dispair")* utilizando el test de suspensión por la cola (TST, por sus siglas en inglés "*tail suspension test*") que permite analizar conductas de tipo depresivas en roedores. En este test, los ratones fueron colgados por su cola, usando una cinta adhesiva firmemente adherida a una superficie plana, de acuerdo con la metodología descripta en [Stéru et al., 1987]. Los animales se encontraban suspendidos por la cola a aproximadamente 30 cm de la superficie, y mediante una cámara de video ubicada de manera frontal, se grabó su actividad durante 6 minutos. Luego, los videos fueron analizados por

tres investigadores distintos que desconocían a qué grupo experimental pertenecía cada animal analizado. En el análisis se cuantificó de manera manual (mediante el uso de un cronómetro) el tiempo total de inmovilidad de cada ratón a lo largo de la sesión de 6 minutos. La inmovilidad se definió como el estado en el que el animal colgaba pasivamente de su cola, sin ningún movimiento de las cuatro extremidades.

II.3.4.8 Análisis de los datos

Los datos de actividad locomotora fueron analizados para detectar períodos significativos bajo ciclos LD o JLC utilizando periodogramas de Sokolove-Bushell (SB) corregidos por Bonferroni, cubriendo un rango de 20 a 27 horas [Casiraghi et al., 2012]. Los periodogramas SB se realizaron con el software El Temps (A. Díez-Noguera, Barcelona, España).

En todos los casos, la homogeneidad de varianzas y las distribuciones normales se probaron utilizando la prueba de Brown-Forsythe y la prueba de Shapiro-Wilk, respectivamente. El método ROUT (con Q establecido en 1%) se utilizó para identificar valores atípicos.

Para el análisis de los pesos y el consumo diario de comida se realizaron test de ANOVA de medidas repetidas a dos vías seguidos de post tests de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Para el análisis de los índices motivacionales y el análisis de todos los otros test comportamentales (EPM, OF, PST y TST) entre los grupos de ratones JLC-NC, JLC-NL y LD Noche se realizaron test de ANOVA a una vía seguido de post tests de Tukey para comparaciones múltiples. El análisis de la dinámica de la respuesta se realizó de la misma forma que se describe en la sección I.3.5.2 del Capítulo I.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando Graphpad Prism (GraphPad Software Inc., CA, USA). En todos los casos, el valor de alfa (α) se estableció en $p < 0.05$.

II.4 Resultados

II.4.1 Motivación por una recompensa de comida bajo condiciones de arritmicidad circadiana causa por luz constante (LL)

Con el objetivo de explorar los efectos de la arritmicidad circadiana sobre la motivación por una recompensa de comida, se sometió a un grupo de ratones a condiciones de luz constante, y luego se evaluó su motivación por una recompensa mediante el protocolo de tasa progresiva. Todos los animales estuvieron al menos 30 días bajo LL, y sólo se los entrenó y evaluó en la prueba comportamental si presentaban un patrón de actividad locomotora arrítmico. La arritmicidad fue corroborada analizando individualmente los actogramas de cada ratón mediante un periodograma de Lomb-Scargle (**Figura II.4.1**). Como grupo control, se utilizó ratones bajo condiciones normales de luz/oscuridad 12:12 que fueron evaluados en la prueba de motivación a mitad de la noche (ZT18). Los ratones bajo LD estuvieron la misma cantidad de días (al menos 30) bajo estas condiciones antes de ser evaluados comportamentalmente. Se decidió evaluar a los ratones del grupo control sólo en el punto horario nocturno teniendo en cuenta los resultados del Capítulo I y para reducir la cantidad de animales utilizados en este experimento. En el primer capítulo de esta tesis, hemos determinado que los ratones presentan un ritmo diario en la motivación por una recompensa de comida, con mayores valores motivacionales durante la noche. El momento correcto para evaluar comportamentalmente a una especie nocturna es durante su fase de actividad. Si los evaluaríamos durante el día, no sólo sería incorrecto desde un punto de vista etológico y circadiano, sino que además podríamos 'perdernos' diferencias sutiles en el desempeño de los animales debido a que su motivación en ese momento es muy baja.

La condición de arritmicidad causada por luz constante también puede afectar los ritmos de ingesta de alimentos, así como los ritmos y la actividad metabólica general de los animales. Es por ello que, previo a iniciar la restricción calórica necesaria para entrenar y testear a los ratones en el protocolo de PR, se registraron los pesos y el consumo de comida a lo largo de dos semanas de los ratones en LD y en LL. Los resultados obtenidos mostraron que los ratones en el grupo LL presentaban un mayor peso corporal respecto a los de LD a pesar de tener todos el mismo rango etario (**Figura II.4.2 A**, $p<0.0001$, t-test a dos colas con corrección de Welch). Al evaluar el consumo de comida, se observó que los ratones en LL presentaron una ingesta diaria significativamente menor a los ratones en LD (**Figura II.4.2 B**, $p<0.0001$, t-test a dos colas). Estos

resultados podrían indicar posibles desbalances a nivel metabólico en los ratones arrítmicos bajo condiciones de LL dado que, a pesar que comen menos alimento diario, tienen un mayor peso corporal que sus controles bajo un ciclo normal LD.

Figura II.4.1. Actogramas y periodogramas representativos de los ratones en el grupo de luz constante (LL) y en el grupo control (LD). Se muestran actogramas dobles representativos de **(A)** un ratón del grupo control en LD, y **(B)** y **(C)** de ratones bajo condiciones de luz constante (LL). En los actogramas se puede evidenciar a simple vista que los patrones de actividad locomotora en el grupo LL son arrítmicos. En todos los casos, la arritmicidad se corroboró mediante periodogramas, se muestran algunos representativos debajo de cada actograma. La serie temporal de datos analizada en los periodogramas corresponde a los 7 días previos al inicio de las evaluaciones comportamentales (se muestra en los actogramas con un sombreado azul). Como se puede observar, el periodograma del ratón bajo un ciclo LD muestra un pico significativo con un período de 1458 minutos (~24 hs), mientras que los ratones en LL no muestran ningún período significativo, confirmando de esta forma la arritmicidad.

Figura II.4.2. Pesos y consumo de comida en ratones bajo un ciclo de luz/oscuridad (LD) y bajo condiciones de luz constante (LL). Se realizaron medidas del pesaje corporal y del consumo de comida (alimento balanceado regular) a lo largo de dos semanas. Los ratones se encontraban alojados en jaulas individuales, alimentados *ad libitum* y bajo un ciclo LD 12:12 o bajo condiciones de luz constante (LL). Los ratones en LL mostraban patrones arrítmicos de actividad locomotora al momento de las mediciones. **(A)** Los ratones en LL presentan un mayor peso corporal respecto a los ratones en LD ($p<0.0001$, t-test a dos colas con corrección del Welch). **(B)** El consumo de comida diario es mayor en ratones en LD en comparación a los ratones en LL ($p<0.0001$, t-test a dos colas). Los datos se expresan como la media ± SEM (LD: N=15, LL: N=16). ***$p<0.001$.

En cuanto a los resultados en el protocolo de tasa progresiva, es necesario hacer unas aclaraciones previas. En animales arrítmicos, no es posible determinar un marco de referencia temporal u horario específico (es decir, un ZT o un CT) de evaluación. Bajo estas condiciones, no existen señales externas (como, por ejemplo, el apagado/encendido de las luces) debido a que la iluminación es constante, y tampoco se puede determinar un "tiempo interno" (dado que el reloj y los ritmos circadianos se encuentra desarticulados). Esto no nos permite definir un punto o fase temporal para testear a todos los animales del grupo LL en el mismo momento desde el punto de vista circadiano. En este sentido, si eligiéramos un único horario para evaluar a todos los ratones podríamos malinterpretar los resultados obtenidos debido a que no podemos saber en 'qué tiempo/momento circadiano' está cada uno. Por esta razón, se decidió evaluar a los ratones arrítmicos en diferentes horarios ('horas reloj' de los investigadores que realizaron el experimento) a lo largo de las 24 horas de un día, y comparar si existían diferencias entre estos

distintos momentos de testeo dentro del grupo de LL (**Figura II.4.3 A**). Los resultados indicaron que no se encontraron diferencias significativas entre los distintos horarios de evaluación de los ratones arrítmicos bajo LL para ninguno de los índices motivacionales medidos (**Figura II.4.3 B-D**, para presiones de palanca: p=0.1624 en test de Kruskal-Wallis; para las recompensas obtenidas: p=0.5348 en ANOVA de una vía; para *breaking point*: p=0.1690 en test de Kruskal-Wallis; N=4-8/horario). Esto indicó que, bajo condiciones de LL que inducen arritmicidad circadiana, el desempeño de los ratones en la tarea de motivación es la misma independientemente del horario de evaluación. Es por esto que, por simplicidad, se decidió agrupar todos los resultados del grupo LL en un único set de datos, y compararlos agrupados contra la motivación de los ratones control en LD (ver **Figura II.4.4 A**).

Figura II.4.3. Los ratones arrítmicos por luz constante (LL) no presentan diferencias en la motivación a distintos horarios de evaluación. (A) Los ratones fueron mantenidos bajo condiciones de luz constante (LL) hasta evidenciar arritmicidad circadiana en sus patrones de actividad locomotora. Luego, se evaluó su motivación por una recompensa de comida mediante el protocolo de tasa progresiva (PR) a distintos horarios a lo largo de 24 horas. No se encontraron diferencias significativas entre los distintos horarios de evaluación en **(B)** el número total de presiones de palanca (p=0.1624, test de Kruskal-Wallis), ni en **(C)** el número total de recompensas obtenidas (p=0.5348, ANOVA de una vía), ni para **(D)** el *breaking point* (p=0.1690, test de Kruskal-Wallis). Los datos se expresan como la media ± SEM (N=4-8/horario).

Para los índices motivacionales entre el grupo LL y los controles en LD, los resultados obtenidos indicaron que los ratones arrítmicos bajo luz constante tienen una menor motivación por la recompensa de comida en comparación con el grupo de ratones evaluado durante la noche (ZT18) del LD. Tanto el número total de presiones de palanca (**Figura II.4.4 B**, p<0.0001, test de Mann-Whitney a dos colas), como el número total de recompensas obtenidas (**Figura II.4.4 C**, t-test a dos colas), y el *breaking point* (**Figura II.4.4 D**, test de Mann-Whitney a dos colas) mostraron valores inferiores para la condición de LL respecto a los controles. Estos resultados indicaron que la arritmicidad circadiana causada por la exposición prolongada y constante a la luz afecta la motivación por una recompensa de comida en ratones.

Figura II.4.4. La arritmicidad circadiana causada por exposición a luz constante (LL) disminuye la motivación por una recompensa. (A) Ratones jóvenes fueron mantenidos bajo condiciones de luz constante (LL) hasta evidenciar arritmicidad circadiana en sus patrones de actividad locomotora. Luego, se evaluó su motivación por una recompensa de comida mediante el protocolo de tasa progresiva (PR) a distintos horarios a lo largo de 24 horas. Al no encontrarse diferencias entre horarios, los resultados de los grupos LL se agruparon como un único set de datos. Como grupo control, se midió la motivación por una recompensa a ZT18 (mitad de la noche) en ratones bajo un ciclo LD 12:12. La arritmicidad circadiana afectó negativamente la motivación, siendo sus niveles inferiores a los del grupo LD Noche, tal como se observa para **(B)** el número total de presiones de palanca (p<0.0001, test de Mann-Whitney a dos colas), **(C)** el número total de recompensas obtenidas (p<0.0001, t-test a dos colas), y **(D)** el *breaking point* (p<0.0001, test de Mann-Whitney a dos colas). Los datos se expresan como la media ± SEM (LL: N=23 y LD Noche: N=18). ***p<0.001.

En cuanto al análisis de la dinámica de la respuesta el grupo LL mostró un patrón de frecuencia de presiones bajo pero constante a lo largo de toda la sesión de motivación (**Figura II.4.5 A**). En contraposición, los ratones evaluados en la noche del LD mostraron, nuevamente, una alta frecuencia de respuesta al inicio de la sesión, que va disminuyendo con el tiempo. Al observar las distribuciones de ambos grupos, se hace muy evidente que la respuesta del grupo LL es menor en comparación a los controles. La cuantificación de esta respuesta como el área debajo de la curva (AUC) mostró que hubo diferencias significativas entre grupos y entre los intervalos de tiempo en los que se dividieron los datos (**Figura II.4.5 B**, factor Grupo: $p<0.0001$, factor Intervalo de tiempo: $p<0.0001$, Interacción: $p=0.0005$, ANOVA a dos vías). La interacción significativa probablemente sea debido a la gran diferencia entre las medias de AUC del primer intervalo de tiempo respecto a las del último intervalo, lo que genera que las pendientes de los datos no sean paralelas e independientes entre sí. En consecuencia, debemos tener en cuenta, en este caso, que la dinámica de la respuesta tiene una dependencia con el grupo. Como se mencionó, los ratones control presentan un pico significativo dentro del primer bloque, y la respuesta disminuye a lo largo del tiempo de la sesión (LD Noche: $p=0.0019$ para 0-40 min vs 40-80 min, y $p<0.0001$ para 0-40 min vs 80-120 min, post test de Tukey). Por el contrario, el grupo LL mantiene la respuesta constante en toda la sesión (LL: $p=0.9954$ para 0-40 min vs 40-80 min, $p=0.8916$ para 0-40 min vs 80-120 min, y $p=0.9293$ para 40-80 min vs 80-120 min, post test de Tukey). Asimismo, la respuesta del grupo LL es significativamente menor dentro de los dos primeros bloques respecto a los controles (LD Noche vs LL: $p<0.0001$ para 0-40 min, y $p<0.0001$ para 40-80 min, post test de Tukey). Finalmente, las curvas de persistencia a lo largo de la sesión mostraron un patrón similar entre ambos grupos, pero los ratones arrítmicos del grupo LL estuvieron significativamente por debajo de los controles en LD (**Figura II.4.5 C**, $p=0.0277$, test de Mantel-Cox). Las medianas de supervivencia son muy cercanas (medianas de supervivencia: 118.3 min para LD Noche, y 110.2min para LL) pero se evidencia, de todas formas, un mejor desempeño en la tarea para los ratones evaluados durante la noche del LD. Los resultados de la dinámica de la respuesta en conjunto nos presentan información adicional e interesante sobre la motivación de los ratones arrítmicos. El grupo LL, a pesar de presentar una respuesta mucho

menor, mantiene la respuesta constante a lo largo de toda la sesión de PR. En otras palabras, su respuesta es baja, pero consistente a lo largo de toda la prueba comportamental.

Figura II.4.5. Dinámica de la respuesta de motivación en ratones arrítmicos por luz constante (LL) y en ratones bajo un ciclo luz/oscuridad (LD) evaluados durante la noche. (A) Distribución de la frecuencia de presiones de palanca realizadas durante la sesión de motivación para ratones bajo un ciclo normal LD 12:12 o bajo condiciones de luz constante (LL). Los ratones en LD fueron evaluados a mitad de la noche (ZT18) y los ratones en LL fueron evaluados en múltiples horarios, pero los datos se muestran agrupados dado que no se encontraron diferencias entre horarios. Las líneas verticales punteadas denotan los intervalos de tiempo (de 40 min) en los que se dividió los datos para su cuantificación posterior. **(B)** Área bajo la curva de la distribución de frecuencia de presiones para los tres intervalos de tiempo elegidos (factor Grupos: $p<0.0001$, factor Intervalo de tiempo: $p<0.0001$, ANOVA a dos vías). **(C)** Porcentaje de animales que persisten en la tarea en función del tiempo que dura la sesión de motivación ($p<0.0001$, test de Mantel-Cox). Cada punto graficado representa la última presión de palanca realizada por un ratón antes de abandonar la tarea. Los datos en (A) se encuentran expresados como la media de la frecuencia, los datos en (B) se expresan como la media ± SEM (N=18 para LD Noche, N=23 para LL).

En conjunto, estos resultados demostraron que la exposición crónica a la luz, condición que genera la abolición de los ritmos circadianos en ratones, también afecta de manera negativa la ritmicidad del comportamiento de motivación por una recompensa de comida. En particular, independientemente de que los ratones en LL sean testeados en distintos momentos, sus niveles motivacionales son bajos en comparación con la motivación observada en los animales durante su fase de actividad (la noche).

II.4.2 Motivación y otros comportamientos asociados al sistema de recompensa bajo un modelo de desincronización circadiana causada por un *jet lag* crónico (JLC) experimental

El modelo de *jet lag* crónico experimental utilizado en los siguientes experimentos induce la desincronización forzada de los ritmos circadianos a causa de los repetidos adelantos de fase de 6 horas en el esquema de luz/oscuridad cada dos días ($JLC^{+6/2}$). Como consecuencia, los animales son incapaces de adaptarse y resincronizarse al nuevo ciclo debido a los cambios continuos en el esquema de iluminación, lo que induce un estado permanente de disrupción del sistema circadiano. En este modelo, se ha reportado que la desincronización interna puede ser evidenciada fácilmente en la expresión de dos componentes en los patrones de actividad locomotora de los ratones: un componente que se expresa con un período corto (menor a 24 horas), y otro componente con un período largo (mayor a 24 horas) [Casiraghi et al., 2012].

En nuestro experimento, los ratones fueron sometidos a este modelo de desincronización forzada durante dos meses antes de ser evaluados comportamentalmente. Luego de este tiempo, todos los ratones que fueron asignados al grupo de JLC mostraron la aparición de los dos componentes en los patrones de actividad locomotora (ver actograma representativo en la **Figura II.4.5**). El análisis de estos patrones se realizó mediante periodogramas de Sokolove-Bushell, los cuales arrojaron un componente de período corto significativo igual a 1260 minutos (21 horas) y un componente de período largo significativo de promedio 1511 ± 6.5 minutos (25.2 ± 0.11 horas, media ± SD). En la **Tabla II.4.6** se pueden apreciar los valores de ambos componentes obtenidos para los ratones del grupo JLC. Estos resultados indicaron que los todos los ratones bajo el

protocolo JLC se encontraban desincronizados al momento del inicio de las pruebas comportamentales.

Figura II.4.5 Los patrones de actividad locomotora son un indicativo de la desincronización interna en el protocolo de JLC. Se muestran actogramas dobles representativos y periodogramas de Sokolove-Bushell para **(A)** un ratón bajo un ciclo de luz/oscuridad (LD) 12:12 y **(B)** un ratón bajo el protocolo de $JLC^{+6/2}$. Los ratones asignados al protocolo de JLC fueron primero mantenidos durante 15 días bajo un ciclo LD normal. El sombreado rosa sobre los actogramas indica los momentos de oscuridad en los esquemas de iluminación. En los periodogramas, la línea oblicua indica el nivel de significancia de p=0.05, los picos que superan dicho nivel representan períodos significativos. El análisis de periodograma muestra un único componente de período 1440 min (24 hs) para las condiciones de LD, y dos componentes de períodos 1260 min (21 hs) y 1510 min (25.17 hs) para condiciones de JLC.

Grupo de JLC	Pico de período corto (min)	Pico de período largo (min)
Ratón 1	**1260**	**1514**
Ratón 2	**1260**	**1512**
Ratón 3	**1260**	**1491**
Ratón 4	**1260**	**1511**
Ratón 5	**1260**	**1512**
Ratón 6	**1260**	**1511**
Ratón 7	**1260**	**1510**
Ratón 8	**1260**	**1510**
Ratón 9	**1260**	**1515**
Ratón 10	**1260**	**1512**
Ratón 11	**1260**	**1516**
Ratón 12	**1260**	**1513**

Tabla II.4.6. Longitud del período (en minutos) de las dos componentes (corto, menor a 24 hs, y largo, mayor a 24 hs) de los patrones de actividad locomotora de todos los ratones bajo el protocolo de JLC. Los períodos se obtuvieron a partir de los picos significativos del análisis de los periodogramas para cada ratón. Para el análisis se tomaron como datos los 15 días comprendidos entre las semanas 6-8 del protocolo de JLC.

Por otro lado, a lo largo del protocolo experimental se realizaron mediciones semanales del consumo de comida y del peso corporal de los ratones en JLC y sus controles en LD. Los resultados mostraron que no se encontraron diferencias significativas en el consumo de comida (**Figura II.4.7 A**, factor Grupo: $p=0.7428$, factor Tiempo: $p<0.0001$, Interacción: $p=0.8226$, ANOVA a dos vías de medidas repetidas) ni en los pesos (**Figura II.4.7 B**, factor Grupo: $p=0.7933$, factor Tiempo: $p<0.0001$, Interacción: $p= 0.8847$, ANOVA a dos vías de medidas repetidas) entre el grupo de JLC y el grupo LD a lo largo de las semanas de duración del experimento.

Figura II.4.7. Consumo de comida y peso corporal de los ratones bajo un JLC o un ciclo LD a lo largo del protocolo experimental. A lo largo de todo el experimento (de una duración total de 16 semanas) se midió el consumo de comida (alimento balanceado regular) y se pesó a los animales semanalmente, salvo durante las semanas en las que los animales fueron evaluados en la batería de tests comportamentales (recuadro gris). Los ratones se encontraban alojados en jaulas individuales, alimentados *ad libitum* y bajo un ciclo LD 12:12 o bajo un protocolo de JLC. No se encontraron diferencias significativas entre grupos para **(A)** el consumo de comida (factor Grupo: p=0.7428, factor Tiempo: p<0.0001, ANOVA a dos vías de medidas repetidas) y **(B)** el peso corporal de los animales (factor Grupo: p=0.7933, factor Tiempo: p<0.0001, ANOVA a dos vías de medidas repetidas). Los datos se muestran como la media ± SEM (N=8 para LD, N=12 para JLC).

II.4.2.1 Motivación por una recompensa de comida bajo condiciones de JLC

Uno de los principales objetivos del presente capítulo fue determinar si la desincronización circadiana era capaz de afectar la motivación por una recompensa de comida en ratones. Para ello, evaluamos en el protocolo de tasa progresiva al grupo de ratones en JLC y a sus respectivos controles bajo un ciclo normal de LD. Basándonos nuevamente en los resultados obtenidos en el Capítulo I, todos los animales fueron evaluados en la prueba comportamental durante la noche, coincidente con su fase de actividad.

La elección del horario de evaluación en animales bajo un JLC tiene algunas dificultades. En principio, tomar como referencia un horario del *zeitgeber* (ZT) presenta la complicación de que, a causa de los adelantos de fase crónicos, las transiciones de luz a oscuridad no ocurren “siempre al mismo horario”. Durante la noche que ocurre el adelanto de fase, los animales experimentan una ‘noche corta’ de sólo 6 horas de oscuridad por lo que, en este caso, el ZT12 no

coincidiría con el apagado de las luces. Asimismo, a pesar de que durante la 'noche larga' los animales tienen 12 horas continuas de oscuridad, esa noche puede no necesariamente "coincidir en horario" con las noches largas previas (para una mejor comprensión ver en la Figura II.3.1 de la sección II.3.4 de la metodología cómo el esquema de iluminación vuelve a coincidir luego de 7 días). Por otro lado, los ratones bajo estas condiciones experimentan una desincronización interna de sus ritmos por lo que no es posible definir un horario circadiano (CT). Afortunadamente, el modelo de JLC elegido tiene una ventaja: los ratones muestran en su actividad locomotora dos claros patrones que se expresan con diferente período. Debido a estas diferencias en el período, cada cierto tiempo, ambos componentes coinciden entre sí, y se puede observar en los actogramas un "bloque de mayor actividad" que a su vez es coincidente con los momentos de oscuridad en el protocolo experimental (ver recuadro amarillo en la **Figura II.4.8**). En este sentido, podríamos definir a esos bloques como la "verdadera noche" de los animales en el protocolo de JLC, dado que se observa que la mayor actividad locomotora es coincidente con la noche del esquema de iluminación. Podríamos, entonces, utilizar ese momento para evaluar comportamentalmente a los animales. Ahora bien, dentro de este "bloque" nocturno, los ratones experimentan noches cortas y noches largas debido a los adelantos de fase que ocurren cada dos días. Debido a que *a priori* no podemos saber si la motivación es distinta en la noche larga o en la noche corta, debemos evaluarla en ambas. Así, para evaluar a los ratones en la tarea de motivación subdividimos el grupo de JLC en dos: un grupo de ratones testeados en la noche corta (JLC-NC) y otro grupo testeado en la noche larga (JLC-NL). En ambos grupos el entrenamiento y el testeo en el protocolo de PR iniciaron 2 horas luego del apagado de las luces. Adicionalmente, para cumplir con el criterio de entrenar a todos los ratones 2 horas luego del apagado de las luces a lo largo de los 5 días del protocolo de PR, el momento de entrenamiento ('hora reloj' de los investigadores) es distinto a lo largo de los días sucesivos, tal como se evidencia en la Figura II.4.8. Asimismo, la denominación de los grupos como JLC-NC y JLC-NL hace referencia a que el día de la sesión de testeo de motivación (último día del protocolo de PR) coincide con la noche que los ratones experimentarán o no el adelanto de fase, y, en consecuencia, tendrán una noche corta o larga (ver el último recuadro verde que representa la sesión de testeo en los actogramas representativos en la Figura II.4.8). Hechas todas estas aclaraciones pertinentes del grupo JLC,

para el grupo de ratones control bajo un ciclo LD 12:12, la motivación por una recompensa de comida fue evaluada también 2 horas luego del apagado de las luces que, en este caso, se puede definir como ZT14.

Figura II.4.8. Subdivisión del grupo de ratones en JLC según el momento de evaluación comportamental. Se muestran dos actogramas simples representativos de ratones bajo el protocolo de JLC. El sombreado rosa sobre los actogramas indica los momentos de oscuridad en el esquema de iluminación. Luego de varias semanas bajo este protocolo, los ratones presentan desincronización interna de sus ritmos que se evidencias mediante dos componentes de actividad locomotora con distintos períodos: corto (línea azul) y largo (línea roja). Para evaluar comportamentalmente al grupo JLC se eligió los momentos en que ambos componentes se cruzan, donde los animales muestran la mayor actividad locomotora y, a su vez, esto es coincidente con la fase de oscuridad (noche) del esquema de iluminación (recuadro amarillo), lo que representaría su "noche verdadera". Dado que en estos bloques de "noche verdadera" los animales experimentan noches cortas (6 hs de oscuridad) y noches largas (12 hs de oscuridad), se subdividió al grupo JLC para ser evaluados en ambas noches. **(A)** En el grupo JLC-NC la sesión de testeo de motivación (último recuadro verde indicado con una flecha verde) se realizó durante la noche corta. **(B)** Para el grupo JLC-NL la sesión de testeo de motivación se realizó durante la noche larga (ultimo recuadro verde indicado por una flecha verde).

Respecto a los resultados obtenidos en el protocolo de PR para evaluar la motivación por una recompensa de comida (**Figura II.4.9 A**), el análisis de los índices motivacionales indicó que el grupo de ratones JLC-NC mostró niveles significativamente menores de presiones de palanca (**Figura II.4.9 B**, p=0.0366, ANOVA de una vía; p=0.0395 para LD Noche vs JLC-NC, post test de Tukey), cantidad de recompensas obtenidas (**Figura II.4.9 C,** p=0.0153, ANOVA de una vía; p=0.0124 para LD Noche vs JLC-NC, post test de Tukey) y *breaking point* (**Figura II.4.9 D**, p=0.0272, ANOVA de una vía; p=0.0298 para LD Noche vs JLC-NC, post test de Tukey) en comparación con el grupo control evaluado en la noche del LD. Para el grupo de JLC evaluado en la noche larga (JLC-NL), no se encontraron diferencias significativas respecto a los controles o al grupo JLC-NC; sin

Figura II.4.9. La desincronización circadiana causada por JLC afecta la motivación por una recompensa. (A) Los ratones fueron expuestos a un protocolo de *jet lag* crónico (JLC) experimental o a un ciclo de LD 12:12 (grupo control) y se evaluó su motivación por una recompensa de comida mediante el protocolo de tasa progresiva (PR) durante la noche, dos horas luego del apagado de las luces. Para JLC, los ratones fueron evaluados en dos momentos: durante la noche corta (JLC-NC) o la noche larga (JLC-NL). El grupo control fue evaluado a ZT14. Los niveles motivacionales de los ratones del grupo JLC-NC fueron inferiores respecto a los controles en LD, tal como se observa para **(B)** el número total de presiones de palanca (p=0.0366, ANOVA de una vía), **(C)** el número total de recompensas obtenidas (p=0.0153, ANOVA de una vía), y **(D)** el *breaking point* (p=0.0272, ANOVA de una vía). El análisis *posthoc* se realizó mediante test de Tukey para comparaciones múltiples. Los datos se expresan como la media ± SEM (LD Noche: N=8, JLC-NL: N=6, JLC-NC: N=5). *p<0.05.

embargo, muestran niveles de motivación 'intermedios' entre estos dos. Así, estos resultados demostraron menores niveles motivacionales por una recompensa de comida en los ratones bajo condiciones de JLC y, en particular, cuando son evaluados durante la noche corta.

Al analizar la dinámica de la respuesta en los animales bajo JLC y sus controles podemos observar que la distribución de la frecuencia de presiones a lo largo de la sesión de motivación presenta, a simple vista, diferencias entre los grupos respecto a la intensidad de la respuesta (**Figura II.4.10 A**). En el grupo LD Noche podemos observar una alta frecuencia de presiones que es constante a lo largo de los 120 minutos de la sesión de PR. La respuesta de los grupos bajo JLC también es relativamente constante a lo largo de la sesión, pero la frecuencia es menor que en el grupo control. De hecho, el grupo de JLC-NL muestra 'dos picos' de respuesta, uno en el primer bloque (0-40 min) y otro en el último bloque (80-120 min), mientras que en el grupo JLC-NC esto no ocurre y su frecuencia es menor. La cuantificación de esta respuesta, expresada como el área bajo la curva (AUC) de cada bloque de intervalos de tiempo, corrobora lo antes expuesto (**Figura II.4.10 B**, factor Grupos: $p<0.0001$, Factor Intervalos de tiempo: $p=0.0913$, Interacción: $p=0.6959$, ANOVA a dos vías). En el primer bloque, de 0-40 minutos, ambos grupos de JLC presentan diferencias significativas y una menor AUC respecto a los controles en LD ($p<0.0001$ para LD Noche vs JLC-NC, y $p=0.0152$ para LD Noche vs JLC-NL, post test de Tukey). Lo mismo ocurre en el segundo bloque, de 40-120 minutos, ($p=0.0019$ para LD Noche vs JLC-NC, y $p=0.0016$ para LD Noche vs JLC-NL, post test de Tukey). Finalmente, en el bloque final de 80-120 minutos los controles presentan una mayor AUC sólo respecto a los ratones en JLC evaluados en la noche corta ($p=0.0026$ LD Noche vs JLC-NC, $p=0.1415$ LD Noche vs JLC-NL, postest de Tukey). Entre los grupos de JLC no se encontraron diferencias significativas en la cuantificación de la distribución de la frecuencia para ningún intervalo de tiempo. Por otro lado, la persistencia de los animales a lo largo de la sesión de motivación no arrojó diferencias significativas entre grupos (**Figura II.4.10 C**, $p=0.3369$, test de Mantel-Cox). Todos los grupos evaluados permanecen activos realizando la tarea hasta el final de la sesión, y aunque las medianas de supervivencia indiquen una pequeña tendencia hacia un mejor desempeño en el grupo control, estas diferencias no alcanzaron la significancia estadística (medianas de supervivencia: 118.9 min para LD Noche, 116 min para JLC-NL, 116.9 min para JLC-NC). En conjunto, estos resultados permitieron evidenciar que la menor

motivación encontrada en el grupo de JLC-NC podría deberse a una menor intensidad o vigor motivacional en la tarea comportamental, que se observa, principalmente, al comparar los valores de frecuencia de la respuesta. Asimismo, el grupo de JLC-NL también muestra una menor intensidad en la respuesta en comparación a los controles.

Figura II.4.10. Dinámica de la respuesta de motivación en ratones bajo un protocolo de *jet lag* crónico (JLC) y en sus controles bajo un ciclo luz/oscuridad (LD) evaluados durante la noche. (A) Distribución de la frecuencia de presiones de palanca realizadas durante la sesión de motivación para ratones bajo un ciclo normal LD 12:12 (LD Noche) o bajo el protocolo de JLC evaluados en la noche larga (JLC-NL) o en la noche corta (JLC-NC). Todos los grupos fueron evaluados dos horas luego del apagado de las luces. Las líneas verticales punteadas denotan los intervalos de tiempo (de 40 min) en los que se dividió los datos para su cuantificación posterior. **(B)** Área bajo la curva de la distribución de frecuencia de presiones para los tres intervalos de tiempo elegidos (factor Grupos: $p<0.0001$, factor Intervalo de tiempo: $p=0.0913$, ANOVA a dos vías). **(C)** Porcentaje de animales que persisten en la tarea en función del tiempo que dura la sesión de motivación ($p=0.3369$, test de Mantel-Cox). Cada punto graficado representa la última presión de palanca realizada por un ratón antes de abandonar la tarea. Los datos en (A) se encuentran expresados como la media de la frecuencia, los datos en (B) se expresan como la media ± SEM (N=8 para LD Noche, N=6 para JLC-NL, y N=5 para JLC-NC). *$p<0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$.

II.4.2.2 Evaluación de conductas de tipo ansiosas, depresivas y anhedonia en ratones bajo condiciones de JLC

La falta de sincronización entre el sistema circadiano y el ciclo externo de luz/oscuridad conlleva graves consecuencias negativas para el organismo cuando esta desincronización ocurre de manera crónica. Estudios recientes han demostrado que, bajo otros modelos de desincronización por JLC, los ratones exhiben comportamientos de tipo depresivos [Chen et al., 2021]. Asimismo, dado que el sistema de recompensa del cerebro no sólo está involucrado en las respuestas motivadas sino también en el procesamiento del placer y la generación de emociones, nos propusimos evaluar en nuestro modelo de *jet lag* crónico ($JLC^{+2/6}$) si además de los déficits motivacionales los animales presentaban afecciones en otros comportamientos relaciones con el estado de ánimo (*mood-related behaviors*). Para ello, evaluamos a los grupos de ratones bajo JLC y a sus controles en LD en una batería de test comportamentales para evidenciar conductas ansiosas, anhedónicas y de tipo depresivas ampliamente utilizadas en la literatura. Los horarios de evaluación fueron los mismos que los descriptos previamente para evaluar la motivación por una recompensa.

Las conductas de tipo ansiosas fueron evaluadas mediante dos tests comportamentales: el laberinto en cruz elevado (EPM, por *elevated plus maze*) y el campo abierto (OF, por *open field*). Este tipo de pruebas permite registrar el comportamiento exploratorio de los ratones en diferentes contextos a partir del cual se pueden inferir conductas de tipo ansiosas. El EPM evalúa la ansiedad relacionada con la aversión a explorar una plataforma abierta y en elevación, ya que los ratones tienden a preferir los brazos cerrados del laberinto, donde están más protegidos, y evitar ambientes abiertos y expuestos. Asimismo, el test de OF permite evaluar la misma aversión de los ratones a los espacios abiertos y expuestos, pero utilizando una superficie (arena) a nivel, amplia y con forma rectangular. En este caso, los animales muestran conductas ansiogénicas al reducir el tiempo de permanencia en el centro (el lugar de mayor exposición) y aumentar su exploración por los bordes (periferia) y rincones de la arena. En este tipo de tests es muy común utilizar las condiciones de iluminación (ajustando la intensidad de la luz) para aumentar la ansiogénesis. Esto se debe a que los roedores, especialmente los nocturnos, tienen la tendencia natural a evitar la exposición directa a la luz al explorar nuevos entornos, lo que les permite

sentirse menos vulnerables. En nuestro caso, todas las pruebas comportamentales se realizaron bajo una luz roja tenue (> a 5 lux), en primer lugar, porque evaluamos a los ratones durante la noche ya que es el momento correcto (fase de actividad) para evaluar comportamentalmente a una especie nocturna. En segundo lugar, y a consecuencia de lo anterior, porque si hubiésemos expuesto a los ratones a la luz durante la noche estaríamos modificando la fase de los ritmos debido al efecto que la sincronización fótica tiene sobre la curva de respuesta de fase de animales nocturnos (la PRC, como vimos en la Introducción de este capítulo, sección II.1.1).

Respecto a los resultados conductuales, el test de EPM no arrojó diferencias significativas entre los grupos en JLC y los controles en LD para ninguno de los indicadores medidos. La distancia total recorrida en los grupos de ratones en JLC-NL, JLC-NC y LD Noche fue la misma (**Figura II.4.11 B**, p=0.8670, ANOVA de una vía), así como el tiempo de permanencia en los brazos cerrados del laberinto (**Figura II.4.11 C**, p=0.2284, ANOVA de una vía), en los brazos abiertos (**Figura II.4.11 D**, p=0.4137, ANOVA de una vía), y al cuantificar la cantidad de entradas a los brazos abiertos (**Figura II.4.11 E**, p=0.0960, ANOVA de una vía). Por otro lado, la evaluación en el test de OF mostró diferencias significativas entre el grupo de JLC-NC respecto a JLC-NL y los controles en LD. En particular, el grupo de JLC evaluado en la noche corta presentó un menor tiempo de exploración en el centro de la arena (**Figura II.4.12 C**, p=0.0430, ANOVA de una vía; p=0.0408 para LD Noche vs JLC-NC, post test de Tukey), lo que se condice con un mayor tiempo de exploración por la periferia (**Figura II.4.12 D**, p=0.0430, ANOVA de una vía; p=0.0408 para LD Noche vs JLC-NC, post test de Tukey) y un mayor tiempo de permanencia en las esquinas (**Figura II.4.12 E**, p=0.0254, ANOVA de una vía; p=0.0268 para LD Noche vs JLC-NC, post test de Tukey) respecto a los controles y a los JLC-NL. Asimismo, los distintos grupos evaluados no mostraron diferencias en la distancia total recorrida en la arena durante la sesión (**Figura II.4.12 B**, p=0.0599, ANOVA de una vía) lo que refleja que las diferencias obtenidas en los tiempos de exploración no se deben a que los ratones en JLC-NC tienen una menor actividad exploratoria. En conjunto, estos resultados muestran un fenotipo 'mixto' de comportamientos relacionados con la ansiedad. Específicamente, se observa un comportamiento ansioso en el grupo de JLC-NC durante el test de campo abierto, mientras que no se detectan indicadores de comportamiento ansioso en la prueba del laberinto en cruz elevado. Por lo tanto, dependiendo del contexto o la prueba comportamental utilizada, podemos

o no evidenciar la respuesta ansiogénica de los ratones bajo un protocolo de JLC evaluados durante la noche corta.

Figura II.4.11. Los ratones en JLC no muestran fenotipos de ansiedad en el test de laberinto en cruz elevado (EPM). (A) El EPM consiste en una plataforma en elevación y con forma de cruz, que tiene brazos abiertos y cerrados por la que los ratones pueden explorar libremente durante 5 minutos. No se encontraron diferencias entre los grupos en JLC y los controles en LD para ninguno de los índices medidos en el test, tal como indican **(B)** la distancia total recorrida (p=0.8670, ANOVA de una vía), **(C)** el tiempo de permanencia en los brazos cerrados (p=0.2284, ANOVA de una vía), **(D)** el tiempo de permanencia en los brazos abiertos (p=0.4137, ANOVA de una vía), y **(E)** la cantidad de entradas a los brazos abiertos (p=0.0960, ANOVA de una vía). Los datos se muestran como la media ± SEM (N=8 para LD Noche, N=6 para JLC-NL, y N=6 para JLC-NC).

Figura II.4.12. El JLC induce comportamiento de tipo ansioso cuando los ratones son evaluados en la noche corta. (A) El test de campo abierto (OF) consiste en una superficie rectangular amplia (arena) en la que los ratones pueden explorar libremente durante 5 minutos. Los ratones tienden a evitar explorar el centro de la arena (cuadrado rojo) dado que es la zona de mayor exposición. Asimismo, pasan mayor tiempo explorando la periferia de la arena o en las esquinas (recuadros verdes). **(B)** Los grupos evaluados no mostraron diferencias en la distancia total recorrida en la arena (p=0.0599, ANOVA de una vía). Sin embargo, los ratones del grupo JLC-NC evidenciaron un mayor comportamiento ansioso, tal como se observa en (C) el tiempo de permanencia en el centro de la arena (p=0.0430, ANOVA de una vía), (D) el tiempo de permanencia en la periferia (p=0.0430, ANOVA de una vía), y (E) el tiempo de permanencia en las esquinas de la arena(p=0.0254, ANOVA de una vía). Los datos se muestran como la media ± SEM (N=8 para LD Noche, N=6 para JLC-NL, y N=6 para JLC-NC).

Por otra parte, la anhedonia y la desesperanza conductual (del inglés "*behavioral dispair*", también llamada 'desesperanza aprendida'[3]) representan dos síntomas esenciales asociados con la depresión. Asimismo, como vimos en el Capítulo I de esta tesis, la respuesta hedónica es parte

[3] Este concepto utilizado en la psicología se refiere a una condición en la que un sujeto aprende a percibir situaciones difíciles o estresantes como insuperables, lo que resulta en un estado de pasividad o falta de intentos para escapar o evitar tales situaciones, debido a que no tienen control sobre el resultado.

del mecanismo de la recompensa y la motivación. En modelos animales, estos estados pueden ser observados y medidos utilizando el test de preferencia de sacarosa (SPT, por "*sucrose preference test*") y el test de suspensión por la cola (TST, por "*tail suspensión test*"), respectivamente.

El SPT consiste en presentarle a los animales en su jaula la opción de dos botellas: una que contiene una solución al 2% de sacarosa y la otra que contiene sólo agua. Luego, se mide la cantidad de mililitros consumidos de ambas botellas a lo largo de un periodo determinado de tiempo (generalmente 24 horas), y se calcula el porcentaje de preferencia por la solución azucarada. Cuando este porcentaje es bajo, es un indicador de un estado de anhedonia dado que la mayoría de los ratones, bajo condiciones normales, tiene preferencia por la solución con sacarosa (que tiene un alto valor hedónico). Este test es el único de los experimentos comportamentales que se midió a lo largo de 24 horas. Para poder llevarlo a cabo en los dos grupos de ratones bajo JLC, se le presentó la opción de las dos botellas en el momento del apagado de las luces en la noche que ocurre el adelanto (grupo JLC-NC) o en la noche larga de 12 horas (grupo JLC-NL), y en ambos casos, las botellas se retiraron 24 horas después. Para los controles en LD, también se presentaron las botellas al apagarse las luces (ZT12). Los resultados obtenidos indicaron que el grupo control presentó una mayor preferencia por la solución de sacarosa (88.1%) comparado con ambos grupos de ratones bajo JLC (70.9% para JLC-NL y 69.7% para JLC-NC; **Figura II.4.13**, p=0.0142, ANOVA de una vía; p=0.0304 para LD Noche vs JLC-NL y p=0.0194 para LD Noche vs JLC-NC, post test de Tukey). En conclusión, los ratones que se encontraban desincronizados a causa del protocolo de JLC presentaron características anhedónicas, con independencia de si la evaluación se realizó en la noche corta o en la noche larga.

En cuanto al TST, como se mencionó, permite medir la desesperanza conductual como un indicador de comportamientos de tipo depresivos en roedores. El test consiste en suspender a los ratones por su cola (evitando que los animales puedan trepar por ella) y documentar la cantidad de tiempo que el animal permanece suspendido inmóvil a lo largo de 6 minutos. Al encontrarse en esta posición de suspensión que es sumamente estresante, inicialmente el ratón intenta activamente encontrar una salida mediante movimientos de escape. Sin embargo,

Figura II.4.13. La desincronización interna causada por el JLC produce anhedonia en ratones. (A) El test de preferencia de sacarosa se utiliza para evidenciar conductas anhedónicas (falta de placer) en roedores. Consiste en presentarle al ratón dos botellas en su jaula (una con una solución de sacarosa y la otra con agua) durante 24 horas y medir el consumo de ambas. **(B)** Ambos grupos de JLC evidenciaron un menor porcentaje de preferencia por la solución con sacarosa respecto a los ratones del grupo control en LD (p=0.0142, ANOVA de una vía)., lo que indica la presencia de anhedonia causada por el JLC. Los datos se muestran como la media ± SEM (N=8 para LD Noche, N=12 para JLC-NL, y N=12 para JLC-NC).

después de un tiempo, al ver que las conductas emitidas no generan una salida de dicha situación, el animal desiste de estos intentos de escape y adopta una postura de inmovilidad, lo que se interpreta como un comportamiento de desesperanza o "resignación". Se asume que cuanto mayor es el tiempo de inmovilidad, mayor es el nivel de desesperanza, lo que indica una mayor severidad del estado de tipo depresivo. Por medio de este test, evaluamos si la desincronización forzada y crónica causada por el JLC era capaz de generar desesperanza conductual en los ratones. Los resultados obtenidos mostraron que el tiempo de inmovilidad en el TST era mayor para el grupo de JLC-NC respecto a los otros grupos (**Figura II.4.14**, p<0.0001, ANOVA de una vía con corrección de Welch; p<0.0001 para LD Noche vs JLC-NC, post test de Games-Howell). Sin embargo, en el grupo de JLC-NL se observó una gran dispersión en los datos, que no es evidente en los otros grupos, lo que indica una mayor variabilidad en la respuesta de los ratones de este grupo. En conjunto, estos resultados indicaron que los ratones bajo JLC presentan un estado de

tipo depresivo particularmente cuando son evaluado en la noche corta, es decir, previo al adelanto de fase.

Figura II.4.14. EL JLC produce conductas de tipo depresivas en los ratones evaluados en la noche corta. (A) El test de suspensión de la cola se utiliza para evaluar la desesperanza conductual, un indicador de la depresión. Consiste en suspender al ratón firmemente por su cola durante 6 minutos y cuantificar el tiempo que el animal permanece inmóvil. **(B)** Los ratones evaluados en la noche corta (JLC-NC) presentaron un mayor tiempo de inmovilidad respecto a los otros grupos ($p<0.0001$, ANOVA a una vía con corrección de Welch) lo que indica una conducta de tipo depresiva. Los datos se muestran como la media ± SEM. N=7 para LD Noche (1 *outlier* detectado), N=6 para JLC-NL, y N=5 para JLC-NC (1 *outlier* detectado). Las comparaciones *posthoc* se realizaron mediante el test de Games-Howell para comparaciones múltiples. ***$p<0.001$.

II.5. Discusión

En el primer capítulo de esta tesis hemos determinado que el comportamiento de motivación por una recompensa se encuentra bajo regulación del sistema circadiano en ratones. En este segundo capítulo, el objetivo fue evidenciar qué ocurre con dicho comportamiento bajo condiciones de disrupción circadiana. Para ello, utilizamos dos modelos muy utilizados en el ámbito de la Cronobiología: la arritmicidad circadiana causada por exposición a luz constante (LL), y la desincronización interna forzada causada por un *jet lag* crónico (JLC) experimental. Dado que el protocolo de JLC utilizado fue desarrollado, puesto a punto y es ampliamente utilizado en nuestro laboratorio, a modo de continuar la caracterización y validación del modelo, nos propusimos evidenciar si otros comportamientos relacionados con el sistema de la recompensa y la gestión emocional se veían afectados como consecuencia de la desincronización crónica.

5.1 La arritmicidad circadiana causada por exposición a luz constante (LL) afecta el ritmo y los niveles de motivación por una recompensa de comida

Las condiciones de luz constante producen en primera instancia un alargamiento del período endógeno, seguido de arritmicidad circadiana en ratones (Moriya et al., 2000). Bajo estas condiciones, los animales muestran un patrón fragmentado de actividad locomotora, en el cual no es posible identificar un período significativo, ni tampoco fases definidas de actividad o reposo (como, en contraposición, sí ocurre en ratones bajo condiciones de oscuridad constante, donde se observan “días y noches subjetivos” coincidentes con los momentos de reposo y actividad del animal). Asimismo, no solo los patrones de actividad y otros ritmos circadianos se ven afectados bajo condiciones de luz constante, sino que también se ha demostrado que la afección ocurre a nivel del reloj molecular [Sudo et al., 2003]. Es por esto que este tipo de ciclos ambientales se han utilizado como un modelo simple para evaluar ratones arrítmicos desde el punto de vista circadiano.

Como se explicó en la Introducción de este capítulo, la variabilidad del fenotipo expresado en roedores bajo condiciones de luz constante es alta, y depende de la especie, la intensidad de la iluminación y el tiempo de exposición. En el presente experimento se utilizó una intensidad de luz alta (200 lux) y un tiempo de exposición grande (más de 30 días) para favorecer la inducción

de la arritmicidad. Todos los ratones evaluados comportamentalmente en este experimento mostraban patrones arrítmicos de actividad locomotora, lo cual fue chequeado mediante periodogramas. En este sentido, a pesar de la variabilidad intraindividual que los roedores suelen presentar bajo condiciones de luz constante, el experimento realizado aquí intentó estandarizar estas diferencias para poder correlacionar los niveles motivacionales por una recompensa de comida a un contexto de arritmicidad circadiana.

Al no poder determinar una referencia temporal para evaluar a los ratones arrítmicos del grupo LL, se decidió hacerlo en distintos momentos a lo largo de las 24 horas de un día. Como era de esperarse, los animales arrítmicos no mostraron diferencias significativas en la motivación por comida entre los distintos horarios de evaluación (**Figura II.4.3**), lo que permitió agrupar los datos en un solo set con independencia del horario de testeo. Por otro lado, para poder determinar si había un efecto sobre la motivación bajo condiciones de LL, fue necesario comparar el desempeño en la tarea con la de un grupo control. En este caso, y basándonos en los resultados obtenidos en el Capítulo I, el grupo control consistió en ratones bajo un ciclo normal de LD 12:12 evaluados durante su fase de actividad (mitad de la noche), que es el momento correcto para evaluar conductualmente a una especie nocturna. Los resultados obtenidos mostraron que los niveles motivacionales del grupo de ratones bajo LL eran significativamente inferiores respecto a los de los ratones evaluados en la noche del LD (**Figura II.4.4**). En este sentido, podemos concluir que la exposición crónica a luz afecta negativamente el comportamiento de motivación por una recompensa en ratones, disminuyendo en gran medida sus niveles motivacionales.

Resulta interesante discutir sobre las dos consecuencias que la exposición a la luz constante tuvo en la motivación por una recompensa: la abolición del ritmo de motivación y, al mismo tiempo, la disminución de los niveles motivacionales. La primera consecuencia, tiene lógica si tenemos en cuenta que los ratones presentaban arritmicidad cuando fueron evaluados en el protocolo de PR. La arritmicidad es la pérdida del patrón oscilatorio de una variable, es decir, la variable que antes tomaba distintos valores a lo largo del tiempo ahora mantiene sus valores constantes. Sin embargo, la arritmicidad no nos indica la magnitud (mayor, menor o igual) que va a tomar la variable al perder el ritmo y mantenerse constante. En este sentido, los resultados obtenidos además nos indican que ese valor constante en la motivación (a causa de la

arritmicidad) es menor comparado con la motivación que muestran los ratones bajo condiciones normales. Como hemos discutido ampliamente en el Capítulo I de esta tesis, la luz podría tener un efecto dual sobre la motivación y los circuitos neuronales de la recompensa. Por un lado, su alternancia cíclica en un esquema normal de LD sincroniza al sistema circadiano, modulando rítmicamente la salida comportamental por la obtención de recompensas. En otras palabras, la motivación está regulada circadianamente y está bajo control del reloj central cuyo principal sincronizador ambiental es el ciclo de luz/oscuridad. Por otro lado, la luz puede impactar de manera directa (y con independencia del reloj central) en los circuitos de la recompensa para modular las emociones y los comportamientos recompensados. En este sentido, los resultados del Capítulo I y otros trabajos previos [LeGates et al., 2012; Fernández et al., 2018] sugerirían que la luz tiene un efecto agudo depresor (o de disminución) sobre los niveles motivacionales. Teniendo en cuenta esto, y en relación con los resultados obtenidos en este segundo capítulo, no podemos disociar los efectos de la arritmicidad circadiana de los efectos agudos de la luz sobre el comportamiento de motivación. ¿La arritmicidad circadiana *per se,* independientemente del protocolo utilizado*,* disminuye los niveles motivacionales de los ratones además de la abolición del ritmo motivacional? ¿O es el efecto directo de la luz impactando en el sistema de recompensa lo que disminuye los niveles de motivación que, además, se mantienen constantes por la arritmicidad circadiana? Estos interrogantes deberán ser respondidos mediante experimentos adicionales en el futuro. Por ejemplo, se podrían utilizar ratones arrítmicos genéticos (es decir, que tengan mutaciones en los genes reloj) o con lesión de los NSQ para evaluar su motivación en el protocolo de PR en distintos momentos y comparar sus niveles motivacionales contra los *wild type*. De esta forma, podríamos independizarnos de utilizar un protocolo de luz constante para inducir la arritmicidad, y discernir si la disminución de los niveles motivacionales es una consecuencia de la arritmicidad circadiana o no. Por otro lado, estos experimentos podrían ser complementados por otros en los que se utilicen ratones con deleciones de las vías neuronales que llevan la información lumínica de forma directa desde la retina hacia los circuitos de la recompensa (la vía ipGRC-PHb-NAc mencionada en la sección I.5.2 de la discusión del Capítulo I). Estos ratones ya existen y son los utilizados en los experimentos de Fernández y colaboradores (2018) para caracterizar dicha vía neuronal. En este sentido, se podría utilizar estos ratones

mutantes y exponerlos a un protocolo de luz constante (LL) para inducir arritmicidad circadiana y luego evaluar su motivación por una recompensa. Al compararlos contra los *wild type* (también bajo LL para inducir arritmicidad) podríamos evidenciar si existen diferencias en los niveles motivacionales y discernir si hay o no un efecto agudo de la luz en la motivación de los ratones arrítmicos.

Por otro parte, la dinámica de la respuesta de los ratones en LL en comparación a los controles (**Figura II.4.5**) muestra que la exposición a luz constante genera que los animales se mantengan activos presionando la palanca durante toda la sesión de motivación, pero con una muy baja frecuencia de presiones. En otras palabras, el grupo LL tiene una respuesta baja y constante. Aquí, podríamos discutir que los ratones en LL podrían tener afectado el componente "activacional" de la motivación de forma parcial. Recordemos que el componente "activacional" de la motivación es el que mantiene el vigor y la persistencia de las acciones que llevarán al individuo a obtener la recompensa [Salamone et al., 2016], y que se ha descripto que está regulado de manera diferencial por distintas vías de salida que conectan al NAc con otras áreas cerebrales del circuito de recompensa [Carvalho Poyraz et al., 2016]. En este sentido, los ratones en LL persisten en la acción (presiones) a lo largo de toda la sesión de motivación, pero su vigor motivacional es muy bajo. Aquí también podríamos pensar que la arritmicidad circadiana y/o el impacto directo de la luz sobre los circuitos de la recompensa podrían tener un efecto afectando el vigor del componente activacional de la motivación. De hecho, los experimentos propuestos en el párrafo anterior, también serían de utilidad para responder este interrogante, y además brindarían información novedosa sobre los circuitos involucrados en la regulación del componente activacional. Adicionalmente, en este caso, podemos sumar una tercera hipótesis para intentar explicar los resultados que nos aporta el análisis de la dinámica de la respuesta: la influencia del componente homeostático que modula a la motivación. Si observamos los resultados del peso y el consumo diario de comida (**Figura II.4.2**), los ratones en LL tienen un mayor peso corporal pero una menor ingesta de alimento que el grupo control, lo que indica un posible desbalance metabólico causado por la condición experimental que, de hecho, ya fue reportado previamente en otro estudios en roedores bajo luz constante [Gale et al., 2011; Báez-Ruiz et al., 2017; Fonken et al., 2010; Wideman & Murphy, 2009]. Se sabe que tanto VTA como el

NAc reciben información de la homeostasis del organismo, a través de otras regiones cerebrales, para regular la intensidad de las conductas motivadas. Por lo tanto, la desregulación de las vías metabólicas y la pérdida de los ritmos en los metabolitos/hormonas que transmiten información sobre el estado energético desde la periferia al cerebro, podrían estar afectando el vigor o la intensidad de la respuesta motivacional sin modificar la persistencia en la tarea de motivación. Bajo esta hipótesis, el componente homeostático (que tiene un rol muy importante en la motivación de ratones restringidos calóricamente porque, básicamente, genera que estén dispuestos a trabajar por obtener la recompensa de comida) estaría alterado a causa de la disrupción circadiana de las vías y procesos metabólicos del organismo y su influencia sobre el sistema de recompensa y los niveles motivacionales estaría "atenuada". Los experimentos necesarios para verificar esta hipótesis son complejos debido a la multitud de factores que pueden estar influyendo al mismo tiempo en la conducta observada. Esto incluye la arritmicidad en los órganos y tejidos periféricos y en sus ritmos de salida, así como también la arritmicidad a nivel central, particularmente afectando el mecanismo molecular circadiano en las distintas regiones cerebrales del sistema de recompensa y en la señalización dopaminérgica, entre otros. Sin embargo, algunos de estos interrogantes respecto a cómo la alimentación y la homeostasis energética modulan el comportamiento de motivación por una recompensa intentarán ser respondidos en el tercer y último capítulo de esta tesis.

Podríamos preguntarnos también cómo es que la arritmicidad circadiana causada por la exposición a luz constante afecta la motivación por una recompensa. Antes de explayarnos en dicha discusión es importante mencionar que, hasta el día de hoy, los mecanismos moleculares involucrados son desconocidos. Sin embargo, existen algunas evidencias que nos pueden dar indicios de cómo estaría ocurriendo este proceso. En primer lugar, los estudios sugieren que la exposición a luz constante a largo plazo afecta el mecanismo molecular en el reloj central de los NSQ, generando arritmicidad en la expresión de proteínas y genes reloj y/o un desacople entre las fases de las oscilaciones de las distintas neuronas de los NSQ [Sudo et al., 2003; de la Iglesia et al., 2000]. La pérdida de ritmicidad en el reloj central genera que sus vías de salida también dejen de ser rítmicas, perdiéndose el control temporal de otras estructuras cerebrales que son importantes en la manifestación de diversas conductas que varían a lo largo del día (como, por

ejemplo, los distintos núcleos hipotalámicos encargados del control del patrón diario de sueño-vigilia) y, en consecuencia, los ritmos en las diversas variables fisiológicas y conductuales del organismo se pierdan. Asimismo, los relojes de órganos periféricos que se encuentran sincronizados, a su vez, por otros factores ambientales (como, por ejemplo, la comida) también se verían afectados por la pérdida de los ritmos conductuales (como la pérdida del ritmo de ingesta-ayuno). Esta situación de arritmicidad generalizada podría impactar en el sistema de recompensa en múltiples niveles, tal como hemos discutido previamente. Sin embargo, un candidato muy plausible para mediar esta comunicación es el sistema dopaminérgico. Como hemos explicitado en la Introducción General de esta tesis, las vías dopaminérgicas mesolímbicas que inervan al estriado tienen un rol predominante en los mecanismos de motivación, las conductas recompensadas, las emociones y los estados de ánimo. Asimismo, hemos mencionado también que el sistema dopaminérgico está bajo regulación circadiana, dado que una gran parte de las enzimas, proteínas y receptores encargados de la síntesis, recaptación y señalización de la DA se expresan rítmicamente a partir de la unión temporal de los factores de transcripción circadianos en sus regiones promotoras [Sleipness et al., 2007; Hampp et al., 2008]. En la literatura se ha reportado que la arritmicidad circadiana causada por las condiciones de LL genera la pérdida de las oscilaciones en los distintos factores involucrados en la señalización dopaminérgica. Por ejemplo, estudios previos de nuestra línea de investigación, han demostrado que esta condición abole los ritmos diarios en los niveles dopaminérgicos, la expresión de TH (tirosina hidroxilasa, la enzima limitante en la síntesis de dopamina), y la expresión del gen circadiano *Per2* en el estriado dorsal de ratones [Bussi et al., 2014]. En particular, se hipotetiza que la pérdida de ritmicidad en el mecanismo molecular del reloj presente en las neuronas dopaminérgicas de VTA, así como en las regiones *target* como el estriado dorsal, el núcleo accumbens, la corteza prefrontal, entre otros, generan la pérdida de los ritmos en los diversos componentes del sistema dopaminérgico afectando así las múltiples funciones y comportamientos que están regulados por éste [Pradel et al., 2022]. Así, se ha evidenciado que roedores con arritmicidad circadiana causada por la exposición a luz constante, pierden el ritmo diario en la estimación de intervalos cortos de tiempo (también llamado *interval timing,* un proceso cognitivo que requiere del correcto funcionamiento del sistema dopaminérgico y de los

mecanismos de obtención de recompensas) [Agostino et al., 2011]. Además, las condiciones de LL inducen anhedonia (evaluada en el test de preferencia por sacarosa, SPT), y comportamientos de tipo ansiosos y depresivos (medidos en el test de campo abierto, OF), que se correlacionan con la arritmicidad en el patrón de la actividad locomotora y con la pérdida de la expresión rítmica de melatonina y glucocorticoides (es decir, con la arritmicidad de otras salidas del reloj central) [Tapia-Osorio et al., 2013]. Asimismo, otro estudio también evidencia conductas de tipo depresivas en ratones bajo condiciones de LL, evaluados a partir del test de anhedonia (SPT) y del test de "nado forzado" (o *forced swim test*) [Fonken et al., 2009]. Por otro lado, se ha visto que el consumo voluntario de alcohol (mediante un test similar al SPT, pero con etanol en lugar de sacarosa) se ve disminuido en ratones bajo LL respecto a sus controles en LD, sugiriendo nuevamente que el sistema de recompensa se ve afectado bajo esta condición [Rosenwasser et al., 2020]. Hasta donde sabemos, el experimento aquí realizado es el primer estudio que demuestra que la motivación por una recompensa de comida se ve afectada (tanto a nivel de su ritmo como en la disminución de los niveles globales de motivación) en ratones arrítmicos a causa de exposición constante a la luz. En conjunto con todas las evidencias previas mencionadas, es plausible hipotetizar que la arritmicidad circadiana causada por luz constante abole los ritmos de genes reloj en las regiones cerebrales del sistema de recompensa, lo que impacta en la regulación circadiana del sistema dopaminérgico y genera, en consecuencia, pérdida de ritmicidad en los comportamientos motivados y en las respuestas hedónicas favoreciendo la aparición de sintomatologías relacionadas con la ansiedad y la depresión.

5.2 La desincronización forzada causada por un protocolo de JLC experimental disminuye la motivación por una recompensa de comida

El *jet lag* crónico fuerza la desincronización de los ritmos circadianos, causando una amplia variedad de efectos negativos a nivel fisiológicos y psicológicos en el organismo [Golombek et al., 2013]. En el presente experimento, sometimos a ratones a un protocolo de disrupción circadiana por avances de fase de 6 horas cada dos días ($JLC^{+6/2}$) durante 8 semanas. Luego, se llevó a cabo una batería de estudios comportamentales para evaluar las consecuencias de esta condición experimental en los comportamientos relacionados con la recompensa (colectivamente

conocidos como *mood-related behaviors*) siendo uno de ellos, el comportamiento de motivación por una recompensa de comida, que es el eje central de esta tesis.

Luego de 8 semanas bajo el protocolo de JLC, los ratones evidenciaron en sus patrones de actividad locomotora las dos componentes de actividad (**Figura II.4.5** y **Tabla II.4.6**) que caracterizan al modelo utilizado y que infieren la desincronización circadiana interna en los animales. Los períodos observados de ambos componentes (uno corto de 21 horas y otro largo de 25.2 ± 0.11 horas) coinciden con los previamente evidenciados en nuestro laboratorio [Casiraghi et al., 2012]. Se ha sugerido que el componente corto se expresa 'siguiendo' a la luz, es decir, es el que 'intenta' sincronizarse al esquema de luz/oscuridad impuesto[4]. Por otro lado, el componente largo surge como consecuencia de la incapacidad de sincronización del reloj y, por ello, oscila en libre curso con un período espontáneo mayor a 24 horas (mecanismo que también se conoce como coordinación relativa [Casiraghi et al., 2012]). Asimismo, se ha demostrado que este patrón dual de comportamiento se corresponde con dos patrones oscilatorios de actividad neuronal diferente ubicados uno en la región del *core* (ventrolateral) y el otro, en la región del *shell* (dorsomedial) de los NSQ [de la Iglesia et al., 2004]. Como se ha explicado, los NSQ se subdividen anatómicamente en las neuronas ubicadas en la región del *core* y las del *shell*, y ambas regiones reciben información distinta (a modo general, el *core* recibe principalmente información de la luz desde la retina, y el *shell* recibe información del *core* y la transmite al resto del organismo por las diversas vías de salida del reloj, ver Figura 4 en la Introducción General). Bajo un protocolo de desincronización forzada como el JLC, estas dos regiones tienen la capacidad de desacoplarse entre sí y las neuronas dentro de cada región comienzan a oscilar con un período particular, como si fueran dos osciladores independientes uno del otro. Estos dos osciladores tienen el mismo período de oscilación que los observados en los patrones de actividad locomotora: el *core* oscila con un período corto y el *shell* con un período largo [de la Iglesia et al., 2004]. Este desacople de osciladores dentro de los NSQ genera que sus vías de salida también transmitan esta información temporal distinta al resto del organismo, generando una desincronización entre las fases de los

[4] Como se mencionó en la Introducción de este capítulo, el modelado computacional del protocolo de $JLC^{+6/2}$ ha demostrado que la sumatoria de los avances crónicos de la fase es equivalente a someter a los animales a un ciclo de luz/oscuridad de 21 horas de período, que está por fuera del rango de entrenamiento del reloj central en la cepa de ratones utilizada en este experimento.

ritmos de las distintas variables fisiológicas y conductuales y, en consecuencia, una desincronización interna generalizada.

Una vez comprendido cómo es el mecanismo mediante el cual el protocolo de JLC induce la desincronización circadiana, podemos volver a centrarnos en los resultados obtenidos en este capítulo. Al evidenciar los dos componentes de actividad en todos los ratones bajo JLC, subdividimos dicho grupo para poder evaluarlos comportamentalmente. La elección de estos subgrupos se basó en dos razones: evaluar a los animales nocturnos en su fase de actividad (la noche), y la presencia de noches cortas (6 horas de oscuridad) y noches largas (12 horas de oscuridad) inherentes al protocolo experimental. Así, evaluamos a los animales en estos dos tipos de noches distintas dentro del bloque de 'la noche verdadera', es decir, los momentos en que ambos componentes de actividad con distintos períodos coinciden entre sí, y a su vez, coinciden con la fase de oscuridad (noche) en el protocolo. Los resultados de los índices motivacionales indicaron que el grupo de JLC evaluado en la noche corta presentaba niveles motivacionales inferiores respecto a los controles evaluados en la noche del LD, mientras que la motivación de los ratones evaluados en la noche larga del JLC no fue estadísticamente distinta a la de los controles (**Figura II.4.9**). Asimismo, los resultados de la dinámica de la respuesta muestran que los ratones en JLC tienen una respuesta constante a lo largo de toda la sesión de PR (persistencia) pero su vigor motivacional (intensidad de la respuesta) es menor respecto a los controles (**Figura II.4.10),** con el grupo de JLC-NC mostrando la frecuencia de presiones más baja y el grupo JLC-NL con una frecuencia de presiones 'intermedia' entre el grupo control y los JLC-NC. La persistencia en la tarea también puede ser evidenciada en las curvas de sobrevida (Figura II.4.10 C), en donde no se evidenciaron diferentes entre los grupos. Nuevamente, parecería ser que las diferencias en los niveles motivacionales son consecuencia de un menor vigor motivacional y no de la pérdida de la persistencia, es decir, no se deben a que los ratones abandonan la tarea antes de que finalice la sesión de motivación (como, en contraposición, sí observamos en los ratones evaluados en el día del LD en el Capítulo I). En este caso, para estos resultados no podemos establecer una hipótesis respecto al componente homeostático regulando el vigor motivacional (como hicimos previamente para los resultados de los ratones de LL) dado que las mediciones del consumo de comida y los pesos de los ratones de JLC no mostraron diferencias significativas respecto al grupo

control bajo LD (**Figura II.4.7**). Sin embargo, resultados previos de nuestro grupo de investigación han reportado un incremento en el peso corporal de los animales bajo JLC y la aparición de distintas afecciones metabólicas que están relacionadas [Casiraghi et al., 2016; Trebucq et al., 2023]. Las diferencias en los resultados obtenidos aquí podrían deberse a la variabilidad fisiológica que existe entre poblaciones de individuos de la misma especie, así como a cambios en la composición de las dietas comerciales formuladas para roedores, o a factores ambientales (intensidad de la luz utilizada, condiciones de alojamiento individual vs en grupos, presencia de ruedas y otros factores de enriquecimiento ambiental) a los que los animales podrían ser susceptibles, y que modifiquen los resultados observados en los distintos experimentos. A futuro, se debería controlar con rigurosidad todas las condiciones externas que podrían estar influyendo el protocolo experimental, así como también, realizar un análisis de la composición nutricional y la calidad del alimento balanceado comercial para estandarizar y garantizar la reproducibilidad de los resultados.

Retomando los resultados de motivación, en conjunto, muestran que la desincronización forzada y crónica producto del JLC experimental genera menores niveles de motivación y un menor vigor motivacional de manera diferencial y dependiente al momento de evaluación en el protocolo, en particular, cuando los ratones son evaluados en la noche en la que ocurre el adelanto de fase (noche corta). Intentar explicar el por qué de esta afección diferencial, dependiente del momento de evaluación, no es una tarea sencilla. *A priori*, podríamos pensar que la menor motivación en la noche corta se debe a que es la “noche conflictiva” para el ratón, es decir, en la que ocurre el adelanto de la fase y, en consecuencia, su sistema circadiano se verá desincronizado de manera transitoria porque “ve luz” cuando no debería verla. Siguiendo esta lógica, la noche larga del JLC sería la “noche normal” en la que el animal tiene sus 12 horas completas de oscuridad. Sin embargo, esta visión es errónea si tenemos en cuenta que los ratones fueron evaluados comportamentalmente antes de que ocurra el adelanto de la fase. Es decir, la prueba de motivación inició dos horas luego del apagado de las luces (y finalizó dos horas después), por lo tanto, los animales del grupo JLC-NC todavía tienen dos horas más de oscuridad antes de sufrir el adelanto de la fase. En este sentido, en el momento en el que el grupo JLC-NC fue evaluado comportamentalmente, el adelanto de fase todavía no ocurrió. Incluso, siguiendo

esta lógica deberíamos haber evidenciado una peor motivación en el grupo evaluado en la noche larga, dado que ésta ocurre luego del adelanto de la fase y es cuando podríamos inferir que el sistema circadiano estaría sufriendo la desincronización interna[5]. Sin embargo, nuestros resultados no reflejan esta situación, sino la opuesta. Es por ello que debemos independizarnos de la idea de que el resultado observado depende del efecto individual de cada uno de los adelantos de fase, sino pensar en un efecto global y aditivo de todos los adelantos ocurridos durante el tiempo que los ratones estuvieron expuestos al protocolo de JLC. A su vez, las evidencias de los dos osciladores desacoplados dentro de los NSQ que se reflejan en los dos patrones de actividad locomotora con distinto período nos permiten generar una posible hipótesis. Para ello, tenemos que pensar en dos osciladores independientes, cada uno oscilando con su propia fuerza y período. Estos osciladores, cada cierto tiempo, coinciden y se "juntan" o acoplan, generando que ocurran los bloques de 'noche verdadera' en donde los animales expresan su máxima actividad en fase con la oscuridad. Podemos pensar que, a pesar de la desincronización interna, este bloque en el que ambos osciladores coindicen es un momento 'más favorable' circadianamente hablando. Este bloque está compuesto por tres noches consecutivas: primero una noche larga, luego una noche corta y, por último, otra noche larga (ver **Figura II.4.8** para una mayor comprensión). La primera noche de esta coincidencia, que es una noche larga, es en la que fueron evaluados en la sesión de motivación el grupo de ratones JLC-NL (ver último recuadro verde que indica la sesión de testeo de PR en Figura II.4.8 B). Hipotetizamos que esa noche es la de máxima coincidencia de estos dos osciladores, por lo tanto, el desempeño en la tarea de motivación no se ve tan afectado y muestra valores similares a los observados en la noche del LD del grupo control. Asimismo, los ratones del grupo JLC-NC fueron evaluados durante la segunda noche de este bloque, que es una noche corta (ver último recuadro verde de la Figura II.4.8 A), e hipotetizamos que en esta instancia los dos osciladores comienzan a separarse y desacoplarse entre sí ("tirando cada uno para su propio lado") lo que genera que el desempeño en la tarea de motivación se vea afectado en mayor medida. En otras palabras, la disminución en los niveles de motivación para el grupo JLC-NC podría estar relacionado con un efecto inercial de

[5] Recordemos que los efectos de la luz sobre el reloj central se evidencian en los días subsiguientes, tal como se explicó para las curvas de respuesta de fase (PRC) en la sincronización no paramétrica (sección II.1.1 en la Introducción de este capítulo).

los dos osciladores comenzando a separarse. Tenemos intenciones de poner a prueba esta hipótesis en un futuro mediante un modelado matemático del sistema. De todas formas, creemos que la motivación por una recompensa se ve afectada de forma global por el protocolo de desincronización forzada de $JLC^{+6/2}$ y, por esta razón, es que observamos que los ratones evaluados en la noche larga muestran esta motivación 'intermedia' entre los animales de la noche corta y los controles, a pesar de que las diferencias no sean estadísticamente significativas. Se podría volver a repetir el experimento en un futuro, para tener un mayor tamaño muestral, y evidenciar si estas tendencias se vuelven significativas. Asimismo, estos resultados dejan en evidencia, una vez más, la importancia de la elección del o los momento/s adecuados para evaluar comportamientos que están modulados circadianamente (y que se ven afectados cuando el sistema circadiano también lo está) en animales.

5.3 La desincronización forzada causada por un protocolo de JLC experimental induce comportamientos de tipo ansiosos y depresivos

La desincronización circadiana interna afecta la gran mayoría de los ritmos fisiológicos y conductuales del organismo. Entre ellos, podemos mencionar a los ritmos de actividad-reposo y de alimentación-ayuno (así como también se ve afectado el correcto acoplamiento de estos ritmos, es decir, actividad/alimentación-reposo/ayuno), el ciclo de sueño-vigilia, la variación en la temperatura corporal, el metabolismo energético, así como también se ve afectado el eje neuroendócrino hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) que controla el estrés, entre otros. En particular, desacoplar la fase de los ritmos de actividad/alimentación-reposo/ayuno, aumenta el riesgo de ocurrencia de alteraciones metabólicas [Trebucq et al., 2023] lo que ha sido considerado como un factor de riesgo para la prevalencia de estados depresivos [Gu et al., 2021]. Otros trabajos han demostrado que bajo protocolos similares de JLC, se observa una alteración en la homeostasis diaria en el metabolismo energético del cerebro (es decir, en la disposición y utilización de la glucosa cerebral), lo que aumenta el riesgo de ocurrencia de trastornos vinculados al estado de ánimo [Gao et al., 2020; Siddique et al., 2022]. Asimismo, otros modelos de desincronización circadiana han reportado la aparición de comportamientos de tipo ansiosos y depresivos en roedores [Herzog et al., 2017; Horsey et al., 2020]. Para caracterizar de si los

distintos comportamientos regulados por el sistema de recompensa se veían afectados en nuestro modelo de desincronización forzada de $JLC^{+6/2}$, utilizamos una batería de test conductuales.

Los resultados evidenciaron que los ratones bajo JLC evaluados en la noche corta, presentaban un estado de mayor ansiedad en el test de campo abierto (OF, **Figura II.4.12**). Sin embargo, cuando fueron evaluados en el test de laberinto en cruz elevados no se encontraron tales indicadores, y no hubo diferencias entre grupos (EPM, **Figura II.4.11**). A pesar de esta discrepancia en los resultados, algunos autores han sugerido que los comportamientos relacionados con la ansiedad tienen una estructura multidimensional. En este sentido, la evaluación en el EPM o en el OF podría representar un aspecto o rasgo distinto del comportamiento de tipo ansioso en roedores [van Gaalen et al., 2000; Carola et al., 2002]. Por otro lado, ambos grupos de ratones bajo condiciones de JLC presentaron anhedonia (es decir, la pérdida de la capacidad de sentir placer) evaluada mediante el test de preferencia de sacarosa (**Figura II.4.13).** Por último, el grupo de JLC evaluado en la noche corta presentó un mayor tiempo de inmovilidad en el test de suspensión por la cola (TST, **Figura II.4.14**) lo que indicó una mayor desesperanza conductual que, en conjunto con la sintomatología de anhedonia, se consideran indicadores de comportamientos de tipo depresivos en roedores.

En relación a los resultados en los test de ansiedad, es importante mencionar que la evidencia de un estado ansioso a causa de JLC no necesariamente implica una activación comportamental, es decir, que el ratón esté más activo o tenga respuestas compulsivas a causa de dicho estado. De hecho, nuestros resultados en el test de motivación muestran lo opuesto: los ratones bajo JLC tienen una disminución en la intensidad de las presiones de palanca. Asimismo, no encontramos diferencias en las distancias totales recorridas entre los grupos de JLC y los controles en los test de OF y EPM. En este sentido, ocasionalmente se suelen establecer conclusiones de que la ansiedad implica una mayor respuesta por parte de los animales en protocolos como el de tasa progresiva para medir la motivación. Sin embargo, es necesario evaluar el contexto y la presencia de otros indicadores comportamentales. En este caso, también evidenciamos conductas de tipo depresivas en los ratones bajo JLC, por lo tanto, aunque la ansiedad típicamente implica una activación que puede llevar a un aumento en la alerta y una

preparación para la acción, cuando se combina con la depresión, el panorama puede ser más complejo. Asimismo, la evidencia de indicadores de ansiedad en los ensayos conductuales podría estar relacionada a un estado de estrés general en el animal causado por la desincronización interna, dado que se ha evidenciado afecciones en el eje neuroendócrino hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) que controla el estrés bajo protocolos de JLC [Gu et al., 2021]. Asimismo, la anhedonia y el estado de tipo depresivo podrían estar modulando negativamente la conducta de motivación observada en los animales. Por ello, la batería de ensayos comportamentales realizada en este experimento nos permite tener un contexto más amplio para explicar los resultados observados debido a la caracterización de diversas conductas.

Por otro lado, nuevamente en nuestro modelo de JLC, y como consecuencia de evaluar los comportamientos en los dos tipos de noches distintas, evidenciamos diferencias en los fenotipos observados entre los grupos de JLC-NC y JLC-NL. La misma hipótesis formulada previamente para la conducta de motivación podría ser aplicada a estos casos. Asimismo, los resultados que evidencian que ambos grupos bajo JLC tienen una menor preferencia por la sacarosa, refuerzan nuestra hipótesis de que la desincronización crónica circadiana altera el normal funcionamiento del sistema de recompensa y, en consecuencia, la motivación y las respuestas hedónicas se encuentran afectadas independientemente del momento de evaluación. Al igual que hipotetizamos previamente para las condiciones de arritmicidad causadas por luz constante, es muy probable que la desincronización crónica del sistema circadiano esté afectando el correcto (y rítmico) funcionamiento del sistema dopaminérgico, generando como consecuencia las múltiples afecciones en los comportamientos relacionados con la obtención de recompensas y los estados de ánimo. En línea con esta hipótesis, existen evidencias de otros sistemas que también son parte del circuito de la recompensa y que se ven alterados bajo estas condiciones. Por ejemplo, se ha propuesto al sistema serotoninérgico como un posible mediador entre la disrupción de los ritmos circadianos, el estrés y la mayor susceptibilidad a la depresión [Daut & Fonken, 2019]. En este sentido, se ha observado que la alteración de los ritmos circadianos afecta el correcto funcionamiento del sistema de serotonina, y que esto está correlacionado con diversos desórdenes neurológicos, como la depresión, el trastorno bipolar y el trastorno obsesivo-compulsivo [McClung, 2007]. Asimismo, el análisis del perfil transcripcional de ratones bajo JLC

muestra alteraciones en la expresión de los genes que regulan la transmisión serotoninérgica en el núcleo accumbens y la corteza prefrontal [Siddique et al., 2022]. En conclusión, la disrupción circadiana crónica estaría afectando al sistema de recompensa en múltiples niveles generando un amplio espectro de trastornos a nivel cognitivo y conductual.

II.5.4. Conclusiones del Capítulo II

En el presente capítulo hemos demostrado que la disrupción del sistema circadiano afecta negativamente el comportamiento de motivación por una recompensa en ratones. En particular, la arritmicidad circadiana causada por exposición a luz constante (LL) abole el ritmo diario de motivación y disminuye en gran medida los niveles motivacionales. Por otro lado, la desincronización interna forzada por un protocolo de *jet lag* crónico (JLC) experimental disminuye la motivación por una recompensa, produce anhedonia y comportamientos de tipo ansiosos y depresivos en ratones. Todas estas evidencias apoyan la hipótesis de que la disrupción crónica de la organización del sistema circadiano contribuye y/o agrava la prevalencia de trastornos motivacionales y del estado de ánimo. Además, destacan la importancia de la regulación circadiana en el comportamiento de motivación y el sistema de recompensa.

II.6 Referencias bibliográficas del Capítulo II

Abraham, U., Granada, A. E., Westermark, P. O., Heine, M., Kramer, A., & Herzel, H. (2010). Coupling governs entrainment range of circadian clocks. *Molecular systems biology*, *6*(1), 438.

Agostino, P. V., Do Nascimento, M., Bussi, I. L., Eguía, M. C., & Golombek, D. A. (2011). Circadian modulation of interval timing in mice. *Brain research*, *1370*, 154-163.

Aiello, I., Fedele, M. M., Román, F., Marpegan, L., Caldart, C., Chiesa, J. J., ... & Paladino, N. (2020). Circadian disruption promotes tumor-immune microenvironment remodeling favoring tumor cell proliferation. *Science advances*, *6*(42), eaaz4530.

Al-Naimi, S., Hampton, S. M., Richard, P., Tzung, C., & Morgan, L. M. (2004). Postprandial metabolic profiles following meals and snacks eaten during simulated night and day shift work. *Chronobiology international*, *21*(6), 937-947.

Arafa, A., Eshak, E. S., Iso, H., Muraki, I., & Tamakoshi, A. (2021). Night work, rotating shift work, and the risk of cancer in japanese men and women: the JACC study. *Journal of epidemiology*, *31*(12), 585-592.

Arendt, J., & Marks, V. (1982). Physiological changes underlying jet lag. *British Medical Journal (Clinical research ed.)*, *284*(6310), 144.

Báez-Ruiz, A., Guerrero-Vargas, N. N., Cázarez-Márquez, F., Sabath, E., del Carmen Basualdo, M., Salgado-Delgado, R., ... & Buijs, R. M. (2017). Food in synchrony with melatonin and corticosterone relieves constant light disturbed metabolism. *Journal of endocrinology*, *235*(3), 167-178.

Bussi, I. L., Levín, G., Golombek, D. A., & Agostino, P. V. (2014). Involvement of dopamine signaling in the circadian modulation of interval timing. *European Journal of Neuroscience*, *40*(1), 2299-2310.

Carola, V., D'Olimpio, F., Brunamonti, E., Mangia, F., & Renzi, P. (2002). Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice. *Behavioural brain research*, *134*(1-2), 49-57.

Casiraghi, L. P., Alzamendi, A., Giovambattista, A., Chiesa, J. J., & Golombek, D. A. (2016). Effects of chronic forced circadian desynchronization on body weight and metabolism in male mice. *Physiological reports*, *4*(8), e12743.

Casiraghi, L. P., Oda, G. A., Chiesa, J. J., Friesen, W. O., & Golombek, D. A. (2012). Forced desynchronization of activity rhythms in a model of chronic jet lag in mice. *Journal of biological rhythms*, *27*(1), 59-69.

Chen, R., Weitzner, A. S., McKennon, L. A., & Fonken, L. K. (2021). Chronic circadian phase advance in male mice induces depressive-like responses and suppresses neuroimmune activation. *Brain, Behavior, & Immunity-Health*, *17*, 100337.

Coomans, C. P., van den Berg, S. A., Houben, T., van Klinken, J. B., van den Berg, R., Pronk, A. C., ... & Meijer, J. H. (2013). Detrimental effects of constant light exposure and high-fat diet on circadian energy metabolism and insulin sensitivity. *The FASEB Journal*, *27*(4), 1721-1732.

Czeisler, C. A., Kronauer, R. E., Allan, J. S., Duffy, J. F., Jewett, M. E., Brown, E. N., & Ronda, J. M. (1989). Bright light induction of strong (type 0) resetting of the human circadian pacemaker. *Science*, *244*(4910), 1328-1333.

Dann, S., & Pittendrigh, C. S. (1976). A functional analysis of the circadian pacemakers in nocturnal rodents: IV. Entrainment: Pacemaker and clock. *J Comp Physiol*, *106*, 253-266.

Daut, R. A., & Fonken, L. K. (2019). Circadian regulation of depression: A role for serotonin. *Frontiers in neuroendocrinology*, *54*, 100746.

de la Iglesia, H. O., Cambras, T., Schwartz, W. J., & Díez-Noguera, A. (2004). Forced desynchronization of dual circadian oscillators within the rat suprachiasmatic nucleus. *Current biology*, *14*(9), 796-800.

de la Iglesia, Meyer, J., Carpino Jr, A., & Schwartz, W. J. (2000). Antiphase oscillation of the left and right suprachiasmatic nuclei. *Science*, *290*(5492), 799-801.

Fernandez, D. C., Fogerson, P. M., Ospri, L. L., Thomsen, M. B., Layne, R. M., Severin, D., ... & Hattar, S. (2018). Light affects mood and learning through distinct retina-brain pathways. *Cell*, *175*(1), 71-84.

Fonken, L. K., Finy, M. S., Walton, J. C., Weil, Z. M., Workman, J. L., Ross, J., & Nelson, R. J. (2009). Influence of light at night on murine anxiety-and depressive-like responses. *Behavioural brain research*, *205*(2), 349-354.

Fonken, L. K., Workman, J. L., Walton, J. C., Weil, Z. M., Morris, J. S., Haim, A., & Nelson, R. J. (2010). Light at night increases body mass by shifting the time of food intake. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(43), 18664-18669.

Gale, J. E., Cox, H. I., Qian, J., Block, G. D., Colwell, C. S., & Matveyenko, A. V. (2011). Disruption of circadian rhythms accelerates development of diabetes through pancreatic beta-cell loss and dysfunction. *Journal of biological rhythms*, *26*(5), 423-433.

Gao, Q., Khan, S., & Zhang, L. (2020). Brain activity and transcriptional profiling in mice under chronic jet lag. *Scientific Data*, *7*(1), 361.

Golombek, D. A., & Rosenstein, R. E. (2010). Physiology of circadian entrainment. *Physiological reviews*, *90*(3), 1063-1102.

Golombek, D. A., Casiraghi, L. P., Agostino, P. V., Paladino, N., Duhart, J. M., Plano, S. A., & Chiesa, J. J. (2013). The times they're a-changing: effects of circadian desynchronization on physiology and disease. *Journal of physiology-Paris*, *107*(4), 310-322.

Gu, X., Ke, S., Wang, Q., Zhuang, T., Xia, C., Xu, Y., ... & Zhou, M. (2021). Energy metabolism in major depressive disorder: Recent advances from omics technologies and imaging. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *141*, 111869.

Hampp, G., Ripperger, J. A., Houben, T., Schmutz, I., Blex, C., Perreau-Lenz, S., ... & Albrecht, U. (2008). Regulation of monoamine oxidase A by circadian-clock components implies clock influence on mood. *Current Biology*, *18*(9), 678-683.

Herrero, L., Valcarcel, L., da Silva, C. A., Albert, N., Diez-Noguera, A., Cambras, T., & Serra, D. (2015). Altered circadian rhythm and metabolic gene profile in rats subjected to advanced light phase shifts. *PloS one*, *10*(4), e0122570.

Herzog, E. D., Hermanstyne, T., Smyllie, N. J., & Hastings, M. H. (2017). Regulating the suprachiasmatic nucleus (SCN) circadian clockwork: interplay between cell-autonomous and circuit-level mechanisms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *9*(1), a027706.

Horsey, E. A., Maletta, T., Turner, H., Cole, C., Lehmann, H., & Fournier, N. M. (2020). Chronic jet lag simulation decreases hippocampal neurogenesis and enhances depressive behaviors and cognitive deficits in adult male rats. *Frontiers in behavioral neuroscience*, *13*, 272.

Iwamoto, A., Kawai, M., Furuse, M., & Yasuo, S. (2014). Effects of chronic jet lag on the central and peripheral circadian clocks in CBA/N mice. *Chronobiology international*, *31*(2), 189-198.

Karlsson, B. H., Knutsson, A. K., Lindahl, B. O., & Alfredsson, L. S. (2003). Metabolic disturbances in male workers with rotating three-shift work. Results of the WOLF study. *International archives of occupational and environmental health*, *76*, 424-430.

Karlsson, B., Knutsson, A., & Lindahl, B. (2001). Is there an association between shift work and having a metabolic syndrome? Results from a population-based study of 27 485 people. *Occupational and environmental medicine*, *58*(11), 747-752.

LeGates, T. A., Altimus, C. M., Wang, H., Lee, H. K., Yang, S., Zhao, H., ... & Hattar, S. (2012). Aberrant light directly impairs mood and learning through melanopsin-expressing neurons. *Nature*, *491*(7425), 594-598.

Ma, C., Ren, B., Chen, L., & Yang, G. (2022). Strain and Age Dependent Entrainable Range of Circadian Behavior in C57BL/6 and BALB/c Mice. Physiology & Behavior, 255, 113917.

Maroni, M. J., Capri, K. M., Cushman, A. V., Monteiro De Pina, I. K., Chasse, M. H., & Seggio, J. A. (2018). Constant light alters serum hormone levels related to thyroid function in male CD-1 mice. *Chronobiology international*, *35*(10), 1456-1463.

Minors, D. S., Waterhouse, J. M., & Wirz-Justice, A. (1991). A human phase-response curve to light. *Neuroscience letters*, *133*(1), 36-40.

Moriya, T., Y. Yoshinobu, Y. Kouzu, A. Katoh, H. Gomi, M. Ikeda, T. Yoshioka, S. Itohara and S. Shibata (2000). "Involvement of glial fibrillary acidic protein (GFAP) expressed in astroglial cells in circadian rhythm under constant lighting conditions in mice." Journal of neuroscience research **60**(2): 212-218.

Nováková, M., Polidarová, L., Sládek, M., & Sumová, A. (2011). Restricted feeding regime affects clock gene expression profiles in the suprachiasmatic nucleus of rats exposed to constant light. *Neuroscience*, *197*, 65-71.

Ohta, H., Yamazaki, S., & McMahon, D. G. (2005). Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. *Nature neuroscience*, *8*(3), 267-269.

Park, S. Y., Walker, J. J., Johnson, N. W., Zhao, Z., Lightman, S. L., & Spiga, F. (2013). Constant light disrupts the circadian rhythm of steroidogenic proteins in the rat adrenal gland. *Molecular and cellular endocrinology*, *371*(1-2), 114-123.

Peter, R., Alfredsson, L., Knutsson, A., Siegrist, J., & Westerholm, P. (1999). Does a stressful psychosocial work environment mediate the effects of shift work on cardiovascular risk factors?. *Scandinavian journal of work, environment & health*, 376-381.

Poyraz, F. C., Holzner, E., Bailey, M. R., Meszaros, J., Kenney, L., Kheirbek, M. A., ... & Kellendonk, C. (2016). Decreasing striatopallidal pathway function enhances motivation by energizing the initiation of goal-directed action. *Journal of Neuroscience*, *36*(22), 5988-6001.

Pradel, K., Drwięga, G., Chrobok, L., & Błasiak, T. (2022). Racing and pacing in the reward system: a multi-clock circadian control over dopaminergic signalling. *Frontiers in Physiology*, *13*, 932378.

Rosenwasser, A. M., McCulley III, W. D., Hartmann, M. C., Fixaris, M. C., & Crabbe, J. C. (2020). Suppression of voluntary ethanol intake in mice under constant light and constant darkness. *Alcohol*, *83*, 37-46

Ruis, J. F., Rietveld, W. J., & Buys, J. P. (1991). Properties of parametric photic entrainment of circadian rhythms in the rat. *Physiology & behavior*, *50*(6), 1233-1239.

Rumanova, V. S., Okuliarova, M., & Zeman, M. (2020). Differential effects of constant light and dim light at night on the circadian control of metabolism and behavior. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(15), 5478.

Sáenz, J. C. B., Villagra, O. R., & Trías, J. F. (2006). Factor analysis of forced swimming test, sucrose preference test and open field test on enriched, social and isolated reared rats. *Behavioural brain research*, *169*(1), 57-65.

Salamone, J. D., Pardo, M., Yohn, S. E., López-Cruz, L., SanMiguel, N., & Correa, M. (2016). Mesolimbic dopamine and the regulation of motivated behavior. *Behavioral neuroscience of motivation*, 231-257.

Schernhammer, E. S., Laden, F., Speizer, F. E., Willett, W. C., Hunter, D. J., Kawachi, I., ... & Colditz, G. A. (2003). Night-shift work and risk of colorectal cancer in the nurses' health study. *Journal of the National Cancer Institute*, *95*(11), 825-828.

Siddique, R., Awan, F. M., Nabi, G., Khan, S., & Xue, M. (2022). Chronic jet lag-like conditions dysregulate molecular profiles of neurological disorders in nucleus accumbens and prefrontal cortex. *Frontiers in Neuroinformatics*, *16*, 1031448.

Sleipness, E. P., Sorg, B. A., & Jansen, H. T. (2007). Diurnal differences in dopamine transporter and tyrosine hydroxylase levels in rat brain: dependence on the suprachiasmatic nucleus. *Brain research*, *1129*, 34-42.

Steinlechner, S., Jacobmeier, B., Scherbarth, F., Dernbach, H., Kruse, F., & Albrecht, U. (2002). Robust circadian rhythmicity of Per1 and Per2 mutant mice in constant light, and dynamics of Per1 and Per2 gene expression under long and short photoperiods. *Journal of biological rhythms*, *17*(3), 202-209.

Stéru, L., Chermat, R., Thierry, B., Mico, J. A., Lenegre, A., Steru, M., ... & Porsolt, R. D. (1987). The automated tail suspension test: a computerized device which differentiates psychotropic drugs. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *11*(6), IN1-671.

Stevens, R. G. (2001). Circadian disruption and breast cancer. In *The Pineal Gland and Cancer: Neuroimmunoendocrine Mechanisms in Malignancy* (pp. 511-517). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Stevens, R. G. (2005). Circadian disruption and breast cancer: from melatonin to clock genes. *Epidemiology*, *16*(2), 254-258.

Sudo, M., K. Sasahara, T. Moriya, M. Akiyama, T. Hamada and S. Shibata (2003). "Constant light housing attenuates circadian rhythms of mPer2 mRNA and mPER2 protein expression in the suprachiasmatic nucleus of mice." Neuroscience **121**(2): 493-499.

Tapia-Osorio, A., Salgado-Delgado, R., Angeles-Castellanos, M., & Escobar, C. (2013). Disruption of circadian rhythms due to chronic constant light leads to depressive and anxiety-like behaviors in the rat. *Behavioural brain research*, *252*, 1-9.

Trebucq, L. L., Lamberti, M. L., Rota, R., Aiello, I., Borio, C., Bilen, M., ... & Chiesa, J. J. (2023). Chronic circadian desynchronization of feeding-fasting rhythm generates alterations in daily glycemia, LDL cholesterolemia and microbiota composition in mice. *Frontiers in Nutrition*, *10*, 1154647.

van Gaalen, M. M., & Steckler, T. (2000). Behavioural analysis of four mouse strains in an anxiety test battery. *Behavioural brain research*, *115*(1), 95-106.

Wideman, C. H., & Murphy, H. M. (2009). Constant light induces alterations in melatonin levels, food intake, feed efficiency, visceral adiposity, and circadian rhythms in rats. *Nutritional neuroscience*, *12*(5), 233-240.

Capítulo III

Motivación por una recompensa de comida en condiciones de alimentación restringida temporalmente

III.1 Introducción

III.1.1 El oscilador sincronizado por comida (FEO)

En 1922, Curt Richter describió que "la actividad espontánea de las ratas está íntimamente relacionada con los hábitos alimenticios del animal". Cuando Richter les dio a las ratas acceso a la comida por sólo 25 minutos todos los días al mediodía, descubrió que la actividad de los animales aumentaba significativamente un tiempo antes y finalizaba cuando obtenían el alimento [Richter, 1922]. Así nació el estudio de la actividad anticipatoria a la comida (**FAA**, por sus siglas en inglés *Food Anticipatory Activity*). A partir de la década de 1970, Frederick Stephan estudió intensamente esta FAA y demostró que estaba controlada por un oscilador circadiano autónomo, el llamado oscilador sincronizado por comida (o **FEO**, por sus siglas en inglés *Food Entrainable Oscillator*). Después de que Stephan estableció que la anticipación a la disponibilidad diaria de comida (FAA) era un resultado del FEO, Mistlberger y otros investigadores pasaron las siguientes dos décadas buscando el lugar anatómico del FEO. *Spoiler alert*: la/s ubicación/es anatómica/s del FEO y de sus posibles componentes aún son un misterio sin resolver en el campo de la Cronobiología. Sin embargo, las intensas investigaciones llevadas a cabo nos han dejado ciertas certezas: el FEO no se encuentra en los núcleos supraquiasmáticos (NSQ) del hipotálamo, e incluso no depende del reloj central circadiano para su funcionamiento, ni tampoco requiere de otra docena de regiones cerebrales que muchos trabajos exploraron para intentar dilucidar su localización. Asimismo, se ha sugerido que, para dar cuenta del paso del tiempo, el FEO no requiere exclusivamente del mecanismo molecular canónico circadiano (es decir, de los bucles de retroalimentación positivos y negativos de genes reloj), dado que se demostró que los ratones mutantes del gen circadiano *Clock* (que son completamente arrítmicos) presentaban una FAA normal y robusta que persistía en condiciones de ayuno (*fasting*) bajo un ciclo de luz/oscuridad [Pitts et al., 2003]. Varios estudios posteriores mostraron que el FEO y la FAA estaban intactos en la mayoría de los ratones mutantes de genes circadianos, pero existen algunos casos reportados en los que se ven comprometidos por la falta del reloj molecular [revisado en Perdergast & Yamazaki, 2018].

El consenso actual entre los cronobiólogos es que la anticipación a un horario de disponibilidad de comida de forma diaria es el resultado de un proceso de sincronización, mediante el cual la comida actúa como un *zeitgeber* que controla la fase y el período de los

osciladores circadianos centrales y periféricos que generan los ritmos diarios en las distintas variables fisiológicas (como la FAA). El sistema que se encarga de la sincronización por comida es muy similar en su organización al de la sincronización fótica (por luz). Ambos sistemas están compuestos por un *zeitgeber* y sus vías de entrada, un oscilador central, y las vías de salida que generan variables rítmicas. En este caso, el oscilador central del sistema es el FEO, la comida es el *zeitgeber* principal del FEO (al menos el único conocido hoy en día), y la vía de salida del FEO es la actividad anticipatoria a la comida (ver **Figura III.1** en la siguiente página). Sin embargo, el estudio de los mecanismos y características del sistema de sincronización por comida es realmente complejo. Al no conocerse la ubicación del oscilador central (y, en consecuencia, la incapacidad de estudiarlo de manera aislada o manipularlo genéticamente) es difícil concluir si la vía de entrada, el oscilador o la vía de salida son las responsables cuando se altera la magnitud o la expresión de la FAA. La teoría más predominante hoy en día, sugiere que el FEO podría estar comprendido por múltiples regiones cerebrales, circuitos de neurotransmisores, osciladores en órganos periféricos y señales homeostáticas y hormonales (e incluso se ha visto que la microbiota intestinal tiene un rol en la modulación de la FAA) que actúan en conjunto para sincronizar las distintas variables fisiológicas y conductuales del organismo con el momento de disponibilidad de la comida.

III.1.2 Metodologías de estudio de la sincronización por comida

Así como el reloj central circadiano tiene sus propiedades y metodologías de estudio, también se han caracterizado y establecido para estudiar al FEO. En principio, la metodología más ampliamente utilizada en el laboratorio para estudiar en animales la sincronización por comida y evidenciar la FAA, son los llamados protocolos de alimentación restringida temporalmente (o **TRF** por sus siglas en inglés *Time-Restricted Feeding*). Los mismos consisten en restringir la disponibilidad de comida a un intervalo fijo del día de manera crónica (a lo largo de varios días sucesivos). Los estudios han demostrado que los roedores son capaces de sincronizarse y anticiparse a la disponibilidad temporal de alimento en prácticamente cualquier momento del ciclo LD [Mistlberger, 2009]. Sin embargo, el protocolo más comúnmente usado es en el que la restricción de la comida ocurre durante las horas diurnas (fase de reposo en roedores nocturnos)

Figura III.1. Componentes de la sincronización por comida y los protocolos de alimentación restringida temporalmente (TRF). (A) Los *zeitgebers* comida y luz sincronizan a los osciladores, el FEO y los NSQ, que regulan el ritmo de la actividad anticipatoria a la comida (FAA) y el ritmo de actividad-reposo, respectivamente. El FEO está fuertemente acoplado al reloj de los NSQ, mientras que los NSQ están débilmente acoplados al FEO, es decir, su fase no se modifica por lo cambios en la ingesta de alimentos. **(B)** Cuando el reloj en los NSQ no es funcional (ya sea por una lesión de ablación o en ratones mutantes arrítmicos de genes reloj) se puede observar y medir la expresión de la FAA, lo que indica que el funcionamiento del FEO es independiente del reloj central en los NSQ. **(C)** La expresión de la FAA se puede observar mediante la actividad locomotora de un ratón bajo un protocolo de alimentación restringida temporalmente (TRF). Comúnmente, el alimento se restringe (sombreado gris) a las horas diurnas en roedores nocturnos para poder observar la expresión de la FAA con facilidad (barras azules). Bajo un ciclo LD, a pesar de la actividad anticipatoria durante el día, los ratones concentran su mayor actividad durante la noche (barras negras). En ratones, se utiliza la deprivación total de comida (*fasting*) por 48 horas para evidenciar la naturaleza endógena de la FAA y corroborar la sincronización por comida. **(D)** La actividad locomotora en ratones arrítmicos en oscuridad constante no muestra un patrón diario. Sin embargo, cuando se restringe el horario de acceso al alimento, los animales arrítmicos sincronizan su actividad en anticipación a la comida evidenciando el ritmo de FAA. Este tipo de protocolos permite medir la expresión de la FAA sin la influencia de reloj central de los NSQ. Imagen modificada de [Pendergast & Yamazaki, 2018].

dado que es la forma en la que se puede evidenciar con mayor claridad la actividad anticipatoria (Figura III.1 C). Asimismo, dependiendo del roedor utilizado, la actividad anticipatoria a la comida puede aparecer entre 1 a 3 horas antes del acceso al alimento, y tiene su pico en el momento en el que la comida es suministrada [Landry & Mistlberger, 2007].

Por otro lado, dado que el FEO es un oscilador circadiano debe cumplir con la condición de expresar sus oscilaciones y ritmos endógenos en ausencia de señales sincronizadoras. En este caso, las condiciones constantes para evidenciar este oscilador serían en completa ausencia de la comida. Así, se ha demostrado que una vez establecida la FAA es capaz de mantenerse y aparecer en el mismo horario hasta 5 días en privación total de alimento (evidencias basadas en estudios en ratas, dado que en ratones los tiempos de deprivación de comida son más cortos) [Mistlberger, 2009]. Por lo general, se utilizan 2 días de ayuno en ratones (Figura III.1 C y D). La aparición de la FAA en el segundo día de ayuno demuestra que es el resultado de un oscilador autosostenido y endógeno [Perdergast & Yamazaki, 2018].

Además, se ha observado que, si se cambia la hora de la disponibilidad de la comida, la actividad anticipatoria muestra un reajuste gradual al nuevo horario, al igual que ocurre con los adelantos y retrasos de fase mediados por los cambios en los esquemas del ciclo de luz/oscuridad. Por último, y en concordancia con la naturaleza circadiana del FEO, si el período del ciclo de alimentación es lo suficientemente diferente de 24 horas (es decir, la administración diaria de la comida ocurre con una periodicidad menor a 22 horas o mayor 28-31 horas) se ha observado que la FAA no emerge o muestra, en algunos casos, un ritmo en libre curso [Stephan, 2002]. Como se ha mencionado anteriormente, todas las propiedades circadianas de la actividad anticipatoria a la comida son evidentes tanto en roedores con y sin los NSQ lesionados, lo que indica que el FEO es anatómicamente distinto del oscilador sincronizado por la luz.

III.1.3 Restricción alimentaria temporal y su implicancia en el sistema de recompensa y los osciladores periféricos

En la restricción alimentaria temporal, no solo se evidencian cambios en los ritmos de actividad locomotora, sino que también muchas otras variables fisiológicas y conductuales modifican sus patrones de expresión diarios y se sincronizan con la disponibilidad de comida. El

acceso restringido a la comida es el sincronizador dominante de relojes periféricos tales como el hígado. Adicionalmente, muchos de los osciladores cerebrales por fuera de los NSQ se ven ampliamente influenciados por el acceso restringido a la comida. Se ha visto, por ejemplo, que la disponibilidad de comida restringida es capaz de modificar el perfil de expresión de genes reloj y sus productos proteicos en la amígdala y en distintos núcleos hipotalámicos del cerebro [Feillet et al., 2006; Verwey et al., 2007]. Asimismo, cuando se restringe el acceso a la alimentación a la fase de luz en roedores nocturnos, se produce un desacoplamiento entre los ritmos moleculares de los NSQ y los ritmos en la periferia y ciertas regiones cerebrales [Wakamatsu et al., 2001; Damiola et al., 2000; Mieda et al., 2006], algunas de ellas implicadas en el sistema límbico y de recompensa [Angeles-Castellanos et al., 2007; Weddington Lamont et al., 2007]. En este sentido, parecería que la expresión de genes reloj en distintas regiones cerebrales por fuera de los NSQ, modifican su fase 'siguiendo' al momento de disponibilidad de comida. Si bien existe un número creciente de evidencias que indican que la FAA es modificada tanto por factores homeostáticos (ghrelina, leptina, insulina, etc.) como por factores relacionados con el circuito de recompensa (dopamina), aún se desconocen sus vías específicas de regulación.

En relación a los estudios que relacionan la FAA y el sistema de recompensa, los ratones con mutaciones en la señalización dopaminérgica han demostrado tener modificaciones en la expresión de la actividad anticipatoria bajo protocolos de alimentación restringida. Por ejemplo, se ha visto que los ratones tratados conjuntamente con antagonistas de los receptores de dopamina D1 y D2 mostraron una FAA atenuada [Liu et al., 2012]. En concordancia con estos estudios farmacológicos, los ratones que carecían del receptor de dopamina D1 funcional (*Drd1*$^{-/-}$) también evidenciaron una FAA atenuada durante un protocolo de TRF [Gallardo et al., 2014; Michalik et al., 2015]. Por otro lado, se ha observado que en ratones mutantes deficientes de dopamina, el rescate mediante herramientas genéticas virales que restauran la expresión de dopamina en el estriado dorsal, permite que los animales desarrollen el componente de la FAA durante la alimentación restringida [Gallardo et al., 2014]. Estos mutantes antes del rescate no expresan FAA debido a que no buscan comida en absoluto. Por otro lado, se ha reportado que los roedores no sólo son capaces de anticipar la restricción temporal del alimento, sino también anticipan la llegada de comidas apetitosas y con un alto valor hedónico cuando éstas son

administradas todos los días a un mismo horario, aun cuando los animales están alimentados *ad libitum* [Keith et al., 2013; Flores et al., 2016]. En conjunto, estos estudios implican al sistema de recompensa como un posible regulador de la FAA y se ha postulado que el FEO podría estar ubicado y/o requerir para su funcionamiento al circuito dopaminérgico [revisado en Perdergast & Yamazaki, 2018].

Dado que el objetivo principal de la presente tesis es entender cómo el sistema circadiano modula el comportamiento de motivación por una recompensa de comida, resulta importante incluir en el estudio del sistema a la comida actuando como un sincronizador. Dadas las evidencias mencionadas previamente, se ha sugerido que los mecanismos de obtención de recompensas y la motivación podrían ser parte del componente de la FAA, activándose para preparar a los animales para la búsqueda y el consumo de comida. Sin embargo, esta hipótesis no ha sido corroborada hasta el momento mediante experimentos conductuales. Asimismo, en los capítulos previos hemos determinado la importancia de la sincronización fótica en la expresión rítmica de la motivación. En el presente capítulo nos propusimos determinar qué *zeitgeber* (luz o comida) predomina o dirige el ritmo diario de motivación cuando ambos se encuentran en fases opuestas (es decir, desacoplados o desalineados entre sí).

III.2 Objetivos

Objetivo general

El objetivo general del presente capítulo fue estudiar cómo la sincronización no-fótica por comida influye sobre los patrones de expresión diarios de la motivación por una recompensa en ratones.

Objetivos específicos

1. Utilizar un protocolo de alimentación restringida temporalmente (TRF) para inducir la sincronización por comida durante las fases diurna y nocturna del ciclo de luz/oscuridad en ratones para evaluar:

    a. Si la motivación por una recompensa es parte del mecanismo de la actividad anticipatoria a la comida (FAA).

    b. Los niveles motivacionales durante el día y la noche.

    c. Diferencias en el protocolo de TRF con alimentación manual y alimentación mediante un sistema de *feeders* automatizado.

    d. Diferencias comportamentales entre ratones macho y hembra.

III.3 Materiales y Métodos

III.3.1 Puesta a punto del protocolo de alimentación restringida temporalmente

III.3.1.1 Animales y condiciones de alojamiento

Para la puesta a punto del protocolo de alimentación restringida temporalmente se utilizaron ratones macho de la cepa C57BL6 adquiridos de proveedores comerciales (provenientes de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de la Plata). Los animales fueron alojados en jaulas grupales en el Bioterio de la Universidad Nacional de Quilmes para su aclimatación antes de ser introducidos al protocolo experimental. Para todas las condiciones experimentales se utilizaron ratones macho jóvenes adultos, que tenían entre 3 a 4 meses de edad al inicio de los protocolos experimentales.

Dos semanas antes del inicio del protocolo de alimentación restringida, los ratones fueron alojados en jaulas individuales (cada una equipada con un sensor infrarrojo para el registro de la actividad locomotora) y mantenidos bajo un fotoperiodo de 12 horas de luz seguidos de 12 horas de oscuridad (LD 12:12), con el encendido de las luces a las 7 AM y el apagado a las 7 PM. Por convención se definió a ZT12 como el momento de apagado de las luces. Las condiciones de la temperatura ambiental se mantuvieron constantes (20 ± 2 °C) y los ratones tuvieron libre acceso a agua y comida (alimento balanceado comercial). Durante este periodo se realizaron los registros basales.

Una vez iniciado el protocolo experimental, los ratones continuaron siendo alojados individualmente, con condiciones constantes de temperatura ambiental y bajo el mismo ciclo de luz/oscuridad (LD) 12:12. Respecto a la alimentación, se les permitió a los ratones el acceso a la comida de forma *ad libitum,* pero durante una cantidad restringida de horas al día (como se explicará en detalle más adelante). Los animales tuvieron libre acceso al agua durante todo el protocolo experimental. Bajo estas condiciones no se requirió realizar una restricción calórica durante la evaluación comportamental en el protocolo de tasa progresiva (motivación).

Durante los experimentos, cada vez que los ratones debieron ser manipulados en oscuridad, se utilizó una luz roja tenue (< 5 lux). Los cambios de viruta de la jaula y otras manipulaciones se realizaron durante la porción nocturna del ciclo de luz/oscuridad a fin de

reducir al mínimo la influencia de los sincronizadores no-fóticos sobre los ritmos comportamentales de los animales.

Los procedimientos y protocolos utilizados en esta sección se ajustan estrictamente a las recomendaciones establecidas en las guías para cuidado y mantenimiento de animales de laboratorio emitidas por el Instituto Nacional de Salud de USA (NIH) y han sido aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAL) de la Universidad Nacional de Quilmes. El uso de modelos animales fue necesario debido a que las variables conductuales y fisiológicas que se estudiaron no pueden obtenerse *in vitro*. Por otra parte, el protocolo utilizado fue diseñado de manera tal de minimizar el número de animales involucrados en el experimento.

III.3.1.2 Registro de actividad locomotora

El registro de actividad locomotora se realizó de la misma forma que fue descripta en la sección de metodología del primer capítulo (ver sección I.3.2 del Capítulo I).

III.3.1.3 Protocolo de alimentación restringida temporalmente (TRF) con administración manual del alimento

El protocolo de alimentación restringida temporalmente (**TRF**) consistió en restringir el acceso de los ratones a la comida a sólo 3 horas diarias (durante el día o la noche del ciclo LD, según el grupo experimental, ver en la siguiente sección) para inducir la sincronización por comida de los ritmos fisiológicos y conductuales de los animales. Durante estas 3 horas diarias, los animales tuvieron acceso *ad libitum* al alimento, es decir, el alimento se encontraba en exceso y los animales podían comer la cantidad de comida que deseen. En este sentido, la restricción al alimento es temporal y no calórica, dado que no se restringe la cantidad de comida otorgada a los animales sino el tiempo de acceso a la misma. El alimento administrado durante el protocolo de TRF consistió en *pellets* regulares de alimento balanceado comercial. Los investigadores administraron y retiraron manualmente el alimento a los ratones de forma diaria a lo largo de todo el protocolo experimental.

III.3.1.4 Grupos y diseño experimental

Para poner a punto en nuestro laboratorio el protocolo de TRF y evidenciar las consecuencias de la sincronización por comida en la motivación por una recompensa de los ratones, se planificaron 3 grupos experimentales:

- **Grupo TRFD** (TRF Día): la restricción alimentaria de 3 horas diarias se realizó durante la fase de diurna del ciclo LD 12:12 (de **ZT4 a ZT7**); tamaño muestral: N=16.
- **Grupo TRFN** (TRF Noche): la restricción alimentaria de 3 horas diarias se realizó durante la fase nocturna del ciclo LD 12:12 (de **ZT16 a ZT19**); tamaño muestral: N=16.
- **Grupo *ad libitum*** (control): los animales fueron alimentados *ad libitum* durante la misma cantidad de días y bajo las mismas condiciones de alojamiento que los animales en los grupos de TRF; tamaño muestral: N=16.

Previo al inicio del protocolo de TRF, todos los grupos de animales fueron mantenidos con comida *ad libitum* por al menos 7 días. Durante este período, se registró la actividad locomotora (actividad total con detección de sensores de infrarrojo), el consumo de comida y el peso de los animales diariamente (registro y consumo basal). El día anterior al inicio del protocolo de TRF, se retiró toda la comida de la jaula de cada ratón y la misma fue devuelta 24 horas después, en el horario correspondiente al inicio del TRF para cada grupo (ZT4 para el TRFD y ZT16 para el grupo TRFN). En el grupo control no se retiró la comida. A partir de allí, todos los días los animales en el protocolo TRF fueron alimentados en el horario detallado previamente para cada grupo experimental. Se los mantuvo en este protocolo durante 15 días consecutivos, hasta evidenciar la aparición de la actividad anticipatoria a la comida (FAA), antes de ser evaluados comportamentalmente.

Luego, durante la tercera semana de TRF, todos los grupos fueron entrenados y testeados en el protocolo de PR para evaluar su motivación en dos momentos: a **ZT2-ZT4** (día) y a **ZT14-ZT16** (noche)[6]. Notar que, según el grupo experimental, uno de los horarios de evaluación

[6] En los capítulos anteriores de esta tesis hemos explicitado, por simplicidad, el momento de evaluación comportamental sólo mediante el horario (ZT) de inicio del test de motivación. Sin embargo, la prueba conductual tiene una duración de 2 horas, por lo cual, lo correcto sería expresar los horarios de evaluación como un rango. En este capítulo, explicitar el rango horario es relevante para el diseño del experimento por lo que, a lo largo del presente capítulo, los momentos de evaluación serán expresados por el rango de ZTs en el que se evaluó a los animales en el protocolo de PR.

elegidos coincide con el periodo de tiempo en el que se expresa la FAA y, el otro horario de evaluación ocurre 12 horas después, dentro de la fase opuesta del ciclo LD. Esto quiere decir que, para el grupo TRFD la evaluación de la motivación a ZT2-4 (día) es durante la FAA, y la evaluación a ZT14-16 es durante la fase de oscuridad (noche). Lo opuesto ocurre para el grupo TRFN, la motivación evaluada en la noche (ZT14-16) es durante la FAA, y el otro momento de evaluación ocurre en el día (ZT2-4, para una mejor comprensión ver el esquema de la **Figura III.3.1**). El grupo control *ad libitum* fue evaluado en los mismos puntos horarios que los grupos de TRF. El tamaño muestral para la evaluación en la prueba de motivación fue de: N=8/punto horario para TRFD, N=8/punto horario para TRFN, N=8/por punto horario para controles *ad lib*. Del análisis final de motivación, se descartó un ratón del punto horario del día del grupo TRFD y un ratón del punto horario del día para TRFN dado que no aprendieron la tarea en la etapa de condicionamiento operante o que realizaron menos de 10 presiones en la sesión de testeo de PR.

Una vez finalizada la evaluación conductual de motivación, se dejó a los animales una semana adicional bajo TRF y, luego, se realizó una deprivación completa de alimentación (*fasting*) por 2 días para evidenciar la expresión endógena del componente de FAA, a modo de corroborar la sincronización por comida. Para realizar el *fasting*, la comida se retiró a ZT7 (para TRFD) y a ZT19 (para TRFN) y fue devuelta 45 horas después, a ZT4 (para TRFD) y a ZT16 (para TRFN). Para el grupo control *ad libitum* también se realizó un *fasting* de 45 horas. Luego del *fasting*, los animales continuaron bajo el protocolo de TRF por 4-5 días adicionales y luego fueron sacrificados. En total, el protocolo de TRF tuvo una duración aproximada de 6 semanas.

Figura III.3.1. Protocolo de alimentación restringida temporalmente (TRF) y grupos experimentales. (A) En el protocolo de TRF se restringió el acceso a la comida a sólo 3 horas durante el día (grupo TRFD) o la noche (grupo TRFN) del ciclo LD. En el TRF, la comida se administró y retiró de forma manual y la actividad locomotora total de los animales fue medida mediante sensores infrarrojos en las jaulas. La semana previa al inicio del TRF, se realizaron los registros base de consumo de comida (*ad libitum*) y actividad. Luego de 15 días bajo TRF, una vez que los animales mostraron actividad anticipatoria a la comida (FAA), fueron entrenados y evaluados en el protocolo de PR para medir su motivación por una recompensa de comida. Se realizó un *fasting* de 45 horas en la quinta semana del TRF, para evidenciar la sincronización a la comida. **(B)** La motivación en los grupos experimentales se evaluó en dos momentos: durante el día (ZT2 a ZT4) y durante la noche (ZT14 a ZT16). En el grupo TRFD, la evaluación de día coincide con la FAA. Por el contrario, en el grupo TRFN la evaluación de la noche es la que coincide con la FAA. El grupo control (alimentado *ad libitum*) fue evaluado en los mismos horarios. N=20/grupo, para evaluar motivación: N=8/punto horario.

III.3.1.5 Mediciones del peso corporal y de ingesta diaria de alimento

Durante la semana de registro basal, previo al inicio del protocolo de TRF, se midió de forma diaria el consumo de comida y se registraron los pesos de los animales. Una vez iniciado el protocolo de TRF, el consumo de comida se midió de forma diaria hasta su finalización. Las mediciones se realizaron una vez retirada la comida luego del intervalo de 3 horas diarias de acceso a la misma. En cuanto al registro del pesaje de los animales durante el protocolo, se llevaron a cabo tres mediciones de peso en la primera semana del TRF, dos mediciones en la segunda semana y, a partir de la tercera semana, los ratones se pesaron sólo una vez por semana hasta la finalización del protocolo. Se planificó el pesaje de esta manera para mantener un control estricto sobre la reducción del peso de los animales durante las primeras semanas del TRF. Una vez confirmado que los animales consumían una cantidad adecuada de alimento durante las tres horas diarias de acceso, se redujo la frecuencia de los pesajes para minimizar las perturbaciones en las condiciones de alojamiento. Todos los ratones fueron pesados siempre al retirar el alimento; a ZT7 para el grupo TRFD y a ZT19 para el grupo TRFN.

III.3.1.6 Motivación por una recompensa de comida

Para evaluar la motivación en los grupos de ratones bajo el protocolo de TRF y los controles *ad libitum*, se utilizaron el mismo equipamiento, procedimiento y análisis de resultados descriptos en la sección I.3.3 del Capítulo I.

Los *pellets* obtenidos como recompensa por la presión de la palanca durante el protocolo, correspondían a *pellets* a base de granos de 20 mg (similares a la composición del alimento balanceado regular, Dustless Precision Pellets® Rodent Grain-Based, Bio-Serv, Flemington, NJ, USA).

III.3.1.7 Análisis de los datos

En todos los casos, se corroboró previamente que los datos cumplieran con los supuestos de normalidad y de normalidad de los residuos, mediante el test de Shapiro-Wilk, y con la homogeneidad de varianzas, mediante el test de Brown-Forsythe. Cuando los datos no

cumplieron los supuestos, se realizaron correcciones o se utilizaron tests estadísticos no paramétricos adecuados a la naturaleza de los datos y el diseño del estudio.

Para el análisis de los perfiles de actividad se utilizaron gráficos de *waveforms* individuales utilizando 6 días consecutivos durante el registro basal *ad libitum*, 6 días durante la cuarta semana del TRF, y 45 horas de registro de duración del *fasting*. El análisis consiste en graficar el promedio de la actividad de cada ratón de los días sucesivos en función de las horas del día, en este caso, con un período de 24 horas dadas las condiciones de LD 12:12. En cada *waveform* individual se analizó la actividad durante la fase diurna, obteniéndose el dato de actividad total en dicha fase y porcentaje que la misma representa respecto a la actividad total en las 24 horas. El mismo procedimiento se realizó para calcular el porcentaje de actividad en el FAA, tomando los datos de actividad en las dos horas previas al acceso a la comida. Así, el % de actividad diurna representa la proporción de la actividad total que ocurre entre ZT0 y ZT12, y el % de actividad durante la FAA la proporción de la actividad total que ocurre entre ZT2 y ZT4. Los datos obtenidos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía de medidas repetidas. También se realizaron *waveforms* promedio de cada grupo de animales a partir de sus *waveforms* individuales a fin de observar las características generales de la actividad en cada grupo. Las *waveforms* y los datos de la actividad se analizaron utilizando un programa de análisis para cronobiología denominado El Temps©, A. Díez Noguera, Universidad de Barcelona, España.

Para el análisis del consumo de comida a lo largo del tiempo se utilizó un modelo de efectos mixtos (REML) que es una variante al análisis del ANOVA de una vía de medidas repetidas cuando hay datos faltantes. Asimismo, para las comparaciones del consumo de comida y los pesos de los animales en el *ad libitum* y las semanas en el TRF entre los grupos de TRFD y TRFN se realizaron ANOVAS a dos vías de medidas repetidas.

Para el análisis de los índices motivacionales se realizaron t-test no pareados a dos colas para los horarios de evaluación dentro de cada grupo. Los gráficos de persistencia a lo largo de la tarea se realizaron de la misma forma descripta en la sección I.3.5.2 del Capítulo I.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando Graphpad Prism (GraphPad Software Inc., CA, USA). En todos los casos, el valor de alfa (α) se estableció en $p < 0.05$.

III.3.2 Protocolo de alimentación restringida temporalmente utilizando *feeders* automatizados

III.3.2.1 Animales y condiciones de alojamiento

Se utilizaron ratones macho y hembra de la cepa C57BL6/J adquiridos de proveedores comerciales (The Jackson Laboratory, Maine, USA). Los animales fueron alojados en jaulas grupales en el Bioterio de la *University of Texas Southwestern (*UTSW*) Medical Center* (Dallas, TX, USA) para su aclimatación antes de ser introducidos al protocolo experimental. Para todas las condiciones experimentales se utilizaron ratones jóvenes adultos, que tenían 3 meses de edad al inicio de los protocolos experimentales.

Dos semanas antes del inicio del protocolo experimental, los ratones fueron alojados en jaulas individuales cada una equipada con una rueda con sensores magnéticos para el registro de la actividad locomotora en rueda. Asimismo, cada jaula contaba con un sistema dispensador de *pellets* automatizado o *feeder* (que se describirán con más detalle más en la sección III.3.2.3). En dichas jaulas, los ratones fueron mantenidos bajo un fotoperiodo de 12 horas de luz seguidos de 12 horas de oscuridad (LD 12:12), con el encendido de las luces a las 7 AM y el apagado a las 7 PM. Por convención se definió a ZT12 como el momento de apagado de las luces. Las condiciones de la temperatura ambiental se mantuvieron constantes (20 ± 2 °C) y los ratones tuvieron libre acceso a agua y comida. Durante este periodo se realizaron los registros basales de la actividad locomotora y el consumo de comida.

Una vez iniciado el protocolo experimental, los ratones continuaron siendo alojados individualmente, con condiciones constantes de temperatura ambiental y bajo el mismo ciclo de LD 12:12. Respecto a la alimentación, se les permitió a los ratones el acceso a la comida de forma *ad libitum,* pero de manera restringida por cuatro horas durante la fase de luz u oscuridad del ciclo LD. Los animales tuvieron libre acceso al agua durante todo el protocolo experimental.

Durante los experimentos, cada vez que los ratones debieron ser manipulados en oscuridad, se utilizó una luz roja tenue (< 5 lux). Los cambios de viruta de la jaula y otras manipulaciones se realizaron durante la porción nocturna del ciclo LD. Los animales fueron inspeccionados visualmente para corroborar su estado general sólo una vez por semana, a menos que algún indicador de falla en el sistema de *feeders* así lo requiriese. Se redujo al mínimo la

presencia de los investigadores en la sala y las manipulaciones innecesarias de los animales a fin de reducir la influencia de los sincronizadores no-fóticos sobre los ritmos comportamentales de los animales.

Los procedimientos y protocolos utilizados en esta sección se ajustan estrictamente a las recomendaciones establecidas en las guías para cuidado y mantenimiento de animales de laboratorio emitidas por el Instituto Nacional de Salud de USA (NIH) y han sido aprobados por el *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) de la UTSW Medical Center. El uso de modelos animales fue necesario debido a que las variables conductuales y fisiológicas que se estudiaron no pueden obtenerse *in vitro*. Por otra parte, el protocolo utilizado fue diseñado de manera tal de minimizar el número de animales involucrados en el experimento.

III.3.2.2 Registro de actividad locomotora en rueda

El registro de actividad locomotora se realizó mediante ruedas individuales dentro de las jaulas de los ratones equipadas con un *switch reed* magnéticos que registran cada vez que el ratón hace un giro completo de la rueda. El recuento total de actividad en rueda para cada ratón se almacenó en intervalos de a 1 minuto mediante el sistema de adquisición de datos en ClockLab (Actimetrics, Wilmette, IL, USA).

III.3.2.3 Protocolo de alimentación restringida temporalmente (TRF) con *feeders* automatizados

En este experimento el protocolo de TRF consistió en restringir el acceso de los ratones a la comida a sólo 4 horas diarias durante el día o la noche del ciclo LD (según el grupo experimental, ver en la siguiente sección) para inducir la sincronización por comida de los ritmos fisiológicos y conductuales de los animales. Nuevamente, aquí la restricción al alimento es temporal y no calórica, dado que no se restringe la cantidad de comida otorgada a los animales sino el tiempo de acceso a la misma. La administración del alimento durante el protocolo de TRF se realizó con el sistema dispensador de *pellets* automatizado o *feeder* diseñado en el laboratorio del Dr. Joseph Takahashi en la UTSW [Acosta-Rodríguez et al, 2017]. Brevemente, el dispensador proporciona un único *pellet* de alimento de precisión de 300 mg (Dustless Precision Pellets® Rodent Purified,

Bio-Serv, Flemington, NJ, USA), y la medición del consumo de comida se puede lograr contando el número de *pellets* tomados por el ratón. Los *feeders* mantienen los *pellets* en una tolva que dispensa un *pellet* por un canal para su presentación al ratón. La entrega exitosa se confirma mediante la activación consecutiva de dos sensores ubicados debajo de la tolva (sensor de caída) y en la parte superior de la jaula (sensor de canal). Una vez que el ratón toma el *pellet*, se detecta la ausencia de alimento, y se registra en tiempo real por el *software* (ClockLab Chamber Control Software, Actimetrics, Wilmette, IL, USA). El tiempo de espera para la entrega entre un *pellet* y el siguiente estaba programado en 10 minutos con el fin de evitar que los ratones retiren los *pellets* de manera compulsiva y los acumulen en las jaulas.

III.3.2.4 Grupos y diseño experimental

Se utilizaron tanto ratones macho (N=50) como hembra (N=50) distribuidos cada uno en dos grupos experimentales (4 grupos experimentales en total):

- **Grupo TRFD** (TRF Día): la restricción alimentaria de 4 horas diarias se realizó durante la fase de diurna del ciclo LD 12:12 (de **ZT4 a ZT8**); tamaño muestral: N=25/sexo.
- **Grupo TRFN** (TRF Noche): la restricción alimentaria de 4 horas diarias se realizó durante la fase nocturna del ciclo LD 12:12 (de **ZT16 a ZT20**); tamaño muestral: N=25/sexo.

Previo al inicio del protocolo de TRF, todos los grupos de animales fueron mantenidos con comida *ad libitum* (*pellets* de precisión de 300 mg administrados por los *feeders*) por al menos 12 días. Durante este período, se registró la actividad locomotora en rueda, el consumo de comida y se realizó un solo pesaje de los animales (registro y consumo basal). A fin de evitar reducir bruscamente la cantidad de horas de acceso a la comida, se realizó una transición progresiva a lo largo de una semana. En dicho periodo de transición la cantidad de horas de acceso a la comida fue reducida de manera secuencial (12 horas de acceso por 3 días, 8 horas de acceso por dos días, y luego 4 horas de acceso finales). Una vez finalizada la semana de transición, los animales en el protocolo de TRF fueron alimentados en el horario detallado previamente para cada grupo experimental. Se los mantuvo en este protocolo durante 3 semanas, hasta evidenciar la aparición de la actividad anticipatoria a la comida de manera clara, y luego se los evaluó comportamentalmente.

Durante la cuarta semana de TRF, todos los grupos fueron entrenados y testeados en el protocolo de PR para evaluar su motivación en tres puntos horarios: a **ZT2-ZT4** (día temprano), **ZT9-ZT11** (día tardío) y a **ZT14-ZT16**. El tamaño muestral para la evaluación en la prueba de motivación fue de N=8/punto horario en TRFD para cada sexo, N=8/punto horario para TRFN para cada sexo. Del análisis final de motivación, se descartó un ratón del punto horario ZT9-11 de los grupos de TRFN en machos y hembras, y un ratón del punto horario ZT9-11 de grupo TRFD en machos, dado que no aprendieron la tarea en la etapa de condicionamiento operante o que realizaron menos de 10 presiones en la sesión de testeo de PR.

Una vez finalizada la evaluación conductual de motivación, se dejó a los animales dos semanas más bajo TRF y luego fueron sacrificados en distintos puntos horarios a lo largo de 24 horas para la colección de muestras de tejidos. En total, el protocolo experimental tuvo una duración aproximada de 9 semanas (ver la esquematización del diseño experimental en la **Figura III.3.2** en la siguiente página).

III.3.2.5 Mediciones del peso corporal y de ingesta diaria de alimento

Durante la semana de registro basal, previo al inicio del protocolo de TRF, se midió de forma diaria el consumo de comida mediante los *feeders* y se realizó un registro del peso corporal de todos los animales. Una vez iniciado el protocolo de TRF, el consumo de comida se midió de forma diaria hasta su finalización mediante los *feeders*. Se realizaron dos pesajes de los animales durante el protocolo de TRF, uno durante la primera semana (luego de la transición), y el otro en la sexta y última semana del protocolo, a modo de minimizar la manipulación y el estrés de los animales durante el experimento. Todas las mediciones de pesajes se realizaron 4 horas después de la finalización del acceso a la comida (según cada grupo) durante la porción nocturna del ciclo LD. Es decir, para los grupos de TRFD esto ocurrió a ZT12 luego del apagado de las luces, y para los grupos de TRFN a ZT24 antes del encendido de las luces.

Figura III.3.2. Protocolo de alimentación restringida temporalmente (TRF) utilizando *feeders* automatizados y ratones machos y hembras en los grupos experimentales. (A) En el protocolo de TRF se restringió el acceso a la comida a sólo 4 horas durante el día (grupo TRFD) o la noche (grupo TRFN) del ciclo LD. Durante el experimento, la comida se administró mediante un sistema de *feeders* ubicados en cada jaula y se midió la actividad locomotora en rueda. Dos semanas antes del inicio del TRF, se realizaron los registros basales de consumo de comida (*ad libitum*), actividad y pesos. Se llevó a cabo una semana de transición al TRF, en la cual las horas de disponibilidad de comida se fueron acortando de manera gradual. Durante la primera semana del TRF se registró el segundo pesaje de los animales. Luego de 3 semanas bajo TRF, una vez que los animales mostraron la FAA, fueron entrenados y evaluados en el protocolo de PR para medir su motivación por una recompensa de comida. Durante la última semana del protocolo se realizó la tercera medida de los pesos. **(B)** Los grupos experimentales consistieron en ratones macho y hembra en TRFD o TRFN evaluados en motivación en tres horarios distintos: a ZT2-ZT4 (día temprano), a ZT9-ZT11 (día tardío), a ZT14-ZT16 (noche). En el grupo TRFD, la evaluación del día temprano coincide con la FAA. Por el contrario, en el grupo TRFN la evaluación de la noche es la que coincide con el FAA.

III.3.2.6 Motivación por una recompensa de comida

Para evaluar la motivación en los grupos de ratones bajo el protocolo de TRF, se utilizó un equipamiento, procedimiento y análisis de resultados similar al descripto en la sección I.3.3 del Capítulo I. Las diferencias consistieron en que se utilizaron 8 jaulas comportamentales (en lugar de 4) para evaluar a los grupos de animales al mismo tiempo, y en que los *pellets* obtenidos como recompensa por la presión de la palanca durante el protocolo correspondían a *pellets* de 20 mg purificados (Dustless Precision Pellets® Rodent Purified 20 mg, F0071, Bio-Serv, Flemington, NJ, USA) con la misma composición que los *pellets* de 300 mg administrados por el sistema de *feeders*. Se utilizaron distintos animales para la evaluación conductual entre los diferentes horarios dentro de un mismo grupo experimental. Bajo condiciones de TRF no se requirió realizar una restricción calórica durante la evaluación en el protocolo de tasa progresiva.

III.3.2.7 Análisis de los datos

En todos los casos, se corroboró previamente que los datos cumplieran con los supuestos de normalidad y de normalidad de los residuos, mediante el test de Shapiro-Wilk, y con la homogeneidad de varianzas, mediante el test de Brown-Forsythe. Cuando los datos no cumplieron los supuestos, se realizaron correcciones o se utilizaron tests estadísticos no paramétricos adecuados a la naturaleza de los datos y el diseño del estudio.

Para el análisis de los perfiles de actividad mediante *waveforms* se utilizó el mismo procedimiento descripto previamente en la sección III.3.1.7. Los datos de actividad para el análisis en este caso consistieron en 7 días consecutivos durante el registro basal *ad libitum*, y 30 días consecutivos durante el TRF (semana 1 a 4 del TRF). Las *waveforms* y los cálculos de actividad total se realizaron mediante el programa ClockLab (Actimetrics). Los datos finales fueron analizados mediante un modelo de efectos mixtos (REML).

Para el análisis del consumo de comida en *ad libitum* y TRF entre machos y hembras, se realizaron ANOVAS a dos vías de medidas repetidas. Para el análisis los pesos en las distintas semanas del protocolo entre grupos de TRF también se realizaron ANOVAS a dos vías de medidas repetidas.

Para el análisis de los índices motivacionales se realizaron ANOVAS de una vía para los distintos horarios de evaluación dentro de cada grupo. Los gráficos de persistencia a lo largo de la tarea se realizaron de la misma forma descripta en la sección I.3.5.2 del Capítulo I. El análisis de la correlación entre el consumo de comida y el desempeño en la tarea de motivación se realizó mediante el análisis de correlación de Pearson (r).

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando Graphpad Prism (GraphPad Software Inc., CA, USA). En todos los casos, el valor de alfa (α) se estableció en $p < 0.05$.

III.4 Resultados

III.4.1 Motivación por una recompensa de comida en un protocolo de TRF con administración manual de la comida

Para evaluar cómo la sincronización por comida afecta la variación diaria de la motivación por una recompensa en ratones bajo un ciclo normal de luz/oscuridad, se utilizó un protocolo de alimentación restringida temporalmente (TRF). En dicho protocolo, el acceso de los ratones a la comida se restringió a 3 horas diarias durante la fase de luz (día) u oscuridad (noche) del ciclo LD. En este diseño experimental contamos con la presencia de dos agentes sincronizadores o *zeitgebers*: el ciclo de luz/oscuridad y la comida (administrada cíclicamente dentro de un intervalo temporal restringido). Teniendo en cuenta que la cepa de ratones utilizados tiene una naturaleza nocturna y tanto su actividad como su alimentación bajo condiciones normales ocurren durante la noche, el diseño del experimento plantea dos situaciones: 1) cuando se administra la comida durante la noche, ambos *zeitgebers* coinciden (están alineados); 2) cuando la comida se administra durante el día, los *zeitgebers* no coinciden (están desalineados) y se encuentran en fases opuestas. De esta forma, bajo la segunda situación podemos "desalinear" (del inglés, *misalign*) la sincronización fótica de la no-fótica por comida y evaluar cuál de las dos tiene una mayor relevancia en la modulación del ritmo diario de motivación por una recompensa de comida. Nuestra hipótesis inicial se basó en que el ritmo diario de motivación 'seguiría' al sincronizador no fótico (la comida) y, en consecuencia, cuando la comida este sólo presente durante el día los ratones mostrarían un pico en los niveles motivacionales coincidentes con la actividad anticipatoria a la comida (FAA). En este sentido, hipotetizamos que la disponibilidad de comida sería más relevante que el ciclo de luz-oscuridad para el sistema de recompensa, y los ratones serían capaces de 'correr' su ritmo motivacional hacia las horas diurnas, a pesar de su naturaleza nocturna.

Para corroborar dicha hipótesis, diseñamos tres grupos experimentales: el grupo **TRFD**, en el cual la restricción alimentaria temporal se realizó durante las horas diurnas del ciclo LD (acceso a la comida entre ZT4 y ZT7); el grupo **TRFN**, donde la restricción alimentaria temporal se realizó durante las horas nocturnas del ciclo LD (acceso a la comida entre ZT16 y ZT19); y un tercer grupo control, bajo las mismas condiciones de alojamiento y estímulos que los grupos de TRF, pero con comida *ad libitum* durante todo el experimento. Es necesario aclarar que bajo

condiciones de alimentación *ad libitum*, los ratones concentran su mayor ingesta de comida durante las horas nocturnas del ciclo LD, es por ello que, en esencia, los patrones de actividad y los ritmos circadianos entre el grupo TRFN y el grupo control deberían ser similares (en ambos casos, los dos *zeitgebers* están alineados). En este sentido, en la puesta a punto del protocolo de TRF fue necesario incluir un control *ad libitum* para descartar la posible influencia de cualquier otro estímulo no-fótico que estuviera interfiriendo con la sincronización por comida en los grupos de TRF (presencia diaria de los investigadores al administrar-retirar la comida, entrenamiento en el protocolo de tasa progresiva, cambios de jaula, pesajes, etc.). Así, los controles *ad libitum* servirían para controlar la correcta sincronización a la comida del grupo TRF y como 'detectores' de otros estímulos sincronizadores no deseados durante todo el protocolo experimental. Asimismo, el grupo de mayor relevancia para corroborar nuestra hipótesis es el TRFD, en el cual la comida está solo disponible durante el día. Este grupo nos permite corroborar si la sincronización por comida fue efectiva (debido a que podemos evidenciar con facilidad la expresión del FAA durante las horas diurnas) y, a su vez, dilucidar si la variación diaria en la motivación bajo un ciclo LD 'se corre' siguiendo a la comida, guiada, al menos en parte, por el componente homeostático que señaliza al sistema de recompensa.

III.4.1.1 Patrones de actividad locomotora en el protocolo de TRF

En cuanto a al ritmo de actividad locomotora de los distintos grupos a lo largo de todo el experimento (**Figura III.4.1**), el grupo TRFD mostró claramente la aparición del componente de FAA, entre una a dos horas antes del acceso diario a la comida, durante la primera semana de iniciado el protocolo de TRF. Asimismo, se puede observar que en la sincronización por comida los animales distribuyen su actividad locomotora total entre el día y la noche, corriendo parte de su actividad nocturna hacia las horas del día en anticipación a la comida (Figura III.4.1 A). Por otro lado, se puede observar que los patrones de actividad del grupo TRFN son muy similares a los de los ratones alimentados *ad libitum*, con la mayor actividad locomotora concentrada durante la noche (Figura III.4.1 B y C). En el caso del grupo TRFN, el componente de FAA no se puede distinguir claramente porque está 'enmascarado' en la propia actividad nocturna de los animales.

Asimismo, los actogramas evidencian que, para todos los grupos, no hubo influencia de otros estímulos sincronizadores no-fóticos a lo largo del protocolo.

Figura III.4.1. Patrones de actividad locomotora bajo el protocolo de alimentación restringida temporalmente (TRF) y en condiciones control de alimentación *ad libitum*. Se muestran actogramas simples representativos de la actividad locomotora de los distintos grupos a lo largo del protocolo experimental. El sombreado rosado indica los momentos de disponibilidad de comida, el sombreado gris indica la porción de oscuridad del ciclo LD 12:12. **(A)** Los ratones TRFD que tuvieron solo 3 horas de acceso a la comida durante las horas diurnas (ZT4-7) muestran una clara actividad anticipatoria (FAA) durante el día, lo que corrobora la sincronización a la disponibilidad restringida de comida. **(B)** Por el contrario, los ratones que fueron tuvieron 3 horas de acceso a la comida durante la noche (ZT16-19), no modifican en gran medida sus patrones de actividad, concentrándola durante la porción de oscuridad del ciclo LD. **(C)** Los ratones en el grupo control alimentados *ad libitum* también concentran su mayor actividad locomotora durante las horas de la noche, como es de esperarse en una especie nocturna. Notar que los espacios hacia el final del protocolo en donde no se administró comida (alrededor del día 35 en los actogramas) corresponden al *fasting* de 45 horas realizado para corroborar la sincronización endógena a la comida.

Asimismo, dado que el protocolo de TRF fue implementado por primera vez en el laboratorio para esta tesis, se debió poner a punto y evaluar la efectividad de la sincronización por comida. Por un lado, esto se corroboró visualmente mediante la aparición del componente de FAA en todos los ratones del grupo TRFD. Por otro lado, la efectividad del protocolo utilizado se confirmó al retirar la comida por completo durante casi dos días (*fasting* de 45 horas, ver al final de los actogramas en Figura III.4.1) y observar que los animales seguían expresando el componente de FAA endógenamente aún en ausencia del estímulo sincronizador. Para el TRFD, se cuantificó el aumento en la actividad diurna y la aparición del FAA graficando los perfiles de actividad en *waveforms* individuales para todos los ratones del grupo; luego, se calculó el área bajo la curva de los rangos temporales correspondientes (entre ZT0-ZT12 para cantidad de actividad diurna, y entre ZT2-ZT4 para el FAA), y se comparó estadísticamente dichas cuantificaciones entre el registro basal (*ad libitum* previo al inicio del TRF), el TRF y el *fasting* (ver gráficos de *waveforms* promedio para cada set de datos en la **Figura III.4.2 A**). Los resultados de la cuantificación mostraron que los ratones en TRF muestran un alto porcentaje de actividad diurna que se mantiene asimismo durante el *fasting*, en comparación al registro base *ad libitum* previo (**Figura III.4.2 B**, $p<0.0001$, ANOVA a una vía de medidas repetidas; $p<0.0001$ para *ad libitum* vs TRF, $p<0.0001$ para *ad libitum* vs *fasting*, y $p=0.3504$ para TRF vs *fasting*, post test de Tukey). Asimismo, el mayor porcentaje de actividad diurna está concentrado durante las dos horas previas al acceso a la comida, es decir, durante el rango temporal donde encontramos normalmente al componente de FAA (**Figura III.4.2 C**, $p<0.0001$ ANOVA a una vía de medidas repetidas; $p<0.0001$ para *ad libitum* vs TRF, post test de Tukey). Además, los ratones mantuvieron la FAA durante el *fasting* ($p<0.0001$ para *ad libitum* vs *fasting*, post test de Tukey), lo que corrobora la sincronización por comida. Las diferencias significativas del porcentaje de actividad durante el FAA entre el TRF y el *fasting* ($p<0.0001$ para TRF vs *fasting*, post test de Tukey) pueden deberse a que la serie temporal de datos para el *fasting* es corta (sólo dos días, dado que no se es físicamente posible ni éticamente correcto hambrear a los ratones por más de 48 horas) aunque también podrían sugerir una caída en la amplitud del ritmo endógeno del FAA bajo condiciones constantes.

Figura III.4.2. Cuantificación de la cantidad de actividad diurna y expresión de la FAA en el grupo de ratones bajo un protocolo de alimentación restringida temporalmente durante el día (TRFD). (A) Se muestran las *waveforms* promedio del grupo de ratones en TRFD calculadas en tres intervalos temporales distintos a lo largo del protocolo experimental: durante el registro basal (previo al inicio del TRF, donde los ratones estaban alimentados *ad libitum*), durante el TRF, y durante el *fasting*. El recuadro rayado indica el momento en el protocolo donde la comida estaba disponible (ZT4 a ZT7) y el recuadro violeta indica el rango temporal utilizado para calcular el componente de FAA (2 horas previas al acceso a la comida, es decir, de ZT2 a ZT4). A partir de las *waveforms* se calculó el área bajo la curva entre ZT0 y ZT12 (actividad diurna) y entre ZT2 y ZT4 (actividad en la zona de FAA) para el *ad libitum* base, el TRF y el *fasting*. La actividad se muestra como el % de la actividad total diaria. **(B)** Los ratones en el TRF y durante el *fasting* muestran mayores porcentajes de actividad diurna ($p<0.0001$, ANOVA a una vía de medidas repetidas) y **(C)** mayores porcentajes de actividad en la zona de FAA ($p<0.0001$, ANOVA a una vía de medidas repetidas) comparados al registro previo con comida *ad libitum.* Los datos se muestran como la media ± SEM (N=16). ***$p<0.001$, post test de Tukey para comparaciones múltiples.

III.4.1.3 Consumo diario de comida y pesos en el protocolo de TRF

Se realizaron medidas del consumo de comida diario y se registró el peso de los ratones de ambos grupos bajo TRF durante todo el protocolo experimental. Los resultados de la ingesta diaria de comida de los ratones TRFD y TRFN a lo largo de los días (**Figura III.4.3 A**) evidenciaron que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, pero sí a lo largo del tiempo (factor Grupo: $p=0.3076$, factor Tiempo: $p<0.0001$, Interacción: $p<0.0001$, modelo de efectos mixtos REML). El factor interacción es significativo en el modelo dado que las curvas de consumo de comida de los grupos se cruzan varias veces durante el protocolo, debido a ello, hay un efecto del grupo en el consumo de comida a lo largo del tiempo. Durante la primera semana del protocolo de TRF, el grupo TRFD presenta una reducción significativa de la ingesta de comida que luego aumenta hacia la segunda semana (**Figura III.4.3 B**, factor Grupo: $p=0.6045$, factor Tiempo: $p<0.0001$, Interacción: $p<0.0001$, ANOVA de dos vías de medidas repetidas; TRFD: $p<0.0001$ para *Ad libitum* vs TRF semana 1, $p<0.0001$ para TRF semana 1 vs TRF semana 2, post test de Sidak). Asimismo, para el grupo TRFN también se observó una reducción de la ingesta durante la primera semana del protocolo de TRF (Figura III.4.3 B, TRFN: $p=0.0053$ para *Ad libitum* vs TRF semana 1, $p<0.0001$ para TRF semana 1 vs TRF semana 2, post test de Sidak). Sin embargo, esta disminución en el consumo de comida durante la primera semana del TRF es más pronunciada para el grupo TRFD dado que los animales tienen que adaptarse bruscamente a concentrar su ingesta de alimentos durante las horas diurnas (y dentro de un rango muy acotado de tiempo). Dicha adaptación les requiere un tiempo considerable (ver en la Figura III.4.3 A la curva gris claro durante la primera semana del TRF) dado que no están acostumbrados a comer sólo durante el día. A pesar de que los animales del grupo TRFD aumentan la ingesta de alimento para la segunda semana del protocolo, no vuelven a alcanzar los mismos valores que en condiciones de *ad libitum* (Figura III.4.3 B, TRFD: $p=0.0015$ para *Ad libitum* vs TRF semana 2, post test de Sidak); por el contrario, el grupo TRFN en la segunda semana de TRF consume la misma cantidad de alimento que bajo condiciones de *ad libitum* (Figura III.4.3 B, TRFN: $p=0.9975$ para *Ad libitum* vs TRF semana 2, post test de Sidak). Esto sugeriría que los ratones en TRFD se estarían autoimponiendo una restricción calórica además de la restricción temporal planteada por el protocolo experimental. Por otro lado, en la Figura III.4.3 A podemos observar una leve caída en la ingesta

de comida durante la semana de entrenamiento en motivación (tercera semana del TRF). Esto se explica dado que los animales consumen una parte de su ingesta diaria de comida a modo de recompensa durante las sesiones de tasa progresiva.

Por otro lado, los pesos corporales de los animales en el protocolo de TRF (**Figura III.4.3 C**) muestran diferencias significativas entre los grupos de TRF y entre las distintas semanas del experimento (factor Grupo: $p<0.0001$, factor Tiempo: $p<0.0001$, Interacción: $p=0.0640$, modelo de efectos mixtos REML). La diferencia observada entre grupos se debe probablemente a que los pesos iniciales entre los ratones de TRFD y los de TRFN fueron distintos y, en consecuencia, el posterior aumento de peso a lo largo de las semanas del protocolo también lo es. Una posible explicación para esta diferencia de pesos iniciales podría ser el haber utilizado distintas camadas de ratones en cada grupo; para experimentos futuros se deberá tener un mayor control de la distribución de los pesos y randomizarlos adecuadamente entre los distintos grupos. A pesar de esto, se puede observar que en ambos grupos hay un aumento significativo de los pesos durante la primera semana del protocolo de TRF respecto al registro base en *ad libitum* (TRFD: $p<0.0001$ para *Ad libitum* vs TRF semana 1; TRFN, $p=0.0002$ para *Ad libitum* vs TRF semana 1; post test de Sidak). Esto indicó que a pesar de la reducción en la ingesta de comida durante los primeros días de TRF, los animales lograron finalmente acomodar su ingesta al horario impuesto y aumentar su peso corporal durante dicha semana. Por otro lado, se observó que para la segunda semana del protocolo de TRF los ratones alimentados durante el día no continuaron aumentando su peso, mientras que los alimentados en la noche sí lo hicieron (TRFD: $p=0.9506$ entre TRF semana 1 y TRF semana 2; TRFN: $p<0.0001$ entre TRF semana 1 y TRF semana 2; post test de Sidak). Este resultado está en línea con la hipótesis de que el grupo de TRFD se autoimpone una restricción calórica además de la restricción temporal en la ingesta de comida.

En conjunto, estos resultados indicaron que a lo largo del protocolo de TRF no se evidenciaron diferencias significativas en el consumo de comida entre los grupos. Sin embargo, se observó que el grupo TRFD experimentó una reducción más marcada en la ingesta de alimentos durante los primeros días del TRF. Esta variación puede atribuirse al período de adaptación que los ratones deben enfrentar al cambiar a un horario de alimentación diurno al que no están acostumbrados. Además, parecería que los ratones con una restricción alimentaria

temporal durante el día tienden, además, a consumir menor cantidad de comida de forma autoimpuesta (restricción calórica) en comparación con su consumo bajo condiciones de *ad libitum.*

Figura III.4.3. Consumo de comida y pesos a lo largo del protocolo de alimentación restringida temporalmente (TRF). (A) Se muestra el consumo de comida diario para los grupos TRFD y TRFN a lo largo del experimento. No se evidenciaron diferencias de ingesta entre grupos, pero sí a lo largo del tiempo (factor Grupo: p=0.3076, factor Tiempo: p<0.0001, modelo de efectos mixtos REML). **(B)** Cuantificación del consumo de comida en ambos grupos, comparando la ingesta entre el consumo *ad libitum* previo al TRF, y la primera y segunda semana bajo el protocolo de TRF (factor Grupo: p=0.6045, factor Tiempo: p<0.0001, ANOVA de dos vías de medidas repetidas). **(C)** Medidas de peso corporal de los animales en los grupos TRFD y TRFN durante la semana previa al inicio del TRF y durante las dos primeras semanas bajo TRF (factor Grupo: p<0.0001, factor Tiempo: p<0.0001, modelo de efectos mixtos REML). Los datos se muestran como la media ± SEM (N=20/grupo). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, post test de Sidak para comparaciones múltiples.

III.4.1.3 Motivación por una recompensa de comida en el protocolo de TRF

Como hemos mencionado, el objetivo principal de los experimentos de alimentación restringida temporalmente fue evidenciar el efecto de la sincronización dual a la comida y al ciclo LD sobre el comportamiento de motivación por una recompensa, y en particular, evaluar cómo se veía modificada la variación diaria en la motivación cuando ambos agentes sincronizadores se encuentran desalineados (TRFD) o alineados (TRFN). Para ello, subdividimos ambos grupos de TRF para evaluar a los ratones en el protocolo de tasa progresiva en dos puntos horarios: en el día (de ZT2 a ZT4) y en la noche (de ZT14 a ZT16). En la **Figura III.4.4** se muestran actogramas representativos de los ratones en TRFD y TRFN que fueron subdivididos en dos dentro de cada grupo principal: la mitad evaluado en el día y la otra mitad en la noche. Asimismo, en dichos actogramas se puede observar que los horarios de evaluación y el propio entrenamiento en el protocolo de tasa progresiva no afectaron la expresión de la FAA o la actividad locomotora general de los animales. Por último, antes de presentar los resultados del test de motivación es importante resaltar que, para el grupo TRFD, el punto horario de evaluación de día coincide con el momento en el que los animales expresan la FAA, es decir, las dos horas de evaluación en la sesión de motivación ocurren en el momento exacto en que los animales muestran el incremento en la actividad anticipatoria a la disponibilidad de alimento, que es característica de la sincronización por comida. Asimismo, para este grupo, el punto de evaluación de la noche coincide con la mayor actividad nocturna de los animales bajo un ciclo LD. Por otro lado, en el grupo TRFN ocurre lo opuesto: el punto horario de evaluación del día coincide con la menor actividad diurna bajo un ciclo LD, y el punto horario de la noche coincide con la FAA consecuente de la sincronización por comida.

En cuanto a los resultados de los niveles motivacionales, el grupo con la restricción temporal durante el día (TRFD) presentó una alta motivación por la recompensa de comida en ambos puntos horarios de evaluación (día y noche) y no se encontraron diferencias significativas entre ellos, tal como se observó para el número total de presiones de palanca realizadas (**Figura III.4.5 A**, p=0.3025, t-test a dos colas), la cantidad total de recompensas obtenidas (**Figura III.4.5 B**, p=0.3343, t-test a dos colas), y el *breaking point* (**Figura III.4.5 C**, p=0.4970, t-test a dos colas).

Figura III.4.4. Actogramas representativos de los grupos TRFD y TRFN evaluados en motivación por una recompensa en el día y en la noche. En sombreado rosado se muestra el momento de disponibilidad de comida. En sombreado gris se representan las horas de oscuridad del ciclo LD 12:12. **(A)** El grupo de TRFD, con acceso restringido a la comida durante el día (ZT4 a ZT7), fue subdividido y evaluado en el protocolo de tasa progresiva durante el día (ZT2-ZT4) coincidente con la expresión de la FAA, y durante la noche (ZT14-ZT16). **(B)** El grupo TRFN, con acceso restringido a la comida durante la noche (ZT16 a ZT19), fue también subdividido para su evaluación conductual en el punto horario del día (ZT2-ZT4) y de la noche (ZT14-ZT16), siendo este último coincidente con la expresión de la FAA en este caso.

Asimismo, las curvas de persistencia a lo largo de la sesión de PR mostraron ser iguales para ambos horarios en los que se evaluó al grupo TRFD (**Figura III.4.5 D,** p=0.5513, test de Mantel-Cox). Esto indicó que, tanto en el día como en la noche, los animales del grupo TRFD se mantuvieron presionando activamente la palanca para obtener las recompensas hasta el final de la sesión de motivación (medianas de sobrevida: 119.6 min para TRFD Día, y 118.3 min para TRFD Noche). En cuanto a los resultados del grupo TRFN, se encontraron diferencias significativas entre los niveles motivacionales del día y la noche, siendo estos últimos mayores tanto para el número de presiones de palanca realizadas (**Figura III.4.5 E**, p=0.0009, t-test a dos colas), las recompensas obtenidas (**Figura III.4.5 F**, p=0.0016, t-test a dos colas) y el *breaking point* (**Figura III.4.5 G**, p=0.0007, t-test a dos colas). Además, la persistencia a lo largo de sesión de motivación fue mayor para los ratones TRFN evaluados en la noche (**Figura III.4.5 H**, p<0.0001, test de Mantel-Cox) dado que la mitad de los animales evaluados en este punto horario se mantuvo activo hasta casi el final de la tarea comportamental, mientras que en el caso de los evaluados en el día abandonan la tarea mucho antes (medianas de supervivencia: 119.7 min para TRFN Noche y 68.6 min para TRFN Día).

En conjunto, estos resultados evidenciaron que los ratones que tienen acceso a la comida por 3 horas durante la fase de luz del ciclo LD (TRFD) presentan altos niveles motivacionales durante el día en coincidencia con la FAA, pero que, a su vez, los niveles motivacionales de la noche también son elevados, lo que genera que no se evidencien diferencias significativas entre ambos puntos horarios de evaluación. En otras palabras, cuando los ratones se encuentran sincronizados a la comida durante el día (condición en la cual los *zeitgebers* luz y comida están desalineados) su motivación en las horas precedentes al acceso al alimento aumenta, pero - y en contraposición a nuestra hipótesis inicial - los ratones también siguen manifestando una alta motivación por la recompensa de comida durante la noche. Por otro lado, los ratones con un acceso a la comida restringido temporalmente a la noche (TRFN, condición en la que ambos *zeitgebers* están alineados) muestran la típica variación día-noche en la motivación por una recompensa, con menores niveles motivacionales durante el día y una alta motivación durante la noche coincidente con su fase de mayor actividad.

Figura III.4.5. Motivación por una recompensa de comida bajo condiciones de restricción alimentaria temporal durante el día y la noche. Los ratones con acceso restringido a la comida durante el día (TRFD) fueron evaluados en el protocolo de tasa progresiva en dos horarios: a ZT2-ZT4 (Día, coincidente con la FAA), y a ZT14-16 (Noche). Presentaron altos niveles motivacionales en ambos puntos horarios, tal como lo demuestran **(A)** las presiones de palanca realizadas (p=0.3025, t-test a dos colas), **(B)** las recompensas obtenidas (p=0.3343, t-test a dos colas), **(C)** el *breaking point* (p=0.4970, t-test a dos colas), y **(D)** las curvas de persistencia (p=0.5513, test de Mantel-Cox). Los ratones restringidos a comer sólo durante la noche (TRFN) fueron evaluados en motivación en los mismos horarios: ZT2-4 (Día) y ZT14-16 (Noche, coincidente con la FAA). Mostraron una diferencia día-noche con mayores niveles de motivación durante el horario nocturno, tal como se observa para **(E)** las presiones de palanca (p=0.0009, t-test a dos colas), **(F)** las recompensas (p=0.0016, t-test a dos colas), **(G)** el *breaking point* (p=0.0007, t-test a dos colas) y **(H)** la persistencia en la tarea (p<0.0001, test de Mantel-Cox). Los datos se muestran como la media ± SEM (N=7 para TRFD y TRFN punto Día; N=8 para TRFD y TRFN punto Noche). **p<0.01, ***p<0.001.

Finalmente, es necesario mencionar que en este experimento, y tal como se mencionó en los Métodos, también evaluamos en el protocolo de motivación al grupo control (alimentación *ad libitum,* sin restricción calórica) en los mismos horarios que los grupos de TRF. Los resultados no pueden mostrarse aquí dado que este grupo no aprendió la asociación palanca-recompensa de la etapa de condicionamiento operante del entrenamiento, por lo cual no se pudo pasar a la fase de testeo en la prueba de tasa progresiva. Por lo tanto, los ratones alimentados *ad libitum* sin una restricción calórica o temporal previa no están dispuestos a hacer un esfuerzo para obtener una recompensa de alimento regular (no palatable). Adicionalmente, decidimos realizar una sesión de PR adicional en este grupo luego del *fasting* de 45 horas al que fueron sometidos (ver actograma representativo en Figura III.4.1). Los animales fueron evaluados inmediatamente luego del *fasting*, tanto en el punto de día como en el de la noche. Sin embargo, los ratones realizaron, en general, menos de 30 presiones de palanca totales a lo largo de toda la sesión de PR, por lo cual, sus resultados tampoco pueden ser tenidos en cuenta (*Ad libitum* punto Día: 2 ± 0.65 en presiones realizadas; *Ad libitum* punto Noche: 29.4 ± 17.22 en presiones realizadas; N=8 por horario y por grupo; datos expresados como media ± SEM). Esto demostró que para que haya un correcto desempeño en la tarea de motivación los animales no sólo tienen que tener un déficit calórico, sino que el aprendizaje (asociación palanca-recompensa) durante el entrenamiento es esencial.

III.4.2 Motivación por una recompensa de comida en ratones macho y hembra bajo un protocolo de TRF con administración de comida mediante *feeders* automatizados

Los resultados preliminares obtenidos en la puesta a punto del protocolo de TRF rechazaron nuestra hipótesis inicial de que el ritmo diario motivacional se 'correría' hacia las horas diurnas cuando la sincronización por comida ocurriera en el día y, a su vez, abrieron un nuevo interrogante experimental: ¿Es posible que los componentes del sistema de recompensa estén sincronizados o bajo la influencia de ambos *zeitgebers* (luz y comida) al mismo tiempo? Para intentar responder esta pregunta, nos propusimos realizar el experimento de TRF a mayor

escala y con algunas modificaciones: 1) utilizar ratones hembra y macho (N=50/sexo); 2) utilizar *feeders* automatizados para independizarnos de la administración manual de la comida; 3) medir la motivación en tres puntos horarios; 4) tomar muestras de diferentes tejidos para realizar un análisis de la transcriptómica. El utilizar ratones macho y hembra nos permitiría evidenciar si existen diferencias en la respuesta al protocolo y en la motivación sexo-dependientes. Asimismo, el uso de *feeders* para administrar la comida nos permitiría un mejor manejo de las condiciones experimentales en un tamaño muestral tan grande y, asimismo, reducir el impacto de la presencia de los investigadores en la sincronización por comida. Por último, el objetivo de sumar un tercer punto horario para evaluar la motivación fue corroborar si en el grupo de TRFD los niveles motivacionales se encontraban siempre altos o si estábamos en presencia de un 'doble pico', en donde la motivación se encuentra alta en el día a causa de la FAA y la sincronización por comida, disminuye luego del acceso a la comida, y vuelve a incrementarse durante la noche a causa de la sincronización al ciclo LD 12:12.

El diseño consistió en subdividir a los ratones macho y hembra en dos grupos experimentales para cada sexo: alimentación restringida temporalmente durante el día (**TRFD**, con acceso a la comida entre ZT4 y ZT8) y durante la noche (**TRFN**, con acceso a la comida entre ZT16 y ZT20)[7]. Todos los grupos fueron evaluados en el protocolo de tasa progresiva para medir su motivación por una recompensa en tres puntos horarios: ZT2-ZT4 (día temprano), ZT9-ZT11 (día tardío), y ZT14-ZT16 (noche).

El presente experimento fue íntegramente realizado como parte de una estadía de investigación en el laboratorio del Dr. Joseph Takahashi en la *University of Texas Southwestern* (UTSW) *Medical Center*, en Dallas, Texas, USA. Los resultados del perfil transcripcional en diferentes tejidos aún se encuentran bajo análisis en colaboración con el laboratorio del Dr. Takahashi y el laboratorio de la Dra. Genevieve Konopka de la UTSW Medical Center.

[7] En este caso, y debido a poder contar con los *feeders* automatizados para la administración del alimento, se optó por dar acceso a la comida durante 4 horas diarias centradas en la mitad del día (ZT6) o la noche (ZT18) para asegurar una distribución equilibrada de la cantidad de horas de comida durante el día y la noche del LD 12:12.

III.4.2.1 Patrones de actividad locomotora y de alimentación en el protocolo de TRF con *feeders* automatizados

Los patrones de actividad locomotora diaria fueron registrados a lo largo de todo el protocolo experimental mediante el uso de ruedas en cada jaula. Asimismo, al utilizar *feeders* automatizados para administrar la comida, pudimos contar con un registro preciso de los eventos de alimentación de los ratones. A modo de ejemplificación se muestran en la **Figura III.4.6** los actogramas representativos para cada grupo experimental. En dichos actogramas los círculos rojos representan el momento exacto en que un *pellet* de alimento fue recolectado del *feeder* para ser ingerido por el ratón. Adicionalmente, en este experimento decidimos llevar a cabo una transición al TRF en lugar de reducir bruscamente las horas de acceso a la comida. Así, a lo largo de los días sucesivos, las horas de acceso a la comida se fueron reduciendo de manera secuencial (tres días de 12 horas de acceso a la comida, seguido de dos días de 8 horas, y por último 4 horas). El objetivo de esta transición fue reducir el impacto del cambio en el horario de comida, principalmente para los grupos de TRFD. A partir de la observación de los actogramas, podemos evidenciar a simple vista dos características del protocolo de TRF, principalmente en el grupo con la alimentación restringida en el día. Por un lado, los animales comen la mayor cantidad de comida durante la primera hora de acceso al alimento (entre ZT4 y ZT5, ver en Figura III.4.6 A y C la mayor concentración de puntos rojos). Por otro lado, en este protocolo, la consolidación de la FAA en el día es más lenta y parecería tener una menor amplitud (menor cantidad de actividad) que lo observado en el experimento previo. Adicionalmente, en los grupos de TRFN (Figura III.4.6 B y D) la FAA nuevamente se encuentra 'enmascarada' por la normal actividad nocturna de los animales.

Para cuantificar la actividad diurna y la actividad anticipatoria a la comida en los grupos de TRFD, se graficaron los perfiles de actividad (*waveforms*) individuales de cada ratón y luego, se registró la cantidad de actividad dentro de cada intervalo temporal (ZT0 a ZT12 para actividad diurna, y ZT2 a ZT4 para FAA). En la **Figura III.4.6 A** se pueden observar las *waveform* promedio de los animales en los grupos de TRFD (machos y hembras) tanto para el registro base *ad libitum* como durante el protocolo de TRF. En dichos gráficos es interesante notar la diferencia de amplitud entre la actividad anticipatoria en el día y la actividad durante la fase de oscuridad del

Figura III.4.6. Actogramas representativos de los grupos experimentales bajo el protocolo de TRF. Se muestran los patrones de actividad locomotora en rueda para los grupos de ratones macho y hembra con **(A)** y **(C)** alimentación restringida durante el día (TRFD, acceso a la comida entre ZT4-8), **(B)** y **(D)** con alimentación restringida durante la noche (TRFN, acceso a la comida de ZT16-20), respectivamente. Con un sombreado gris se indican las horas de oscuridad del ciclo LD 12:12. Cada punto rojo sobre el actograma representan el momento exacto en el que un *pellet* de comida fue retirado del *feeder* e ingerido por el ratón. Se indican, al costado de cada actograma, los días de registro base bajo alimentación *ad libitum*, la transición al TRF (líneas punteadas) y las semanas bajo el protocolo de TRF.

ciclo LD 12:12. Tanto los machos como las hembras, aunque aumentan su actividad diurna a causa del protocolo de TRF, concentran la mayor cantidad de actividad en rueda durante la noche. Asimismo, en ambos grupos se evidencia que el 'pico' de FAA coincide casi con exactitud con el horario de acceso a la comida (ZT4), y que los animales mantienen una alta actividad locomotora en la rueda durante las horas posteriores al acceso a la comida. Para complementar estas observaciones, en el análisis estadístico del porcentaje de actividad diurna, se evidenció un aumento en la actividad durante el protocolo de TRF, comparado con el *ad libitum* previo, para ambos sexos (**Figura III.4.6 B**, factor Sexo: p=0.0018, factor Protocolo: p<0.0001, Interacción: p=0.0234, Modelo de efectos mixtos REML; *Ad libitum* vs TRF: p<0.0001 para Machos y p= 0.0128 para Hembras, post test de Sidak). La significancia de la interacción entre ambos factores sugiere que las diferencias en la actividad basal bajo condiciones *ad libitum*, siendo menor en las hembras, podrían influir de manera diferencial en cómo ambos sexos responden al TRF en términos de actividad diurna. Teniendo en cuenta esto, la diferencia en el porcentaje de actividad diurna bajo el protocolo de TRF entre machos y hembras fue significativa, con los machos mostrando casi un 20% de su actividad concentrada durante el día (Machos vs Hembras: p=0.0001 para TRF, post test de Sidak). Adicionalmente, la cuantificación de la actividad entre ZT2-4, típicamente asociada con el componente de la FAA como consecuencia de la sincronización por comida, reveló un mayor porcentaje de actividad durante el protocolo de TRF en comparación al *ad libitum* previo, tanto para los machos como las hembras (**Figura III.4.7 C**, factor Sexo: p=0.0070, factor Protocolo: p<0.0001, Interacción: 0.0692, Modelo de efectos mixtos REML; *Ad libitum* vs TRF: p<0.0001 para Machos y p=0.0142 para Hembras, post test de Sidak). Nuevamente, los machos muestran un mayor porcentaje de actividad anticipatoria a la comida durante el TRF en comparación a las hembras (Machos vs Hembras: p=0.0019 para TRF, post test de Sidak).

Figura III.4.7. Cuantificación de la actividad diurna y del componente de la FAA en ratones macho y hembra con alimentación restringida durante el día (TRFD). (A) Se muestran las *waveforms* promedio para machos (paneles superiores) y hembras (paneles inferiores) en el grupo TRFD. Las mismas fueron graficadas en dos intervalos del protocolo experimental: durante el registro base (previo al inicio del TRF, con alimentación *ad libitum*) y durante el TRF. El sombreado rosado indica la disponibilidad de comida (ZT4 a ZT8), el sombreado verde indica el rango temporal utilizado para calcular el componente de FAA (ZT2 a ZT4), y el sombreado gris indica las horas de oscuridad del ciclo LD 12:12. Los datos en los perfiles de actividad se muestran como la media ± SEM. **(B)** Porcentaje de actividad diurna en machos y hembras entre el registro basal *ad libitum* y el TRF. En ambos casos, la actividad diurna se ve incrementada durante el TRF (factor sexo: p=0.0018, factor protocolo p<0.0001, modelo de efectos mixtos REML). **(C)** Porcentaje de actividad en la zona del FAA. Tanto machos como hembras muestran mayores porcentajes de FAA durante el TRF respecto al *ad libitum* previo (factor sexo: p=0.0070, factor protocolo: p<0.0001, modelo de efectos mixtos REML). Los datos se muestran como la media ± SEM (N=23-25/grupo). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, post test de Sidak para comparaciones múltiples.

En conjunto, los patrones de actividad locomotora y la cuantificación de la actividad evidenciaron un incremento en la actividad diurna y la aparición del componente de actividad anticipatoria a la comida como consecuencia del protocolo de TRF tanto en machos como en hembras, corroborando la sincronización a la disponibilidad de comida durante el horario diurno. Asimismo, se observó que la aparición de la FAA se ve retrasada por varios días luego de iniciado el protocolo de TRF, y su amplitud es mucho menor en relación a la amplitud de la actividad locomotora que muestran los animales durante la noche del LD. Además, las hembras parecerían tener, en general, menor actividad diurna en rueda en comparación a los machos, lo que generó que la cantidad de actividad en el horario de FAA también sea comparativamente menor.

III.4.2.2 Consumo de comida y pesos en machos y hembras bajo el protocolo de TRF

Se analizó la ingesta diaria de alimento a lo largo de todo el protocolo experimental para ambos grupos de TRF tanto en machos como en hembras. Los perfiles de las curvas de consumo de comida se muestran en la **Figura III.4.8 A** y **B** para los grupos de TRF en machos y en hembras, respectivamente. En los mismos se puede observar que, durante la semana de transición, el consumo de comida disminuye drásticamente en TRFD y TRFN para ambos sexos. Sin embargo, la disminución parecería ser más pronunciada en los grupos de TRFD, tal como se evidenció en el primer experimento de este capítulo. Una observación interesante es que, a pesar de que los animales estabilizan la cantidad de comida diaria ingerida a lo largo de las semanas del TRF, en todos los casos se observa que el consumo de alimento es inferior al consumo previo bajo condiciones de alimentación *ad libitum*. Para corroborarlo, se cuantificó el consumo de comida durante el registro basal *ad libitum* y durante la tercera/cuarta semana del TRF (donde los animales presentan una mayor estabilidad en el consumo), y se lo comparó entre machos y hembras dentro de cada grupo experimental (**Figura III.4.8 C** y **D**). Los resultados mostraron que, para los grupos de TRFD, tanto el protocolo (*ad libitum* vs TRF) como el sexo (machos vs hembras) influyeron significativamente en el consumo de comida (factor Sexo: $p=0.0442$, factor Protocolo: $p<0.0001$, Interacción: $p=0.3129$, ANOVA a dos vías de medidas repetidas). En particular, tanto en machos como en hembras se observó una disminución significativa del consumo de comida durante el TRF en comparación con el *ad libitum* (*Ad libitum* vs TRF: $p<0.0001$ para Machos y

Figura III.4.8. Consumo de comida a lo largo del protocolo experimental de TRF en machos y hembras. Se muestran los perfiles de consumo de comida bajo condiciones basales de alimentación *ad libitum* y a lo largo de las semanas en el protocolo de TRF para los grupos alimentados por 4 horas en el día (TRFD) o la noche (TRFN) de ratones **(A)** macho y **(B)** hembra. **(C)** La comparación entre el consumo de comida en el *ad libitum* y en el TRF para los grupos de TRFD en machos y hembras, reveló un menor consumo durante el TRF (factor sexo: p=0.0442, factor protocolo: p<0.0001, ANOVA a dos vías de medidas repetidas). **(D)** Asimismo, en los ratones del grupo TRFN también se evidenció una disminución en el consumo de comida durante el TRF en comparación a las condiciones de *ad libitum* con independencia del sexo de los animales (factor sexo: p=0.3809, factor protocolo: p<0.0001, ANOVA a dos vías de medidas repetidas). Los datos se muestran como la media ± SEM (N=25/grupo/sexo). ***p<0.001, post test de Sidak para comparaciones múltiples.

Hembras, post test de Sidak). A pesar de que el modelo estadístico indica una influencia del sexo en la variabilidad de los datos, y se observa una tendencia en las hembras hacia una menor ingesta de comida respecto a los machos cuando ambos están bajo alimentación *ad libitum*, esta diferencia no alcanzó la significancia estadística en el análisis *posthoc* (Machos vs Hembras: p=0.0519 para *Ad libitum* y p=0.5373 para TRF, post test de Sidak). Respecto al consumo de

comida en los grupos con alimentación restringida a la noche (TRFN, Figura III4.8 D) se observó una influencia significativa del protocolo, pero no del sexo (factor Sexo: p=0.3809, factor Protocolo: p<0.0001, Interacción: p=0.5081, ANOVA a dos vías de medidas repetidas), nuevamente, con un menor ingesta de alimento durante el TRF en comparación al *ad libitum* para machos y hembras (*Ad libitum* vs TRF: p<0.0001 para Machos y Hembras, post test de Sidak). En resumen, estos resultados indican que los ratones bajo un protocolo de TRF con 4 horas diarias de acceso a la comida exhiben una restricción calórica autoimpuesta, independientemente de su sexo y del momento de aplicación de dicha restricción temporal (ya sea TRF Día o TRF Noche).

Respecto a las medidas del peso corporal de los distintos grupos de ratones, los animales fueron pesados tres veces a lo largo del protocolo experimental. El primer pesaje se realizó bajo las condiciones basales de alimentación *ad libitum*, el segundo pesaje durante la primera semana de TRF (luego de la transición) y, el último, en la última semana del protocolo antes de la toma de muestra. Para todos los grupos los pesajes se realizaron 4 horas luego de finalizado el intervalo temporal de disponibilidad de comida. Los resultados mostraron que los machos TRFD y TRFN (**Figura III.4.9 A**) no presentan diferencias en el peso entre grupos, pero sí a lo largo del tiempo del protocolo (factor Grupo: p=0.2137, factor Tiempo: p<0.0001, Interacción: p=0.0230, ANOVA a dos vías de medidas repetidas). Sin embargo, la interacción entre los factores resultó significativa por lo que existe una influencia del tipo de protocolo de TRF utilizado en el aumento a lo largo del tiempo de los pesos de los animales. Asimismo, para ambos grupos, no se observó una disminución del peso corporal entre el *ad libitum* y la primera semana del TRF (TRFD: p=0.1019 para *Ad libitum* vs TRF semana 1; TRFN: p=0.0849 para *Ad libitum* vs TRF semana 1; post test de Tukey), lo que indicó que el periodo de transición fue efectivo al minimizar los efectos de acortar las horas y el momento de acceso a la comida. Aún más, en ambos grupos, los ratones macho aumentaron significativamente su peso hacia el final del protocolo de TRF (TRFD: p<0.0001 para *Ad libitum* vs TRF semana 7 y para TRF semana 1 vs TRF semana 7; TRFN: p<0.0001 para *Ad libitum* vs TRF semana 7 y para TRF semana 1 vs TRF semana 7; post test de Tukey). Por otro lado, los pesos de las hembras bajo los protocolos de TRF (**Figura III.4.9 B**) muestran diferencias significativas entre los grupos, el tiempo, y en la interacción entre ambos factores (factor Grupo: p=0.0002, factor Tiempo: p<0.0001, Interacción: p<0.0001, ANOVA a dos vías de

medidas repetidas). En este caso, la influencia del protocolo de TRF aplicado (TRFD o TRFN) tiene una gran influencia en la modulación de los aumentos de pesos observados en las hembras a lo largo del protocolo experimental. Una observación interesante es que las hembras presentan un aumento en el peso corporal en la primera semana del TRF respecto a las condiciones de *ad libitum* previas en ambos grupos experimentales (TRFD: p=0.0226 para *Ad libitum* vs TRF semana 1; TRFN: p<0.0001 para *Ad libitum* vs TRF semana 1; post test de Tukey). Esto sugirió que el período de transición al TRF no solo fue efectivo, sino que además, las hembras fueron capaces de recuperar rápidamente (e incluso aumentar) su peso corporal a pesar de la reducción calórica en la ingesta debido a la restricción temporal del alimento. Además, se observó un incremento en el peso de las hembras hacia el final del protocolo en el grupo TRFD, mientras que el peso de las hembras en el grupo TRFN se mantuvo estable (TRFD: p<0.0001 para *Ad libitum* vs TRF semana 7, y p<0.0001 para TRF semana 1 vs semana 7; TRFN: p<0.0001 para *Ad libitum* vs TRF semana 7, y p=0.7691 para TRF semana 1 vs semana 7; post test de Tukey).

Figura III.4.9. Peso corporal de los ratones macho y hembra a lo largo del protocolo de TRF. Los ratones macho y hembra asignados a los grupos de TRFD y TRFN fueron pesados en tres instancias durante el protocolo experimental: durante la semana de registro basal en alimentación *ad libitum,* durante la primera semana de TRF luego de la transición, y en la última semana del protocolo. **(A)** Los machos TRFD y TRFN no mostraron diferencias de peso entre grupos e incrementaron su peso hacia el final del protocolo (factor Grupo: p=0.2137, factor Tiempo: p<0.0001, ANOVA a dos vías de medidas repetidas). **(B)** Las hembras aumentaron su peso corporal desde la primera semana bajo el protocolo de TRF de manera diferencial según el grupo asignado (factor Grupo: p=0.0002, factor Tiempo: p<0.0001, ANOVA a dos vías de medidas repetidas). Los datos se visualizan en gráficos de violín, donde el ancho del violín indica la densidad de los datos, y la caja central muestra la mediana (línea rayada) y los cuartiles (líneas punteadas más pequeñas). (N=25/grupo/sexo). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, post test de Tukey para comparaciones múltiples.

En resumen, estos resultados revelaron que tanto los machos como las hembras, a pesar de consumir una menor cantidad de alimento durante el TRF, aumentaron su peso a lo largo de las semanas del protocolo experimental. Además, sugieren que las hembras estabilizarían su peso corporal más rápidamente, incluso durante la primera semana del TRF, en comparación con los machos.

III.4.2.3 Motivación por una recompensa de comida en machos y hembras bajo TRF

Luego de evidenciar la sincronización por comida bajo varias semanas en el protocolo de TRF, los grupos de TRFD y TRFN tanto de hembras como de machos fueron evaluados en el protocolo de tasa progresiva para medir su motivación por una recompensa. Basándonos en los resultados previos del primer experimento, se decidió incluir un tercer punto horario para evaluar la motivación. El objetivo principal fue determinar si los niveles elevados de motivación en el día y la noche observados en los ratones bajo TRFD permanecían constantes o si estábamos observando un patrón de 'doble pico'. Por consiguiente, la motivación por una recompensa de comida fue evaluada en todos los grupos a: ZT2-ZT4 (día temprano), ZT9-ZT11 (día tardío), y ZT14-ZT16 (noche).

Al comenzar con el análisis de los resultados de los grupos que tuvieron alimentación restringida durante la noche (TRFN, condición en la cual que ambos *zeitgebers* están alineados), se observó que los ratones macho mostraron un incremento significativo de la motivación por una recompensa durante el horario de evaluación de la noche en comparación a los del día (**Figura III.4.10**), encontrándose mayores valores para ZT14-16 tanto para la cantidad total de presiones de palanca (Figura III.4.10 A, p=0.0241, ANOVA de una vía; p=0.0383 para ZT2-4 vs ZT-14-16, post test de Tukey), el número de recompensas obtenidas (Figura III.4.10 B, p=0.0280, ANOVA de una vía; el post test no arrojó resultados significativos), y el *breaking point* (Figura III.4.10 C, p=0.0280, ANOVA de una vía; p=0.0459 para ZT2-4 vs ZT-14-16, post test de Tukey). Las curvas de persistencia a lo largo de sesión de PR no mostraron diferencias significativas entre horarios (Figura III.4.10 D, p=0.6886, test de Mantel-Cox) dado que casi la mitad de los ratones en cada horario de evaluación se mantienen activamente presionando la palanca hasta el final de la tarea comportamental, lo que genera que la caída de las diferentes curvas sea igual. Sin embargo, se

puede observar una leve tendencia a abandonar antes la tarea en el grupo evaluado en el día entre ZT2-4 (medianas de sobrevida: 107.9 min para ZT2-4, 118.1 min para ZT9-11, 118.0 min para ZT14-16).

Figura III.4.10. Motivación por una recompensa de comida en ratones macho bajo TRFN. Los ratones macho bajo un TRF con alimentación durante la noche fueron evaluados en el protocolo de PR para medir su motivación en tres horarios: ZT2-4, ZT9-11 y ZT14-16. Los animales mostraron mayores niveles motivacionales durante la noche, coincidente con la FAA, respecto a los horarios diurnos, tal como se observa para **(A)** el número de presiones de palanca (p=0.0241, ANOVA de una vía), **(B)** el número de recompensas obtenidas (p=0.0280, ANOVA de una vía), y **(C)** el *breaking point* (p=0.0280, ANOVA de una vía). **(D)** Las curvas del porcentaje de persistencia a lo largo de la sesión de PR no resultaron ser distintas entre horarios, pero se observa una leve tendencia a la mejoría durante la noche (p=0.6886, test de Mantel-Cox). Los datos se muestran como la media ± SEM (N=8 para ZT2-4 y ZT14-16, N=7 para ZT9-11). *p<0.05, post test de Tukey para comparaciones múltiples.

Por su lado, las hembras bajo TRFN mostraron resultados similares a los machos (**Figura III.4.11**). Nuevamente, los niveles motivacionales evaluados durante la noche fueron más elevados respecto a los del día, tal como se observa en la cantidad de presiones realizadas (Figura III.4.11 A, p=0.0165, ANOVA a una vía; p=0.0380 para ZT2-4 vs ZT14-16, post test de Tukey), las recompensas obtenidas (Figura III.4.11 B, p=0.0248, ANOVA a una vía; p=0.0261 para ZT2-4 vs ZT14-16, post test de Tukey), y el *breaking point* (Figura III.4.11 C, p=0.0335, ANOVA a una vía; p=0.0271 para ZT2-4 vs ZT14-16, post test de Tukey). En este caso, la persistencia de las ratonas a lo largo de la tarea comportamental fue significativamente mayor en la evaluación nocturna respecto a los horarios diurnos (Figura III.11 D, p<0.0001, test de Mantel-Cox; p<0.0001 para ZT2-4 vs ZT14-16, p=0.0004 para ZT9-11 vs ZT14-16, test de Mantel-Cox con corrección de Bonferroni). Asimismo, las medianas de sobrevida reflejan la mejoría en la persistencia del grupo evaluado en la noche (108.5 min para ZT2-4, 110.2 min para ZT9-11, y 119.7 para ZT14-16).

En conjunto, estos resultados indicaron que tanto los ratones macho como hembra cuando se encuentran restringidos a comer sólo durante la noche (TRFN) conservan las diferencias día-noche en la motivación por una recompensa, con mayores niveles motivacionales durante la noche (y coincidentes con el FAA), tal como evidenciamos en el primer experimento. Asimismo, es interesante notar que el segundo punto horario de evaluación en el día (ZT9-11, día tardío) presenta en ambos sexos valores motivacionales 'intermedios', lo que genera una tendencia lineal creciente en los niveles de motivación conforme transcurren las horas desde que los animales comieron por última vez. En otras palabras, los resultados sugieren que la motivación aumenta a medida que aumentan las horas de ayuno (*fasting*), siguiendo el ritmo diario normal de motivación de los ratones.

Figura III.4.11. Motivación por una recompensa de comida en ratones hembra bajo TRFN. Los ratones hembra bajo un TRF con alimentación durante la noche fueron evaluados en el protocolo de PR para medir su motivación en tres horarios: ZT2-4, ZT9-11 y ZT14-16. Los animales mostraron mayores niveles motivacionales durante la noche, coincidente con la FAA, respecto a los horarios diurnos, tal como se observa para **(A)** el número de presiones de palanca (p=0.0165, ANOVA de una vía), **(B)** el número de recompensas obtenidas (p=0.0248, ANOVA de una vía), **(C)** el *breaking point* (p=0.0335, ANOVA de una vía) y **(D)** las curvas de persistencia a lo largo de la sesión de PR (p<0.0001, test de Mantel-Cox). Los datos se muestran como la media ± SEM (N=8 para ZT2-4 y ZT14-16, N=7 para ZT9-11). *p<0.05, ***p<0.001, post test de Tukey para comparaciones múltiples y comparaciones de a pares para test de Mantel-Cox con corrección de Bonferroni (α corregido=0.017).

En contraposición, los resultados de los grupos de ratones bajo el protocolo de restricción alimentaria durante el día (TRFD) mostraron resultados diferenciales y dependientes del sexo de los animales. Por un lado, los ratones macho bajo TRFD no mostraron diferencias significativas entre los tres momentos de evaluación (**Figura III.4.12**). Esto quiere decir que los niveles

motivacionales fueron elevados en los puntos horarios del día y de la noche, tal como indican las presiones de palanca (Figura III.4.12 A, p=0.6540, ANOVA a una vía), las recompensas obtenidas (Figura III.4.12 B, p=0.5113, ANOVA a una vía), y el *breaking point* (Figura III.4.12 C, p=0.6098, ANOVA a una vía). Además, la persistencia de los ratones a lo largo de la tarea es igual en todos los horarios de testeo (Figura III.4.12 D, p=0.8125, test de Mantel-Cox), y todos los grupos se mantienen activos presionando la palanca hasta casi el final de la sesión de PR (medianas de

Figura III.4.12. Motivación por una recompensa de comida en ratones macho bajo TRFD. Los ratones macho bajo un TRF con alimentación durante el día fueron evaluados en el protocolo de PR para medir su motivación en tres horarios: ZT2-4, ZT9-11 y ZT14-16. Los animales no mostraron diferencias significativas entre horarios, y sus niveles motivacionales fueron elevados en los tres momentos de evaluación, tal como lo indica **(A)** el número de presiones de palanca (p=0.6540, ANOVA de una vía), **(B)** el número de recompensas obtenidas (p=0.5113, ANOVA de una vía), **(C)** el *breaking point* (p=0.6098, ANOVA de una vía) y **(D)** las curvas de persistencia a lo largo de la sesión de PR (p=0.8125, test de Mantel-Cox). Los datos se muestran como la media ± SEM (N=8 para ZT2-4 y ZT14-16, N=7 para ZT9-11).

sobrevida: 119.3 min para ZT2-4, 118.5 min para ZT9-11, y 118.7 min para ZT14-16). Estos resultados indicaron que los ratones macho en TRFD muestran altos niveles motivacionales a ZT2-4 (coincidentes con la FAA en el día) y a ZT14-16 (coincidentes con la noche del LD), pero mantienen también elevada su motivación a ZT9-11 (día) incluso luego de que han transcurrido muy pocas horas desde el momento en que tuvieron acceso a la comida (ZT4-ZT8). Es decir, en este caso, la motivación por la comida mantiene valores constantes y elevados a lo largo del día y de la noche.

Por otro lado, la motivación por una recompensa de las hembras en TRFD mostró niveles elevados durante el día temprano (cuando se expresa el FAA), luego una disminución en la motivación en el día tardío (luego del acceso diario a la comida) y, nuevamente, niveles elevados de motivación durante la noche (**Figura III.4.13**). En este sentido, las hembras evidenciaron un perfil motivacional de 'doble pico', tal como se puede observar en los índices motivacionales expresados como la cantidad de presiones realizadas (Figura III.4.14 A, p=0.0058, ANOVA de una vía; p=0.0106 para ZT2-4 vs ZT 9-11, p=0.0153 para ZT9-11 vs ZT14-16, post test de Tukey), las recompensas obtenidas (Figura III.4.14 B, p=0.0013, ANOVA de una vía; p=0.0034 para ZT2-4 vs ZT 9-11, p=0.0027 para ZT9-11 vs ZT14-16, post test de Tukey), y el *breaking point* (Figura III.4.13 C, p=0.0049, ANOVA de una vía; p=0.0090 para ZT2-4 vs ZT 9-11, p=0.0137 para ZT9-11 vs ZT14-16, post test de Tukey). Además, las curvas de persistencia en la tarea también arrojaron resultados significativamente diferentes (Figura III.4.13 D, p=0.0312, test de Mantel-Cox). Para las ratonas evaluadas a ZT9-11, se observó que el 50 % de las mismas dejaba de responder (presionar la palanca) y abandonaba la tarea antes de que transcurra la mitad del tiempo en la sesión de PR (medianas de sobrevida: 117.3 min para ZT2-4, 51.5 min para ZT11-9, y 119.5 para ZT14-16). En conjunto, estos resultados evidenciaron que las hembras sincronizadas a la comida durante el día presentaron un patrón de respuesta motivacional dual o de 'doble pico'. Un pico en la motivación se observa durante las horas previas a la llegada de la comida, coincidiendo con la actividad anticipatoria, mientras que el otro pico ocurre durante la noche temprana, en paralelo con el estado de vigilia durante la fase nocturna del ciclo de luz-oscuridad en una especie nocturna.

Figura III.4.14. Motivación por una recompensa de comida en ratones hembra bajo TRFD. Los ratones hembra bajo un TRF con alimentación durante el día fueron evaluados en el protocolo de PR para medir su motivación en tres horarios: ZT2-4, ZT9-11 y ZT14-16. Los animales evidenciaron diferencias significativas entre horarios, con mayores niveles motivacionales a ZT2-4 (día, FAA) y a ZT14-16 (noche), tal como lo indica **(A)** el número de presiones de palanca (p=0.0058, ANOVA de una vía), **(B)** el número de recompensas obtenidas (p=0.0013, ANOVA de una vía), **(C)** el *breaking point* (p=0.0049, ANOVA de una vía) y **(D)** las curvas de persistencia a lo largo de la sesión de PR (p=0.0312, test de Mantel-Cox). Los datos se muestran como la media ± SEM (N=8/horario). *p<0.05, **p<0.01, post test de Tukey para comparaciones múltiples y comparaciones de a pares para test de Mantel-Cox con corrección de Bonferroni (α corregido=0.017).

Para intentar entender las diferencias en la respuesta motivacional entre sexos en el TRFD, consideramos si la mayor restricción calórica (autoimpuesta), particularmente evidente en los machos, podría influir en los resultados. Nos centramos específicamente en el horario de evaluación ZT9-11, donde se observaron las respuestas diferenciales entre machos y hembras.

Podría ser posible que los machos no estuviesen completamente saciados luego del intervalo diario de acceso a la comida (ZT4-ZT8) ya que, como vimos, consumen menos comida en el TRF comparación con las condiciones de *ad libitum*. Por lo tanto, durante la evaluación comportamental en ZT9-11, los ratones macho aún podrían tener 'hambre' y estar más dispuestos a esforzarse por obtener las recompensas de comida, lo cual se reflejaría en los mayores niveles motivacionales observados. Para verificar esta hipótesis, realizamos un análisis de correlación entre la cantidad de comida ingerida durante el periodo previo de acceso a la comida (ZT4-ZT8) y el desempeño posterior en la tarea de motivación (en ZT9-11), tanto para machos como hembras. Como indicador del desempeño en la tarea utilizamos el número de presiones de palanca realizadas durante la sesión de motivación. Los resultados revelaron que, independientemente del sexo, no existe una relación significativa entre la cantidad de comida consumida y el número de presiones de palanca realizadas durante la prueba de motivación (**Figura III.4.15**, para machos: r=-0.0847, p=0.8732; para hembras: r=0.0433, p=0.9264; test de correlación de Pearson). Esto quiere decir, que la mayor restricción calórica (como consecuencia de la restricción temporal de comida) no explica los altos niveles motivacionales observados a ZT9-11 en los machos TRFD.

Figura III.4.15. Correlación entre el consumo de comida previo y el desempeño posterior en la tarea de motivación a ZT9-11 en machos y hembras. En el eje *Y* se muestran el consumo de comida (durante el intervalo de ZT4-ZT8) de cada uno de los ratones evaluados en la prueba de motivación. En el eje *X* se muestra el número máximo de presiones de palanca realizados por cada ratón en la sesión de motivación evaluada a ZT9-11 (sesión inmediatamente siguiente a la finalización del periodo de acceso a la comida). Cada punto en el gráfico representa un ratón **(A)** macho o **(B)** hembra bajo el protocolo de TRFD. Para ambos casos, no se encontraron diferencias significativas entre las variables (machos: r=-0.0847, p=0.8732; hembras: r=0.0433, p=0.9264; test de correlación de Pearson). N=7 para machos, N=8 para hembras.

III.5 Discusión

En el presente capítulo, hemos intentado dilucidar cómo la sincronización no-fótica por comida influye sobre los patrones de expresión diarios de la motivación por una recompensa en ratones. Asimismo, y dadas las evidencias aportadas en los capítulos previos sobre la modulación de la sincronización fótica en la motivación, optamos por someter al sistema a una 'paradoja de dos *zeitgebers* desacoplados' para intentar entender la contribución que cada uno de ellos tiene en la modulación del comportamiento motivacional por recompensas de comida. Para ello, utilizamos un protocolo de alimentación restringida temporalmente (TRF) para inducir la sincronización por comida en ratones expuestos a un ciclo normal de luz/oscuridad (es decir, sincronizados, a su vez, a la luz). Para generar el desacople o desalineamiento entre los *zeitgebers*, se realizó el TRF durante la porción diurna del ciclo LD, es decir, la fase de reposo para los animales nocturnos. Asimismo, se llevó a cabo el TRF durante la noche del LD, para modelar la situación opuesta, cuando ambos sincronizadores están acoplados o alineados. Dichas condiciones nos permitirían acercarnos, a su vez, al entendimiento de la relevancia del componente homeostático y metabólico en el comportamiento de la motivación por una recompensa de comida.

Dadas las evidencias previas de la relevancia del sistema dopaminérgico y de recompensa en la expresión de la actividad anticipatoria como salida comportamental del oscilador sincronizado por comida (FEO), preveíamos que cuando la comida estuviera disponible solo durante el día, los ratones exhibirían un aumento en los niveles motivacionales coincidiendo con el momento de ocurrencia de la FAA. En este sentido, nuestra primera pregunta a responder era si el comportamiento de motivación por una recompensa es parte y/o contribuye de manera significativa en la actividad anticipatoria a la comida. Nuestra segunda pregunta a responder, era si el ritmo motivacional se veía afectado o modificado cuando la comida actúa como un agente sincronizador para el sistema circadiano. Respecto a esto, nuestra hipótesis inicial se centraba en la suposición de que el ritmo diario de motivación estaría ampliamente influenciado por la sincronización por comida. Esperábamos observar que los ratones adaptasen su ritmo motivacional a la disponibilidad de alimento, con un pico en las horas diurnas y menores niveles durante las horas nocturnas. En este contexto, hipotetizamos que la relevancia de la disponibilidad al alimento sería un estímulo mucho más potente en la modulación circadiana del

sistema de recompensa y la motivación por comida que la sincronización al ciclo de luz-oscuridad ambiental.

III.5.1 La motivación por una recompensa de comida forma parte de la FAA y su variación diaria se ve afectada bajo un protocolo de TRF durante el día

Estas hipótesis iniciales fueron puestas a prueba en el primer experimento de este capítulo. Asimismo, dado que el protocolo de TRF no se había puesto a punto antes en nuestro laboratorio, debimos aplicar distintas condiciones a modo de controlar la efectividad del protocolo experimental. Esto se llevó a cabo incluyendo un grupo control *ad libitum* (como sensores de otros sincronizadores no-fóticos) y las condiciones constantes (*fasting)* para evaluar la efectividad de la sincronización por comida. Aquí, cabe hacer una breve mención sobre el grupo *ad libitum*. Este grupo podría considerarse un buen control para la condición de alimentación restringida, sin embargo, para la evaluación de la motivación en la prueba comportamental aquí utilizada no lo es. Los animales alimentados *ad libitum* no presentan una restricción calórica o temporal que los motive a trabajar por obtener una recompensa de comida regular (no palatable), en consecuencia, no nos aportan información relevante como grupo control para la motivación. En este sentido, el grupo de TRFN jugaría un rol de 'mejor control' para la situación experimental planteada. Dicho esto, los resultados obtenidos del experimento mostraron que la sincronización por comida fue efectiva, con los ratones del grupo TRFD mostrando una clara actividad anticipatoria a la comida durante las primeras semanas de TRF que se mantiene cuando la comida está ausente (**Figuras III.4.1** y **III.4.2**). Asimismo, los animales lograron adaptarse rápidamente a consumir el alimento durante el día, e incluso, aumentaron de peso a lo largo del protocolo (**Figura III.4.3**) al igual que el grupo alimentado solo durante la noche (TRFN). Una observación interesante es la restricción calórica autoimpuesta, particularmente observada aquí en el grupo de TRFD, pero esta discusión será dada más adelante en conjunto con los resultados del segundo experimento. Respecto a los resultados de la evaluación de la motivación por una recompensa (**Figura III.4.5**), se puede decir que nuestras hipótesis iniciales eran parcialmente ciertas. Por un lado, los altos niveles motivacionales durante el punto horario del día (ZT2-4) coincidentes con la FAA, corroboran que se requiere de la activación del sistema de recompensa

y de la activación comportamental (para fomentar la búsqueda de recompensas de comida) en el mecanismo anticipatorio que ocurre por la sincronización por comida. Por otro lado, los ratones presentaron, a su vez, altos niveles motivacionales durante las horas nocturnas (incluso "sabiendo" que en ese momento no recibirían comida, es decir, a pesar de que el sistema se encuentra sincronizado a la comida durante el día), rechazando nuestra hipótesis inicial de que el ritmo motivacional se 'correría' siguiendo a la disponibilidad de comida. Asimismo, el grupo TRFN mostró la esperada variación día-noche en la motivación por una recompensa, corroborando nuestra asunción de que en esta condición ambos sincronizadores se encuentran alineados. Ahora bien, el resultado de que la motivación se encuentra alta tanto en el día como en la noche en animales sincronizados a la alimentación diurna, nos abrió dos nuevos interrogantes: ¿Es posible que el sistema de recompensa esté sincronizado al mismo tiempo tanto a la luz como a la comida? ¿Cuáles son los mecanismos por los cuales la luz y la comida modulan al sistema de recompensa? Las respuestas a estas preguntas no son nada fáciles de responder. Sin embargo, en la segunda parte de este capítulo intentamos al menos dar los primeros pasos en ese largo camino.

III.5.2 El desacople entre la sincronización por luz y por comida desencadena respuestas motivacionales específicas según el sexo en ratones bajo TRF

En el segundo experimento de TRF se incluyeron hembras en el análisis con el objetivo de caracterizar más ampliamente nuestro modelo y evidenciar si existían respuestas diferenciales dependientes del sexo. Asimismo, se utilizó un sistema de *feeders* que nos permitió independizarnos de la alimentación manual al manejar un tamaño muestral grande. Sin embargo, esta implementación nos permitió evidenciar que, en ausencia de la administración manual de la comida y utilizando *feeders* para administrar el alimento, la aparición y la robustez de la FAA se ve modificada (su aparición demora más tiempo y su duración e intensidad parecería ser menor). Dado que no podemos establecer comparaciones estadísticas entre experimentos (porque fueron realizados bajo distintas condiciones y lugares) y que no hemos encontrados otros estudios en donde se realicen protocolos de TRF utilizando *feeders* automatizados, la diferencia entre los distintos tipos de administración del alimento deberá ser evaluada en experimentos futuros.

Asimismo, no podemos descartar el efecto diferencial que podría tener en la expresión de la FAA el registro de actividad en rueda en comparación al registro de actividad total con sensores infrarrojos. Adicionalmente, otra posible explicación para esta diferencia entre protocolos de administración del alimento podría deberse a que el *feeder* tiene una cinética diferente al suministrar la comida en comparación a la manual. Los *feeders* utilizados estaban programados con un tiempo de demora de 10 minutos de entrega entre *pellets* sucesivos, con el fin de evitar que los animales retiren la comida compulsivamente y la acumulen en sus jaulas [Acosta-Rodríguez et al., 2017]. Este tiempo de espera podría estar afectando la magnitud de la expresión de la FAA y, además, generando que los animales muestren una alta actividad en rueda durante el periodo de acceso a la comida (los animales se pondrían a correr en la rueda durante el tiempo de espera entre *pellets*). Es por ello que, en experimentos futuros, se podría evaluar la disminución de los tiempos de administración entre *pellets* con los *feeders* (por ejemplo, 2-3 minutos) para incrementar la similitud entre ambos protocolos y emular con mayor fidelidad la administración manual de comida, donde la totalidad del alimento está disponible inmediatamente. En congruencia con este argumento, un estudio muy reciente demostró la aparición rápida y robusta de la actividad anticipatoria en ratones con acceso restringido a la comida, utilizando un dispositivo dentro de la jaula que libera automáticamente un *pellet* cuando el ratón toca con su nariz un sensor (un comportamiento denominado *"nose poking"*) [Ehichioya et al., 2024]. En este caso, solo cuando el ratón toca el sensor con la nariz dentro del intervalo de tiempo de acceso a la comida establecido, es cuando recibe el *pellet* de comida. Así, el dispositivo no solo permite llevar a cabo un protocolo de TRF sin intervención humana, sino que además, al tener que realizar el ratón una 'acción' para obtener la comida, también se estarían evaluado los comportamientos dependientes del sistema de recompensa. Más interesante aún, es que cuando los autores restringen el acceso a los *pellets* sólo durante el día, los ratones tocan intensamente el sensor con su nariz en las horas precedentes a la llegada de la comida (FAA) y, al mismo tiempo, los animales realizan toques con la nariz en el sensor durante la noche, a pesar de que la comida no será entregada. Estos resultados no solo están en concordancia, sino que además corroboran los resultados de motivación obtenidos en la presente tesis. Ambas evidencias apuntan a que, a pesar de la sincronización diurna a la disponibilidad de comida, los animales mantienen sus

respuestas motivadas durante la noche del ciclo LD de acuerdo a su naturaleza circadiana nocturna.

Continuando con los experimentos de este capítulo, se han observado varias diferencias entre machos y hembras bajo los protocolos de TRF. En principio, las hembras muestran una menor actividad diurna y en el FAA en comparación a los machos (**Figura III.4.7**). La amplitud del FAA en hembras es comparativamente menor. Sin embargo, la FAA es evidenciable y significativamente diferente a los valores encontrados en el mismo rango horario bajo condiciones basales de *ad libitum*, lo que indicó que la sincronización a la comida en las hembras fue efectiva. Adicionalmente, en ambos sexos y para ambos protocolos de TRF, se observó una reducción en la ingesta total de alimento durante el TRF en comparación al *ad libitum* (**Figura III.4.8**). Nuevamente, los ratones bajo restricción alimentaria temporal muestran una restricción calórica autoimpuesta. Dicho efecto se ha reportado previamente en un protocolo de restricción temporal [Acosta-Rodríguez et al., 2017]. Podría pensarse que este resultado es un efecto de las pocas horas de acceso a la comida, y que los animales no pueden consumir su ingesta diaria total en una ventana limitada de 4 horas. Asimismo, este estado de déficit energético parecería afectar aún más a los machos, cuya diferencia entre el consumo de comida *ad libitum* y durante el TRF tendería a ser mayor. Sin embargo, el resultado más llamativo entre machos y hembras es la respuesta motivacional en los protocolos de TRF. Ambos sexos bajo el protocolo de TRFN presentan un pico máximo durante la noche en la motivación por una recompensa, que es coincidente con la fase de mayor actividad de los ratones y con la disponibilidad de la comida (**Figuras III.4.10 y III.4.11**). Bajo esta condición ambos *zeitgebers* están alineados y, en consecuencia, se espera que el oscilador en los NSQ y el FEO también lo estén. Por consiguiente, la observación de la variación diaria en el comportamiento de motivación es congruente. Por otro lado, cuando los *zeitgebers* están desalineados (protocolo de TRFD) se evidenciaron respuestas diferenciales en la motivación que dependen del sexo de los animales (**Figuras III.4.12 y III.4.13**). Se observaron altos niveles motivacionales en los tres puntos horarios de evaluación en los machos, mientras que en las hembras surge una respuesta motivacional con un patrón de 'doble pico', con niveles más altos tanto durante el día (en anticipación a la comida) como durante la noche (su fase de actividad).

Estos resultados mixtos en la respuesta motivacional, abren diferentes puntos de discusión. En primer lugar, destacan la importancia de incluir hembras en los estudios científicos para obtener una comprensión completa de lo que está ocurriendo en el sistema bajo estudio. La mayoría de los argumentos en contra de incluir hembras en las investigaciones se basan en la incapacidad de controlar la influencia de los ciclos hormonales sobre las variables de estudio. Sin embargo, en los últimos años han surgido nuevas investigaciones que demuestran que las hembras tienen una respuesta comportamental más estable en comparación a los machos, con muy poca influencia de las fluctuaciones hormonales del ciclo estral [Levy et al., 2023]. De hecho, los resultados motivacionales observados en las hembras en nuestro estudio (el doble pico en motivación) fueron los esperados cuando planteamos las hipótesis iniciales. En nuestro caso, no se controló la fase del ciclo estral y las fluctuaciones hormonales en las hembras a lo largo del protocolo. En primer lugar, porque no consideramos evaluar específicamente dicha influencia en nuestro diseño experimental. En segundo lugar, porque las técnicas para realizar los controles de la fase del ciclo se realizan de forma diaria, son invasivas y estresantes para los animales, y nuestro objetivo fue reducir al mínimo las intervenciones en los ratones para minimizar la influencia de los sincronizadores no-fóticos. A pesar de no controlar la variabilidad hormonal entre individuos, en general, las hembras mostraron una evidente sincronización a la comida, un buen aprendizaje en el entrenamiento de la tarea conductual, y resultados en motivación contundentes.

Por otro lado, existen amplias evidencias de diferencias entre machos y hembras en cuanto a la expresión génica y el metabolismo [Knoedler et al., 2022; de Souza et al., 2022] que podrían ayudarnos a entender las diferencias observadas en la motivación bajo condiciones de sincronización diurna por comida. En principio, hipotetizamos inicialmente que la restricción calórica (como causa del acotado horario de disponibilidad de comida) en machos podría haber sido mayor, y por ello, presentaron altos niveles de motivación en el punto horario de evaluación inmediatamente posterior (ZT9-11) a la finalización del acceso a la comida. Sin embargo, el análisis de la correlación entre la cantidad de comida consumida y el desempeño en la tarea motivacional no arrojó resultados significativos en machos y hembras (**Figura III.4.14**). Por lo tanto, la restricción calórica y el mayor 'hambre' *per se* (es decir, el componente homeostático incrementando los niveles motivacionales) no explican los resultados. Sin embargo, sí podríamos

hipotetizar que la restricción calórica y/o el desacople del ritmo de alimentación del ritmo de actividad-reposo, podrían estar generando un estado interno de estrés (metabólico, hormonal, fisiológico, etc.) que afecta la respuesta motivacional en los machos, generando que su desempeño en la tarea sea elevado en todos los puntos horarios. Consecuentemente, podríamos pensar que a causa de este estrés los machos presentan afecciones en otros comportamientos relacionados con el estado de ánimo y la regulación emocional como, por ejemplo, ansiedad, que estén influenciando a la motivación por una recompensa. Por otro lado, los diferentes perfiles hormonales y metabólicos entre hembras y machos, afectados de manera diferencial por el protocolo de TRF y la sincronización por comida, podrían estar actuando como moduladores del comportamiento recompensado generando las distintas respuestas observadas. Este último interrogante, es unas de las hipótesis que planificamos responder a futuro mediante el análisis de la composición de las muestras de sangre periférica de los animales en TRFD y TRFN que hemos tomado al finalizar el protocolo experimental. El objetivo es analizar el perfil de expresión de varios metabolitos y hormonas (GLP-1, ghrelina, hormonas esteroides y sexuales, etc.) y correlacionarlo con el tipo de protocolo y el sexo de los animales, para intentar explicar los resultados conductuales. Respecto a los experimentos y el análisis de las muestras de diferentes tejidos que hemos tomado, que también nos ayudarían a entender qué está ocurriendo en nuestro sistema, se hablará con más detalle en el siguiente párrafo.

En este experimento, como se mencionó previamente, además de las evaluaciones conductuales se tomaron varias muestras de los grupos experimentales para llevar a cabo un análisis de la expresión génica en diferentes regiones cerebrales y evaluar el estado metabólico y hormonal en la periferia del organismo. En particular, se tomó muestra de las regiones cerebrales de la corteza prefrontal, el núcleo accumbens (NAc), la zona hipotalámica incluyendo a los NSQ, y el área tegmental ventral (VTA); así como también, se recolectaron muestras de sangre periférica, de tejido del hígado y de la microbiota intestinal. El diseño del muestreo consistió en recolectar los tejidos cada tres horas durante 24 horas para los grupos de TRFN y TRFD (8 puntos horarios/grupo y un N=3/punto horario). Asimismo, durante la estadía de investigación se llevaron a cabo las técnicas de secuenciamiento masivo de RNA (*Bulk RNA-Sequencing*) y de secuenciamiento de RNA en núcleos individuales (*Single-Nuclei RNA-Sequencing* o snRNA-seq) en

las muestras provenientes del tejido cerebral del núcleo accumbens. Muy brevemente, la técnica de *bulk RNA-seq* permite extraer el contenido total de RNAs en un tejido para luego ser secuenciado y obtener datos del perfil de expresión transcripcional promedio de todas las células dentro de este tejido. Por su lado, en la técnica de snRNA-seq primero se aíslan y separan los núcleos de cada una de las células del tejido luego, el contenido de RNA en los núcleos es codificado con un 'código de barras' único para cada núcleo (proceso denominado como *single-nucleus barcoded mRNA*), y por último se extrae el contenido de RNA de los distintos núcleos para generar una librería de cDNAs para su secuenciación. Esta técnica, a diferencia de la anterior, permite conocer la expresión del transcriptoma único de cada célula que integra el tejido, y observar la variabilidad en los patrones de expresión entre células (que mediante la técnica de *bulk* está 'enmascarada' en el promedio). En nuestro experimento, realizamos el análisis de *bulk RNA-seq* en todas las muestras del NAc, es decir, para los cuatro grupos experimentales y a lo largo de los distintos horarios de toma de muestra. El objetivo fue no solo evidenciar distintos patrones de expresión génica en el NAc entre protocolos de TRF y entre sexos sino, además, poder observar cambios en los patrones rítmicos de expresión de genes reloj, dopaminérgicos, asociado al metabolismo, entre otros, a causa de las distintas condiciones experimentales (como posibles cambios de fase en genes reloj y genes controlados por el reloj, vías metabólicas o asociadas al estrés sobre- o sub-reguladas, etc.). Adicionalmente, la técnica de snRNA-seq se llevó a cabo en el tejido del NAc recolectado en los horarios relevantes para los resultados de los experimentos de motivación, es decir, en ZT2-4 y ZT14-16. El objetivo, en este caso, es poder evidenciar si hay diferencias en la expresión génica en los distintos tipos celulares del NAc entre puntos horarios dentro de un mismo protocolo de TRF y, a su vez, identificar cómo la sincronización por comida durante la noche o el día podría modular los perfiles transcriptómicos celulares en el NAc. El análisis de los resultados de la secuenciación obtenida de estas técnicas está siendo llevado a cabo actualmente en colaboración con los laboratorios del Dr. Takahashi y la Dra. Konopka de la UTSW Medical Center. Lamentablemente, los resultados del análisis no pudieron estar disponibles para ser presentados en esta tesis, pero esperamos poder hacerlo en una – no muy lejana – futura publicación científica. Finalmente, cabe mencionar que estos resultados, en conjunto con el análisis de las otras muestras recolectadas en este experimento, nos permitirán

tener un panorama más amplio para poder explicar qué ocurre a nivel molecular en el sistema de recompensa y en el estado metabólico global del organismo cuando la comida actúa como un agente sincronizador del sistema circadiano, modulando la respuesta motivacional de los animales de manera sexo-específica.

III.5.3 Conclusiones del Capítulo III

En el presente capítulo hemos estudiado cómo la sincronización no-fótica por comida influye sobre los patrones de expresión diarios de la motivación por una recompensa en ratones. En particular, hemos determinado que el comportamiento de motivación por una recompensa forma parte y/o se expresa en conjunto con la actividad anticipatoria a la comida en ratones bajo un protocolo de restricción alimentaria temporal. Asimismo, hemos determinado que cuando la ingesta de alimentos de los ratones se restringe a las horas diurnas del ciclo de luz/oscuridad, la variación diaria en la motivación se ve alterada de manera diferencial entre machos y hembras. En particular, los machos presentan niveles incrementados de motivación tanto durante el día como la noche, y las hembras muestran una variación diaria motivacional con un doble pico coincidente con la actividad anticipatoria diurna y con la actividad nocturna. El análisis de la transcriptómica y de los perfiles metabólicos y hormonales nos permitirán a futuro conocer la influencia de la sincronización lumínica y alimentaria sobre el sistema de recompensa y la motivación.

Los resultados presentados aquí no sólo tienen relevancia en el entendimiento de cómo los múltiples agentes sincronizadores ambientales afectan y modulan los ritmos circadianos del organismo, sino que además, aportan conocimiento al estudio de los esquemas de alimentación restringida con aplicabilidad en humanos. En los últimos años, la restricción calórica y temporal de la ingesta, el ayuno intermitente y otros esquemas de alimentación restringida han demostrado beneficios significativos sobre el estado metabólico del organismo [Wilkinson et al., 2020; Hatori et al., 2012], mejoras en enfermedades neurodegenerativas [Whittaker et al., 2023], aumento del desempeño cognitivo [Hernandez et al., 2022], y retrasos en las variables del envejecimiento aumentando la longevidad [Longo, et al.,2016; Acosta-Rodríguez et al., 2022], tanto en modelos animales como en humanos. Por lo tanto, profundizar en el estudio de cómo

los esquemas de alimentación restringida impactan en la fisiología, las conductas, y en el sistema de recompensa para regular las conductas motivadas y las emociones resulta de particular relevancia para la salud humana y en el diseño de tratamientos de enfermedades metabólicas, desórdenes alimenticios, enfermedades psiquiátricas y adicciones.

III.6 Referencias Bibliográficas del Capítulo III

Acosta-Rodríguez, V. A., de Groot, M. H., Rijo-Ferreira, F., Green, C. B., & Takahashi, J. S. (2017). Mice under caloric restriction self-impose a temporal restriction of food intake as revealed by an automated feeder system. *Cell metabolism*, *26*(1), 267-277.

Acosta-Rodríguez, V., Rijo-Ferreira, F., Izumo, M., Xu, P., Wight-Carter, M., Green, C. B., & Takahashi, J. S. (2022). Circadian alignment of early onset caloric restriction promotes longevity in male C57BL/6J mice. *Science*, *376*(6598), 1192-1202.

Angeles-Castellanos M, Mendoza J, Escobar C (2007) Restricted feeding schedules phase shift daily rhythms of c-Fos and protein Per1 immunoreactivity in corticolimbic regions in rats. Neuroscience 144:344–355.

Damiola F., Le Minh N., Preitner N., Kornmann B., Fleury-Olela F. & Schibler U. (2000): Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. Genes Dev 14:2950 –2961

de Souza, G. O., Wasinski, F., & Donato Jr, J. (2022). Characterization of the metabolic differences between male and female C57BL/6 mice. *Life sciences*, *301*, 120636.

Ehichioya, D. E., Masud, I., Taufique, S. T., Jeong, B., Farah, S., Eischeid, A., ... & Yamazaki, S. (2024). Protocol to study circadian food-anticipatory poking in mice using the feeding experimentation device version 3. *STAR protocols*, *5*(2), 102935.

Feillet C.A., Ripperger J.A., Magnone M.C., et al. (2006). Lack of food anticipation in Per2 mutant mice. Curr Biol. 16(20):2016-22.

Flôres, D. E., Bettilyon, C. N., & Yamazaki, S. (2016). Period-independent novel circadian oscillators revealed by timed exercise and palatable meals. *Scientific reports*, *6*(1), 21945.

Gallardo, C. M., Darvas, M., Oviatt, M., Chang, C. H., Michalik, M., Huddy, T. F., ... & Steele, A. D. (2014). Dopamine receptor 1 neurons in the dorsal striatum regulate food anticipatory circadian activity rhythms in mice. *Elife*, *3*, e03781.

Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, DiTacchio L, Bushong EA, Gill S, Leblanc M, Chaix A, Joens M, Fitzpatrick JA, Ellisman MH. Time-restricted feeding without reducing caloric intake prevents metabolic diseases in mice fed a high-fat diet. Cell metabolism. 2012 Jun 6;15(6):848-60.

Hernandez AR, Watson C, Federico QP, Fletcher R, Brotgandel A, Buford TW, Carter CS, Burke SN. Twelve months of time-restricted feeding improves cognition and alters microbiome composition independent of macronutrient composition. Nutrients. 2022 Sep 24;14(19):3977.

Keith, D. R., Hart, C. L., Robotham, M., Tariq, M., Le Sauter, J., & Silver, R. (2013). Time of day influences the voluntary intake and behavioral response to methamphetamine and food reward. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *110*, 117-126.

Knoedler, J. R., Inoue, S., Bayless, D. W., Yang, T., Tantry, A., Davis, C. H., ... & Shah, N. M. (2022). A functional cellular framework for sex and estrous cycle-dependent gene expression and behavior. *Cell*, *185*(4), 654-671.

Landry, G.J. & Mistlberger, R.E. (2007) Food-entrainment: methodological issues. J. Biol. Rhythms, 22, 484–487.

Levy, D. R., Hunter, N., Lin, S., Robinson, E. M., Gillis, W., Conlin, E. B., ... & Datta, S. R. (2023). Mouse spontaneous behavior reflects individual variation rather than estrous state. *Current Biology*, *33*(7), 1358-1364.

Liu, Y. Y., Liu, T. Y., Qu, W. M., Hong, Z. Y., Urade, Y., & Huang, Z. L. (2012). Dopamine is involved in food-anticipatory activity in mice. *Journal of Biological Rhythms*, *27*(5), 398-409.

Longo VD, Panda S. Fasting, circadian rhythms, and time-restricted feeding in healthy lifespan. Cell metabolism. 2016 Jun 14;23(6):1048-59.

Michalik, M., Steele, A. D., & Mistlberger, R. E. (2015). A sex difference in circadian food-anticipatory rhythms in mice: Interaction with dopamine D1 receptor knockout. *Behavioral Neuroscience*, *129*(3), 351.

Mieda M., Williams S., Richardson J., Tanaka K. & Yanagisawa M. (2006). The dorsomedial hypothalamic nucleus as a putative food-entrainable circadian pacemaker. PNAS 103: 12150-12155.

Mistlberger, R. E. (2009). Food-anticipatory circadian rhythms: concepts and methods. *European Journal of Neuroscience*, *30*(9), 1718-1729.

Pendergast, J. S., & Yamazaki, S. (2018). The mysterious food-entrainable oscillator: insights from mutant and engineered mouse models. *Journal of biological rhythms*, *33*(5), 458-474.

Pitts, S., Perone, E., & Silver, R. (2003). Food-entrained circadian rhythms are sustained in arrhythmic Clk/Clk mutant mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *285*(1), R57-R67.

Richter CP (1922) A behavioristic study of the activity of the rat. Comparative Psychology Monographs 1:1–54.

Stephan, F. K. (2002). The “other” circadian system: food as a Zeitgeber. *Journal of biological rhythms*, *17*(4), 284-292.

Waddington Lamont E, Harbour VL, Barry-Shaw J, Renteria Diaz L, Robinson B, Stewart J, et al. (2007): Restricted access to food, but not sucrose, saccharine, or salt, synchronizes the expression of Period2 protein in the limbic forebrain. Neuroscience 144:402– 411.

Wakamatsu H, Yoshinobu Y, Aida R, Moriya T, Akiyama M, Shibata S (2001): Restricted-feeding-induced anticipatory activity rhythm is associated with a phase-shift of the expression of mPer1 and mPer2 mRNA in the cerebral cortex and hippocampus but not in the suprachiasmatic nucleus of mice. Eur J Neurosci 13:1190 –1196.

Whittaker DS, Akhmetova L, Carlin D, Romero H, Welsh DK, Colwell CS, Desplats P. Circadian modulation by time-restricted feeding rescues brain pathology and improves memory in mouse models of Alzheimer’s disease. Cell Metabolism. 2023 Oct 3;35(10):1704-21.

Wilkinson MJ, Manoogian EN, Zadourian A, Lo H, Fakhouri S, Shoghi A, Wang X, Fleischer JG, Navlakha S, Panda S, Taub PR. Ten-hour time-restricted eating reduces weight, blood pressure, and atherogenic lipids in patients with metabolic syndrome. Cell metabolism. 2020 Jan 7;31(1):92-104.

Conclusiones finales

Los resultados presentados a lo largo de esta tesis permiten plantear un modelo simple y general para entender cómo el sistema circadiano modula el comportamiento de motivación por una recompensa de comida en ratones. En primer lugar, cuando los *zeitgebers* luz y comida están alineados en la fase adecuada, los ritmos circadianos del ratón también se encuentran en fase con estos sincronizadores. En esta situación, la fisiología y la conducta del animal estarán perfectamente coordinadas por el sistema circadiano, en línea con el entorno ecológico y el comportamiento natural de la especie. Bajo estas condiciones, la motivación por una recompensa de comida en los ratones se expresa mostrando un ritmo diario, con mayores niveles durante la noche en coincidencia con la mayor actividad y el momento de alimentación en una especie nocturna (resultados del Capítulo I y III). Adicionalmente, la motivación por obtener recompensas con un alto valor hedónico también muestra el mismo patrón diario, aun cuando los animales están saciados y sus requerimientos energéticos están cubiertos (Capítulo I). Estas observaciones, sumadas a las evidencias previas de la expresión rítmica en diversos componentes del sistema dopaminérgico y las oscilaciones de genes reloj en regiones cerebrales del sistema de recompensa, sugieren que la motivación por recompensas comestibles – incluso con distinta valencia intrínseca y para satisfacer necesidades diferentes en el organismo – podrían estar bajo regulación del sistema circadiano. Para corroborarlo, se debería evidenciar la naturaleza endógena del ritmo en ausencia de sincronizadores. Cuando el principal *zeitgeber* del reloj central en los NSQ es removido, y los ratones se encuentran bajo condiciones de oscuridad constante, la motivación continúa expresándose de forma variable, con niveles bajos y altos en coincidencia con el día y la noche subjetivos del animal (Capítulo I). Esto corrobora las presunciones anteriores: el comportamiento de motivación por una recompensa de comida está regulado circadianamente y tiene una naturaleza endógena rítmica. Además, esta regulación sobre el comportamiento de motivación no se ve alterada en el envejecimiento (Capítulo I), resaltando la importancia de la regulación circadiana en los comportamientos motivados para la supervivencia a lo largo de la vida. En segundo lugar, cuando el reloj circadiano central es incapaz de sincronizarse correctamente a las claves temporales lumínicas del ambiente, ya sea porque las mismas dejan

de ser cíclicas o por cambios crónicos en su fase, el organismo se encuentra en un estado de disincronía interno que afecta la ritmicidad de múltiples variables biológicas. Este estado de desincronización circadiana sostenido en el tiempo conlleva graves consecuencias para la salud, desencadenando estados patológicos. En estos contextos, los comportamientos relacionados con la obtención de recompensas también se ven afectados. En particular, la arritmicidad circadiana causada por la exposición crónica a la luz constante, genera la pérdida del ritmo motivacional y, a su vez, impacta negativamente en el comportamiento reduciendo significativamente sus niveles (Capítulo II). Por otro lado, los cambios crónicos en el ciclo de luz/oscuridad fuerzan la desincronización de los ritmos circadianos, y la exposición a estos esquemas a largo plazo produce una disminución en los niveles motivacionales por las recompensas de comida, anhedonia y la manifestación de fenotipos de tipo ansioso y depresivos en los ratones (Capítulo II). En conjunto, los comportamientos regulados por el sistema de recompensa se ven significativamente afectados por la pérdida del correcto funcionamiento del sistema circadiano a causa de esquemas de iluminación conflictivos. En tercer y último lugar, cuando el oscilador central en los NSQ está correctamente sincronizado al ciclo de luz/oscuridad, pero el oscilador sincronizado por comida (FEO) se encuentra expresándose en una fase opuesta, los animales adaptan su fisiología y comportamiento para anticiparse al momento de alimentación, mostrando patrones de actividad tanto diurnos como nocturnos. Bajo estas condiciones, emuladas en el laboratorio mediante protocolos de restricción alimentaria temporal (Capítulo III), los niveles motivacionales se activan en concordancia con la actividad anticipatoria a la disponibilidad de comida como parte del mecanismo para la búsqueda y obtención del alimento. Al mismo tiempo, los animales mantienen sus niveles de motivación altos durante la noche, guiados por el reloj central. Estas observaciones sugerirían que el sistema de recompensa podría estar recibiendo señales de sincronización tanto desde el reloj central en los NSQ como desde el FEO. Esto generaría la alta motivación durante el día para coincidir con la disponibilidad de comida, y la alta motivación durante la noche coincidente con el estado de vigilia y actividad. Interesantemente, este patrón de la motivación bajo condiciones de desacople entre *zeitgebers*, se expresa de manera diferencial según las características sexuales de los ratones. En hembras, la motivación por una recompensa de comida presenta este patrón dual (o de doble pico) coincidente con la actividad anticipatoria a la comida

y con la fase nocturna del ciclo de luz/oscuridad. Sin embargo, los machos muestran una elevada motivación a lo largo del día y la noche, e incluso luego del acceso a la comida. Nuestra hipótesis para explicar esta respuesta diferencial en el modelo, plantea un desbalance energético y/o un estado interno de estrés fisiológico como consecuencia de la restricción temporal al acceso a la comida que podría impactar en los circuitos de la recompensa y desencadenar conductas de tipo ansiosas que alteren e interfieran con la motivación. Esperamos poder corroborar esta hipótesis y/o encontrar nuevos mecanismos para explicar estos resultados por medio del análisis transcriptómico que estamos llevando a cabo actualmente.

Perspectivas futuras de la línea de investigación

Los experimentos de esta tesis intentaron caracterizar la modulación circadiana del comportamiento de motivación por una recompensa natural teniendo en cuenta principalmente la influencia de dos *zeitgebers*, la luz y la comida. Los resultados obtenidos son importantes para comprender los mecanismos circadianos subyacentes a las conductas recompensadas y aportar conocimiento para el diseño de futuras estrategias que tengan en cuenta al sistema circadiano para lidiar con trastornos del estado de ánimo, desórdenes alimenticios, y el consumo adictivo de drogas. Asimismo, estos resultados ponen una nota de caución en el diseño de experimentos en animales de laboratorio que no tienen en cuenta al tiempo como una variable influyente en el estudio. Evaluar conductual o fisiológicamente a una especie animal nocturna en el momento inadecuado del día puede llevar a obtener resultados desacertados y conclusiones erróneas. Asimismo, se deberían tener en cuenta los esquemas de alimentación y las condiciones de iluminación a las que son sometidos los animales durante el experimento para minimizar el riesgo de sincronización a factores ambientales que puedan interferir con los resultados.

Finalmente, esta tesis es el primer paso de un largo camino para llegar a comprender el mecanismo modulatorio del sistema circadiano sobre la motivación. Los experimentos futuros de nuestra línea de investigación apuntan en esa dirección. Actualmente nos encontramos estudiando qué ocurre con el ritmo motivacional en el ratón *knockout* para el gen circadiano *per2* ($Per2^{-}/^{-}$). Experimentos preliminares indican que las diferencias día-noche en la motivación por

una recompensa se pierden en estos ratones, lo que confirmaría que el mecanismo molecular del reloj circadiano es necesario para la expresión rítmica de los comportamientos motivados. Asimismo, se pretende en un futuro poder utilizar ratones *knockout* condicionales de *bmal1* específicamente en el estriado (genotipo Bmal1-SKO cre-dependiente) en colaboración con el Dr. Shimon Amir (Concordia University, Canada). En estos mutantes, el gen circadiano *bmal1* se encuentra delecionado exclusivamente en el estriado (por medio de inyecciones víricas sitio-específicas) lo que nos permite estudiar cuál es la contribución de la ritmicidad de los genes reloj presentes en el estriado (en particular el núcleo accumbens) en la variación diaria del comportamiento de motivación. Por otro lado, otros experimentos actualmente en curso en nuestro laboratorio apuntan a entender la importancia de la microbiota intestinal en la regulación de los estados de ánimo y la motivación. Muchas investigaciones apuntan a que la microbiota intestinal es capaz de señalizar al sistema de recompensa (por medio de, por ejemplo, péptidos u hormonas liberadas a la sangre) para modular los comportamientos recompensados. En particular, estamos estudiando cómo la depleción completa de la microbiota afecta a la motivación por una recompensa de comida durante la actividad anticipatoria a la comida en un protocolo de alimentación restringida temporalmente (TRF). Finalmente, estamos planificando estudiar cómo el ritmo de ingesta-ayuno afecta al oscilador sincronizado por comida (FEO) y sus variables de salida. En particular, qué ocurre con la ritmicidad del FEO cuando el *zeitgeber* no fótico de la comida se encuentra administrado de forma irregular (en un modelo de *jet-lag* pero utilizando la comida en lugar de la luz) mediante la observación de la FAA como variable de salida del oscilador. Además, evaluaremos los efectos de esta relación temporal sobre la composición y señalización del microbioma intestinal, así como sobre la motivación por una recompensa y otros *mood-related behaviors*.

Publicaciones

Los resultados del presente trabajo de tesis doctoral se encuentran en los siguientes trabajos y revisiones, publicados o actualmente en preparación:

- Acosta, J., Acosta Rodriguez, V., Skinner, N., Krupp, J., Golombek, D.A., J. Takahashi, J., & Agostino, P.V. "Misaligned food and light synchronization triggers sex-specific motivational responses in mice under a time-restricted feeding (TRF) protocol" (en preparación).

- Acosta, J., Crespo, M. T., Plano, S.A., Golombek, D.A., Chiesa, J. J. & Agostino, P. V. (2023). Chronic jet lag reduces motivation and affects other mood-related behaviors in male mice. Front. Physiol. 14:1225134, doi: 10.3389/fphys.2023.1225134.

- Acosta, J., Golombek, D. A. & Agostino, P. V. (2020). Circadian modulation of motivation-related behavior. Sleep Science, DOI: 10.5935/1984-0063.20200006.

- Acosta, J., Bussi, I. L., Esquivel, M., Höcht, C., Golombek, D. A. & Agostino, P. V. (2020). Circadian modulation of motivational behavior in mice. Behavioral Brain Research 382:112471. doi: 10.1016/j.bbr.2020

Agradecimientos

Qué difícil me resulta escribir los agradecimientos. No porque no tenga motivos para agradecer ni personas a quien darle las gracias. Sino porque esta parte significa el final. Simboliza el cierre de una etapa de las más lindas que me tocó vivir. Etapa en la que crecí enormemente como profesional y persona, donde aprendí a desarrollarme como científica y a amar lo que hago. Una etapa en la que conocí personas maravillosas que me acompañaron, escucharon, enseñaron y guiaron en este difícil y turbulento camino. Personas que me cambiaron la vida y que voy a llevar siempre en mi corazón. Para todas ellas van los siguientes párrafos.

A Pato y a Diego: infinitas gracias. No sólo por hacerme parte de este laboratorio maravilloso (del cual siempre sentiré que soy parte) sino por su confianza en mí. Gracias por darme la libertad de desarrollarme como profesional a mi manera, gracias por confiar en mi capacidad y gracias por estar para enseñarme o guiarme cuando lo necesité. Gracias por la paciencia (¡sobre todo gracias Pato por tu paciencia porque siempre te mandé las cosas a último momento!). Aprendí mucho de ustedes y voy a extrañar llamarlos 'mis jefes'.

A todos y cada uno de los investigadores del laboratorio. Todos y todas ustedes en algún momento de mi estadía en el laboratorio me han dado una mano enorme, ya sea planificando un experimento, discutiendo resultados o ideas, compartiendo una charla con unos mates, debatiendo temas random (muy random la mayoría de las veces) o levantándome el ánimo y escuchándome cuando lo necesité. Nati, Lau, Ro, Jose, Juancho y Santi: gracias infinitas, los y las quiero!

Juancho y Santi (sí, tienen una sección aparte): con ustedes no tengo palabras de agradecimiento. Son parte de esta tesis y me han ayudado más de las veces que puedo contar. Me ayudaron a planificar experimentos, a pensar formas de análisis y a entender resultados. Me han enseñado de Cronobiología y de estadística, todo lo que sé en gran parte se los debo a ustedes. Pero eso ni siquiera es relevante en comparación con las múltiples veces que me han ayudado a nivel personal, que me han escuchado o dado un consejo, que se preocuparon por mi o me dieron un abrazo cuando lo necesitaba. Los adoro con el corazón, y los voy a extrañar mucho, muchísimo.

A mis compañeros de doctorado y amigos Lau T, Nacho y Melita: ¡Qué placer habernos cruzado para hacer un doctorado en esta vida! Y qué difícil hubiese sido todo sin ustedes. Gracias básicamente por existir jaja. Realmente, fueron personas muy importantes a lo largo de este camino y que no me alcanzan las páginas para agradecerles por las incontables veces que estuvieron ahí para mí y por todo lo que compartimos juntos. Cómo extraño trabajar con ustedes, cómo extraño los chistes, quejarnos para desahogarnos, los llantos, los mates, las charlas en el puente con el puchito. Cómo los extraño y los voy a extrañar. Por suerte los tengo de amigos y sé que esto no termina. Gracias, fueron los mejores compañeros de doctorado que alguien puede tener, los quiero mucho.

A los *new* Cronos Vicky, Cami, Bri, Fran, Manu y Guido: mis chiquitos (perdonen me pegó el viejazo) que lindo haber compartido el labo con ustedes. Si hay algo importante en esta vida es trabajar con buenas personas, y ustedes realmente lo son. Voy a extrañar mucho verlos todos los días e irnos de congreso juntos para vivir un cuasi viaje de egresados jaja. Los quiero, son maravillosas personas. Camilin: por la amistad que hemos forjado en estos últimos tiempos, merecés una mención aparte para decirte que te quiero mucho, te voy a extrañar fuerte y que espero vengas a visitarme!

A los *old* Cronos (siempre cronos) Male, Ivi y Lea: compartí con ustedes cuando recién llegué a este laboratorio y me es necesario agradecerles por las veces que me han ayudado, me han enseñado alguna técnica o experimento o me han dado un consejo (de esos muy buenos consejos que te cambian la vida como: ¿y por qué no vas a lo de Joe?). Aprendí un montón de ustedes y siempre admiré (y admito que lo sigo haciendo) cuánto saben y los buenos profesionales y personas que son. Gracias por los momentos vividos.

A mis amigos y amigas de la UNQ que compartimos la carrera juntos, y con la mayoría incluso el doctorado, cruzándonos en el pasillo y hablando cosas que sólo puedo hablar con ustedes porque son los únicos que entienden. A mis amigos y amigas de la vida, básicamente porque ustedes le ponen color a mi vida, porque sin ustedes nada tiene sentido. A mi mejor amiga Anto: me acompañaste y contuviste tanto incontables veces, y fuiste la única que estuvo siempre presente, incluso a la distancia, te amo amiga.

A la Vicky, quien me abrió las puertas de su casa en un país muy lejano sin siquiera conocerme. Quien me facilitó poder vivir una de las experiencias más increíbles de mi vida profesional. Gracias por la maravillosa persona que sos, por todo lo que me enseñaste e hiciste crecer en 6 meses, y para que nos sigamos cruzando en congresos y compartiendo momentos!

A mi familia, la razón por la que vivo y por la cual soy la persona que soy y pude llegar hasta acá. Papi: vos sos parte de esta tesis, no sólo por darme la vida y acompañarme a transitarla, sino literalmente por todas las veces que me fuiste a buscar a la UNQ a la madrugada cuando tenía que hacer experimentos jaja! Para vos no hay palabras que valgan, sos el mejor papá que alguien pudiera tener. Gracias por sostenerme emocionalmente, por escucharme, por entenderme y por guiarme y acompañarme siempre desde el amor. Las faltas siempre se sienten, pero vos hiciste que mi vida brillara a pesar del dolor, te debo todo, te amo infinitamente. A mi hermana: mi ejemplo de mujer, mi sostén y mi maestra. Sos la otra razón por la cual puedo decir que tuve y tengo una vida hermosa. Vos siempre estas, y aunque quizás nunca te lo dije, sos el verdadero pilar que me sostiene en esta vida. Gracias por darme la sobrina más hermosa del mundo y que me cambió la vida (y por la o el que está por venir!). Gracias por tus consejos estos últimos tiempos cuando estaba escribiendo la tesis, muchos de ellos me levantaron el ánimo y me dieron fuerzas para seguir adelante, te amo con todo lo que soy hermana mía. Mamita de mi corazón: ya nos volveremos a encontrar, gracias por darme la vida. Te amo y te extraño todos los días.

Al amor de mi vida, mi novio (ahora esposo), mi compañero. Gracias mi vida por lo vivido en todos estos años. Transitaste toda esta etapa conmigo, me viste llorar y ser feliz. Me bancaste en todas e incluso te bancaste que me fuera seis meses cuando te dije que eran tres! Y ahora me acompañas a vivir una nueva aventura. Sin vos no podría, vos sos mi hogar. Te admiro y te amo profundamente. Ojalá la vida nos regale mucho tiempo juntos, yo quiero vivirla con vos.

Y, por último, a mi amada Universidad Nacional de Quilmes. Mi segunda casa. Qué raro va a ser no caminar más por tus pasillos. Gracias por abrirme las puertas, formarme como profesional y darme dos títulos. ¡Que sigas siendo siempre pública, gratuita y para todxs!