



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



Universidad
Nacional
de Quilmes

Bussi, Ivana Leda

Modulación circadiana de la estimación de intervalos cortos de tiempo



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:

Bussi, I. L. (2018). *Modulación circadiana de la estimación de intervalos cortos de tiempo. (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/20.500.11807/806>

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

Modulación circadiana de la estimación de intervalos cortos de tiempo

TESIS DOCTORAL

Ivana Leda Bussi

ivanabussi@gmail.com

Resumen

Con el objetivo de adaptarse a un entorno cambiante, los organismos han desarrollado sistemas temporales que les permiten predecir eventos ambientales importantes para su supervivencia. Entre los sistemas temporales desarrollados para tal fin, los cuales abarcan más de diez órdenes de magnitud, se encuentra el sistema de estimación de intervalos cortos de tiempo (en inglés, *interval timing*). Este sistema opera en el rango de segundos a minutos y está involucrado en la percepción consciente del paso del tiempo (es decir, requiere procesamiento cognitivo). Por otro lado, el sistema circadiano controla procesos fisiológicos y comportamentales con un período cercano a un día.

El presente trabajo consistió en la dilucidación de la relación que existe entre estos dos sistemas temporales. En el primer capítulo, se modificaron variables que afectan a los ritmos circadianos de manera característica, a fin de evaluar de qué manera el sistema de estimación de intervalos cortos de tiempos respondía a esos cambios. Se demostró que la estimación de tiempo tiene una variación diaria y que la misma persiste en condiciones de oscuridad constante. Además, se vio que la habilidad de estimar el tiempo se ve afectada por una desincronización transitoria de los ritmos circadianos causada por un cambio abrupto en el esquema de iluminación. Más aun, se observó que en condiciones de luz constante, las cuales causan arritmicidad circadiana, los animales son incapaces de estimar correctamente el paso del tiempo. Por otro lado, se demostró que el *déficit* en la estimación de intervalos cortos de tiempo que presentaron los ratones en condiciones de luz constante no se debe a problemas de visión, ansiedad y memoria que pudieran causar estas condiciones de iluminación.

Por otro lado, se propusieron dos moduladores de la comunicación entre ambos sistemas temporales: el neurotransmisor dopamina y la hormona melatonina. En el segundo capítulo, se estudió a la dopamina (DA) como posible mediador de la comunicación entre ambos sistemas, ya que es una molécula clave en el proceso de estimación temporal y, a su vez, su ruta metabólica forma un circuito que está sujeto a regulación circadiana de algunos de sus elementos. Se demostró que la administración de un precursor de DA mejora la estimación de tiempo en animales en condiciones de luz constante. Además, se encontró un ritmo diario en los niveles estriatales del neurotransmisor, el cual es abolido en condiciones de luz constante. Este capítulo también reveló que elementos de la señalización dopaminérgica como: tirosina hidroxilasa (TH), el receptor D2 y el producto de metabolización de dopamina, DOPAC, presentan ritmos diarios que se pierden en condiciones de luz constante. El mismo comportamiento se encontró en la expresión de la proteína reloj PER2 en estriado. Por otro lado, se demostró que la motivación por una recompensa, comportamiento ligado a la función dopaminérgica, presenta un ritmo diario en ratones jóvenes y que esta diferencia se pierde en animales viejos.

Finalmente, en el tercer y último capítulo, se estudió a la melatonina (MT) como mensajero entre los dos sistemas en estudio. Se demostró que la falta de esta hormona afecta la estimación de intervalos cortos de tiempo, y que la administración de la misma en agua de bebida restablece la capacidad de estimar el tiempo en ratas pinealectomizadas. A su vez, se determinó que las ratas que poseen MT se ven menos afectadas por una desincronización transitoria causada por un cambio

abrupto en el esquema de luz, en comparación con las ratas que no poseen la hormona endógena. Por otro lado, se demostró que la acción de la hormona es horario=específica y que solo mejora la estimación del tiempo cuando la tarea es realizada durante la noche. Además, se halló que las ratas que no poseen la hormona presentan mayores niveles de DA estriatal durante la noche, y que la administración de MT exógena disminuye estos niveles, restaurando los valores normales.

El estudio del procesamiento temporal tiene una enorme relevancia en las áreas de Neurociencias y Medicina, sobre todo en aquellas que estudian desórdenes neurológicos como las enfermedades de Parkinson, Alzheimer, Huntington o Esquizofrenia. Los resultados de la presente tesis permiten conocer un poco más los mecanismos por los cuales los relojes biológicos son capaces de dar cuenta de los cambios ambientales e informar al organismo del patrón temporal más adecuado para su funcionamiento. La importancia de este proyecto se encuadra dentro del objetivo global de comprender los mecanismos de procesamiento temporal, que resultan fundamentales para la supervivencia y el desempeño óptimo de los organismos.

Director: Dra. Patricia Agostino

Co-director: Dr. Diego Golombek

Laboratorio de Cronobiología / Departamento de Ciencia y Tecnología

Índice

	Pág.
Introducción General.	6
Los tiempos biológicos y sus diferentes escalas.	6
Generalidades del proceso de estimación de intervalos cortos de tiempo.	8
Modelos generales de procesamiento temporal.	10
Bases neuroanatómicas de la estimación de intervalos cortos de tiempo.	13
El modelo que lo integra todo: Modelo Estriatal de Pulso de Frecuencia.	15
Hablemos de tiempos un poco más largos: ritmos circadianos.	17
Organización anatómica.	20
Mecanismos moleculares de oscilación-	22
Vías de entrada al reloj circadiano.	24
Las vías de salida del reloj circadiano.	25
Un ritmo evidente y fácilmente medible: la actividad locomotora.	25
Interacción entre el sistema circadiano y la estimación de intervalos cortos de tiempo.	27
Capítulo I. Estimación de intervalos cortos de tiempo.	
Introducción.	28
Objetivos.	32
Materiales y Métodos.	33
Resultados.	44
Ritmo diario en la estimación de intervalos cortos de tiempo.	44
Estimación de intervalos cortos de tiempo en oscuridad constante.	48
Efecto de un <i>jet-lag</i> simulado sobre la estimación de intervalos cortos de tiempo.	50
Estimación de intervalos cortos de tiempo en condiciones de luz constante.	53

Electroretinograma.	56
Ensayos de ansiedad.	57
Test de reconocimiento de un objeto novedoso (NOR).	59
Discusión.	61
Capítulo II. Rol dopaminérgico en la estimación de intervalos cortos de tiempo	
Introducción.	64
Objetivos.	70
Materiales y Métodos.	71
Resultados.	77
Efecto de la administración de L-DOPA sobre la estimación de intervalos cortos de tiempo.	77
Ritmo diario en los niveles de dopamina estriatal.	82
Ritmos diarios en la síntesis y degradación de dopamina estriatal.	83
Expresión de Per2 en estriado y sustancia nigra.	85
Caracterización de la expresión del receptor de dopamina D2 en estriado dorsal.	88
Ensayo de Motivación hacia una recompensa.	91
Discusión.	95
Capítulo III. Rol de la hormona melatonina en la modulación circadiana de la estimación de intervalos cortos de tiempo en ratas.	
Introducción.	102
Objetivos.	108
Materiales y Métodos.	109
Resultados.	114

Consumo de sacarosa.	114
Efecto de la falta de melatonina en la estimación de intervalos cortos de tiempo.	115
Efecto de la administración de melatonina sobre la estimación de intervalos cortos de tiempo.	120
Efecto de un <i>jet-lag</i> simulado sobre la estimación de intervalos cortos de tiempo en ratas.	124
Efecto de la administración de melatonina en animales testeados durante el día.	126
Efecto de melatonina sobre los niveles de dopamina en el cuerpo estriado.	129
Discusión.	131
Discusión general y Conclusiones.	134
Publicaciones.	138
Agradecimientos.	139
Bibliografía.	140

Introducción general

Los tiempos biológicos y sus diferentes escalas

Para percibir el paso del tiempo, los organismos han desarrollado múltiples sistemas que se activan en un rango de más de diez órdenes de magnitud, siendo los tres más importantes: el tiempo en el orden de los milisegundos, el rango que va de segundos a minutos (también llamado *interval timing*) y el tiempo circadiano (Buhusi y Meck, 2005). Cada uno de estos rangos está asociado a distintas estructuras cerebrales e intervienen en diferentes funciones comportamentales específicas.

La percepción del tiempo en el orden de los milisegundos es crucial para el control motor y la percepción del lenguaje, entre otras funciones, y se ha postulado que la estructura cerebral involucrada es el cerebelo (Bueti et al., 2008). La estimación del tiempo en el rango de segundos a minutos rige procesos cognitivos tales como aprendizaje, memoria y toma de decisiones (Lustig et al., 2005, McGuire y Kable, 2012). Las estructuras cerebrales involucradas en esta percepción temporal son las que conforman el llamado circuito cortico-estriatal (corteza prefrontal, cuerpo estriado, tálamo y lóbulo temporal medio). A su vez, los ritmos circadianos operan en un rango cercano a las 24 horas y están implicados en múltiples funciones fisiológicas tales como el control de la temperatura y el ciclo sueño-vigilia, entre otras (Buhusi y Meck, 2005).

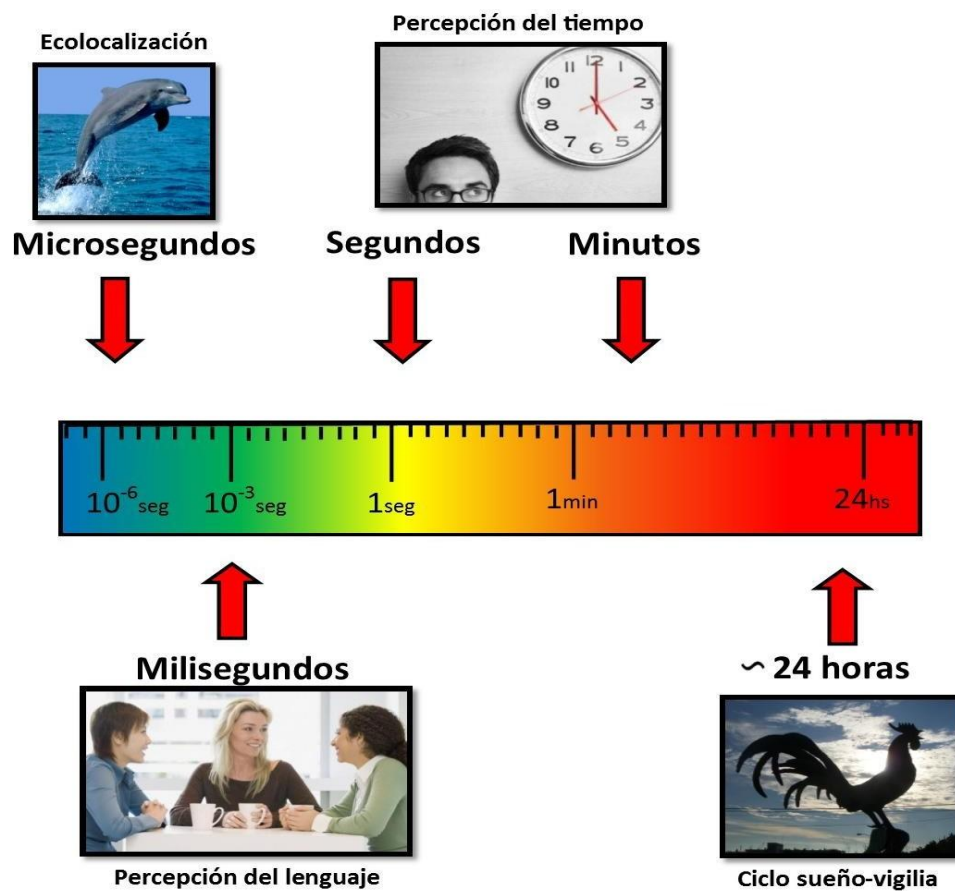
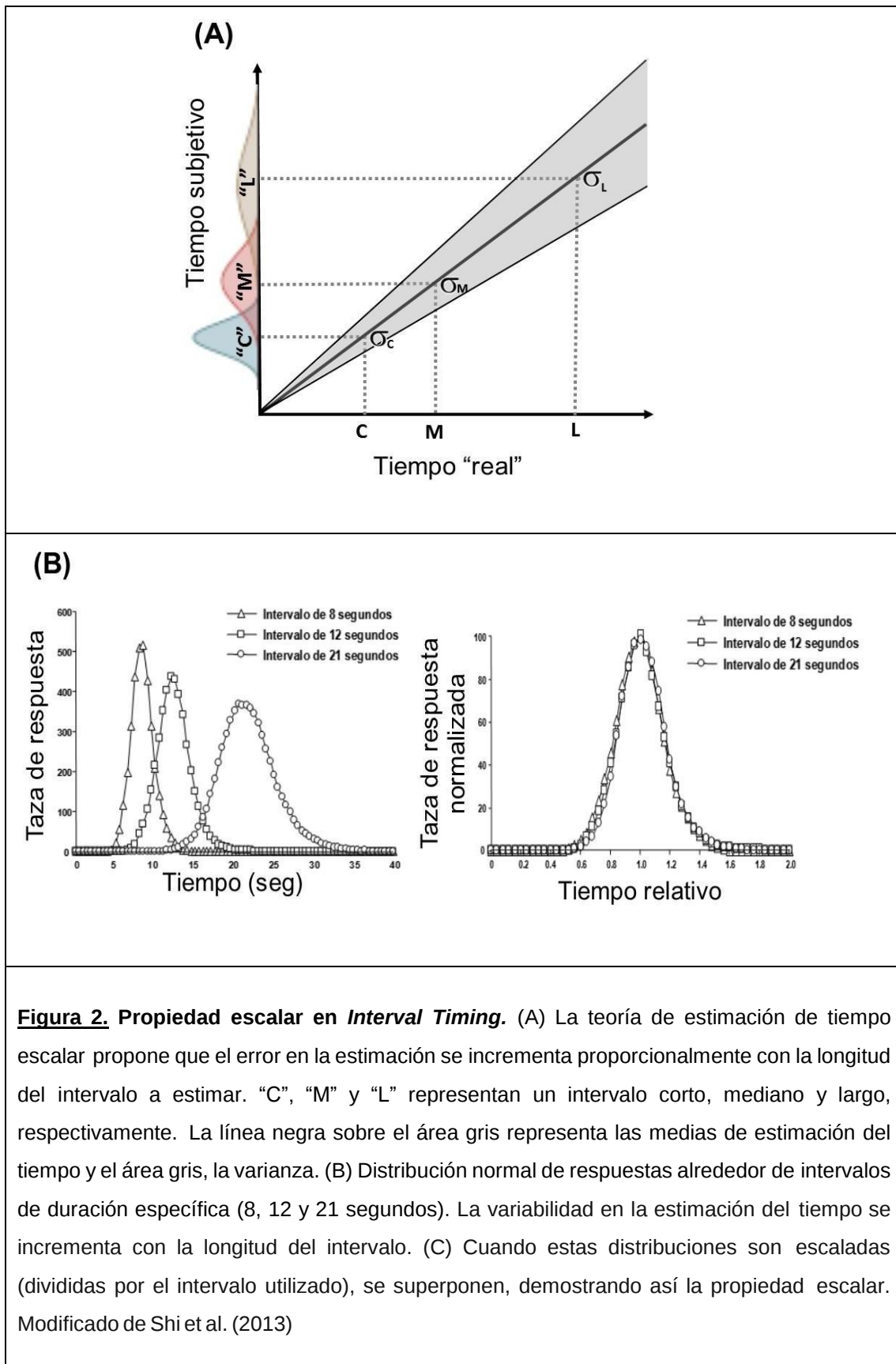


Figura 1. Principales escalas de tiempo biológicamente relevantes. En el rango de los microsegundos se encuentra el tiempo que tarda una onda en rebotar contra un objeto cercano y volver, evento importante para la ecolocalización. El rango de los milisegundos es crítico para control motor, lenguaje, habilidades musicales y memoria de trabajo. La estimación del tiempo en el rango de segundos a minutos (*interval timing*) depende de procesos cognitivos tales como atención y memoria. El rango circadiano (cuyo período es cercano a 24 horas) gobierna la mayoría de las funciones fisiológicas y conductuales, como la temperatura corporal y el ciclo sueño vigilia. Modificado de Buonomano (2007).

Generalidades del proceso de estimación de intervalos cortos de tiempo

La percepción del tiempo en el rango de segundos a minutos es llamada en inglés *interval timing*. Este comportamiento complejo se aplica a la vida cotidiana en múltiples acciones como, por ejemplo, cuándo comenzar a cruzar la calle calculando la velocidad de un auto que se aproxima, o el momento de acelerar cuando la luz del semáforo está por pasar de rojo a verde. En el caso de los animales, este comportamiento es importante para la actividad de forrajeo, en la que los animales deciden cuándo y cada cuánto comer para optimizar el proceso de alimentación sin gastar más energía de la que el alimento les brinda [teoría de forrajeo óptimo; Charnov (1976)].

Una de las características principales de la estimación de intervalos cortos de tiempo es que, salvo excepciones en rangos temporales muy pequeños [< 2 segundos, Grondin (2012)], la variabilidad temporal en el comportamiento de “salida” (*output*) de un organismo es proporcional a la duración del estímulo que el organismo “cronometra o calcula”. Es decir, la desviación estándar de una estimación temporal es proporcional a la duración del intervalo a estimar (Figura 2). Esta propiedad escalar es derivada de la ley de Weber-Fechner.



Modelos generales de procesamiento temporal

Si bien hay vastos modelos que intentan explicar el procesamiento temporal, hay un esquema ampliamente utilizado para describir la habilidad de estimar el tiempo, el sistema de procesamiento de la información acoplado a la Teoría de expectativa escalar (SET), formulado por John Gibbon en 1977 (Figura 3). El mismo involucra tres etapas: una etapa reloj, una de memoria y otra de decisión. En este modelo la representación temporal proviene de la etapa de reloj, donde un marcapasos emite pulsos a una determinada frecuencia, un interruptor controla el pasaje de los pulsos emitidos por el marcapasos, y un acumulador almacena los pulsos durante el evento de estimación del tiempo. Al comienzo de un evento de estimación temporal, el interruptor permite el paso de los pulsos hacia el acumulador, mientras que al final del evento el interruptor se cierra y no deja pasar los pulsos. El acumulador plantea una relación entre los pulsos acumulados y la duración del evento; cuanto más largo el evento, mayor cantidad de pulsos serán acumulados. Luego comienza la etapa de memoria, en la que la duración medida por el acumulador es comparada con distintas muestras de diferentes duraciones almacenadas en la memoria de referencia, para luego decidir cómo responder, dando lugar a la etapa de decisión.

Si bien este esquema es ampliamente aceptado, se han postulado múltiples modificaciones para explicar de formas variadas el proceso de estimación temporal (Ivry y Spencer, 2004). En particular, se han propuesto diversos modelos que describen la naturaleza de la etapa reloj. Estos pueden ser divididos en tres clases: modelos de marcapasos-acumulador, modelos de proceso de decaimiento y modelos de osciladores y detectores de coincidencias. Los seis modelos principales postulados (dos de cada tipo) se comparan brevemente en la tabla 1.

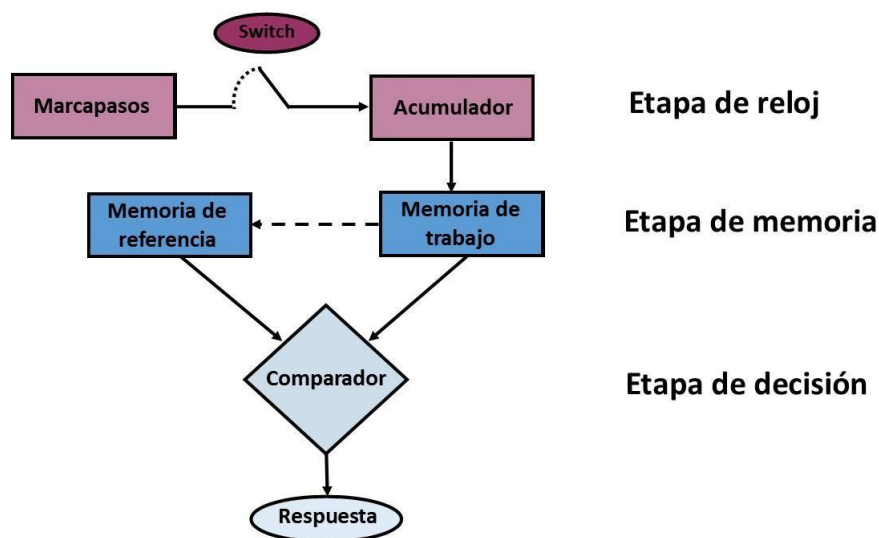


Figura3. Modelo de procesamiento de la información (SET) para la estimación de tiempo.

Modificado de Droit-Volet y Meck (2007).

Tabla 1. Modelos psicológicos de mecanismos de estimación de intervalos cortos de tiempo. Adaptado de Matell y Meck (2000).

Modelo	Tipo de reloj	Mecanismo
Teoría de expectativa escalar (SET)	Marcapasos - Acumulador	Un marcapasos en continuo funcionamiento es conectado con el acumulador al inicio de la señal. El valor en el acumulador es almacenado en la memoria de referencia. Utiliza un proceso de comparación para lograr la varianza escalar.
Teoría comportamental de <i>timing</i>	Marcapasos - Acumulador	El marcapasos se inicia luego de una señal y dirige a los animales a diferentes estados comportamentales con cada pulso. La velocidad del marcapasos es proporcional a la recompensa con el fin de adaptarse a la propiedad escalar.

Escalas temporales múltiples	Decaimiento del proceso	El decaimiento de la fuerza de la memoria cumple el rol de reloj. Tiempos específicos están asociados a decaimientos específicos. La propiedad escalar es inherente a la “forma” de la curva de decaimiento, ya que se aproxima a una función de desaceleración negativa.
Modelo de <i>timing</i> espectral	Decaimiento del proceso	La activación diferencial de un grupo de neuronas da lugar a distintas tasas de habituación. La combinación de estas tasas da lugar a distintas combinaciones de estos estados de activación para las diferentes duraciones. La propiedad escalar es lograda a través de la habituación, considerando que ésta es equivalente al estado de activación.
Oscilador es múltiples	Oscilador/ Detección de coincidencias	Una variedad de periodos de oscilación comienzan a funcionar luego de la señal de inicio. El tiempo se decodifica mediante la lectura del conjunto de osciladores. Duraciones más largas son codificadas por oscilaciones más largas, y la propiedad escalar se compone con los periodos de oscilación.
Modelo de frecuencia de pulso	Oscilador/ Detección de coincidencias	Luego de una señal, una variedad de oscilaciones rápidas son iniciadas. El código temporal está codificado por aquellas neuronas que disparan en el tiempo <i>target</i> . El conjunto de neuronas que disparan coincidentemente producen una activación máxima en el tiempo <i>target</i> y gran actividad en las cercanías del intervalo, dando lugar a la propiedad escalar.

Bases neuroanatómicas de la estimación de intervalos cortos de tiempo

Al mismo tiempo que existen varios modelos para explicar el procesamiento temporal, hay evidencias de múltiples estructuras cerebrales implicadas en este comportamiento. Muchas de ellas fueron descubiertas alterando su función mediante lesiones o experimentos farmacológicos. La participación de algunas de ellas en el proceso de estimación temporal es controversial, dado que si bien pueden modificar levemente el comportamiento no son totalmente necesarias para que el mismo se desarrolle. Un ejemplo claro de protagonismo controversial en este comportamiento es el del cerebelo. Algunos trabajos en humanos con alteraciones transitorias y lesiones en esta estructura demuestran que es fundamental para la estimación de intervalos muy cortos de tiempo (Koch et al., 2007, Gooch et al., 2010), mientras que otros sostienen que tal órgano no es necesario (Breukelaar y Dalrymple-Alford, 1999, Harrington et al., 2004). Por otro lado, hay estructuras como el estriado dorsal y la sustancia nigra pars compacta (SNPC) que son esenciales para la estimación de intervalos cortos de tiempo y han sido validadas por numerosos estudios farmacológicos, de lesiones e imágenes en humanos y roedores (Hinton y Meck, 1996, Harrington et al., 1998, Meck y Benson, 2002, Hinton y Meck, 2004). Entre ellos, un estudio demostró que tanto las lesiones en SNPC y caudado-putamen (CP) eliminaron el control temporal en ratas, mientras que lesiones en núcleo accumbens (NAC) no lograron el mismo efecto. Estos resultados sugieren que la vía nigroestriatal (sustancia nigra-estriado) está estrechamente relacionada con el comportamiento estudiado (Meck, 2006).

La anatomía de los ganglios de la base sugiere que la información fluye por el circuito cortico-estriado-talámico. Se ha demostrado la contribución de la corteza y el tálamo por estudios farmacológicos en humanos y roedores (Hinton y Meck, 1997, Harrington y Haaland, 1999, Kim et al., 2013, Parker et al., 2014, Parker, 2015) y estudios con sujetos con lesiones y patologías corticales (Binkofski y Block, 1996, Henley et al., 2014).

Los ganglios de la base son un grupo de estructuras subcorticales que reciben aferencias de la corteza, el tálamo y el cerebro medio. Históricamente se relacionó a los ganglios de la base con un rol en el funcionamiento motor (Graybiel et al., 1994, Svensson et al., 1995), pero hoy en día se sabe que estas estructuras participan en una gran variedad de procesos motivacionales y cognitivos (Kawagoe et al., 1998, Middleton y Strick, 2000, Aron et al., 2007, Bromberg-Martin et al., 2010, Arnsten y Rubia, 2012). Las conexiones del circuito cortico-basal-tálamo-cortical se muestran en la Figura 4.

Aferencias glutamatérgicas provenientes de la corteza, y en menor medida del tálamo, inciden en el estriado. Entre unos 10.000 y 30.000 axones llegan a cada neurona espinosa mediana del estriado (NEM), las cuales son la composición mayoritaria de esta estructura [abarcen el 90% de la misma; Kawaguchi et al. (1997)]. Las eferencias

GABAérgicas del estriado pueden seguir dos caminos: el directo o el indirecto. El camino directo consta de proyecciones hacia el segmento interno del globo pálido y la sustancia nigra pars reticulada (SNPR), las cuales sirven como “núcleos de salida” de los ganglios de la base, proyectando principalmente al tálamo. La vía indirecta pasa por el segmento externo del globo pálido y por el núcleo subtalámico y luego va también hacia la estación de salida (SNPR). Esta vía sirve para contrarrestar los efectos de la influencia de la vía directa inhibitoria estriatal sobre las neuronas eferentes de los ganglios de la base. El “núcleo de salida” aporta una aferencia inhibitoria mediada por GABA al tálamo, el cual, en respuesta, dirige una eferencia excitatoria glutamatérgica de vuelta a la corteza y al estriado (Surmeier et al., 2007).

Las señales que recibe el estriado poseen un segundo origen, se trata de las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio. Estas neuronas dopaminérgicas reciben a su vez las señales de varios núcleos del circuito, cerrado la comunicación.

Las neuronas dopaminérgicas, mayormente provenientes de SNPC, se conectan con las NEM del estriado en co-sinapsis con las aferencias excitatorias de la corteza y el tálamo (Surmeier et al., 2010). El rol específico que cumple la dopamina (DA) sobre la membrana de las neuronas estriatales se ha ido develando en los últimos años mediante el estudio por separado de dos poblaciones diferenciales de NEMs: las estriatopalidales, que proyectan sus axones hacia el globo pálido y expresan mayoritariamente el receptor de dopamina D2 y las estriatonigrales que proyectan sus axones hacia la SNPC y expresan el receptor de dopamina D1 (Gerfen et al., 1990). Cuando la DA actúa sobre las neuronas espinosas medianas que expresan el receptor D2, el neurotransmisor media la reducción de la liberación de glutamato, así como la respuesta de las neuronas al glutamato liberado. Además, la activación de D2 genera una depresión a largo término de la transmisión glutamatérgica. Por otro lado, cuando la DA actúa vía el receptor D1, disminuye las señales sinápticas débiles, asincrónicas, pero aumenta la respuesta a señales glutamatérgicas fuertes y coordinadas, promoviendo la apertura del receptor de tipo NMDA. Además, la activación de D1 promueve la potenciación a largo término de la señalización glutamatérgica, reforzando la red de conexiones que están activas durante eventos en los que se desencadena la liberación fásica de DA [revisado en Surmeier et al. (2007)].

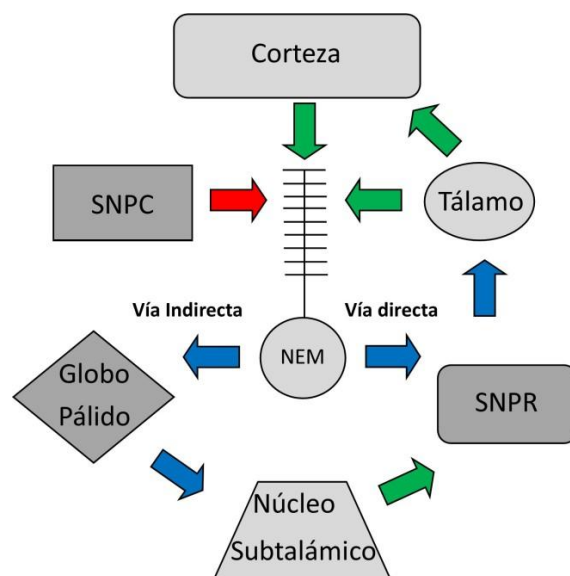


Figura 4. Circuito córtico-basal-tálamo-cortical involucrado en la estimación de intervalos cortos de tiempo. Las flechas indican la dirección en la que fluye la información. Las flechas azules representan señales de naturaleza GABAérgica, las verdes glutamatérgicas y las rojas, dopaminérgicas. Modificado de Matell et al. (2004)

El modelo que lo integra todo: Modelo Estriatal de Pulso de Frecuencia.

El Modelo Estriatal de Pulso de frecuencia [MEPF, Matell et al. (2004)] está basado en el modelo de frecuencia de pulso de Miall (1989). El mismo toma la red cortico-estriatal como el origen de la información temporal (Figura 5). Un grupo de osciladores corticales con frecuencias estables distintas son puestos en fase por una señal en el inicio de un evento de estimación. Esta señal es de naturaleza dopaminérgica y proviene de la SNPC. Luego de la señal, los osciladores corticales comienzan a oscilar juntos pero luego se desincronizan a lo largo del tiempo. Las NEM del estriado actúan como detectores de los estados de activación de estos osciladores. Éstas se tornan activas si reconocen ciertos patrones de activación del grupo de neuronas corticales que están censando. Ya que los distintos osciladores tienen diferentes frecuencias, a distintos tiempos posteriores respecto al punto en que se los puso en fase se pueden apreciar distintos patrones de activación del conjunto, permitiendo así la asociación entre un determinado patrón de coincidencia entre los osciladores y un evento temporal determinado. Es decir, en el final de un evento de estimación temporal, los osciladores que estén activos son considerados un código neural para esa duración en particular. En este modelo tanto la señal de comienzo, que promueve el cierre del interruptor que deja fluir los pulsos desde los osciladores y el acumulador, como la del final del evento de estimación, están marcados por un pulso de DA

proveniente de SNPC hacia el estriado.

En MEPF, la fuerza de unión sináptica es única para cada NEM del estriado, lo que significa que la duración de un evento de estimación está codificada por una única NEM. Entonces, puede postularse que cada NEM, luego de experimentar una duración particular varias veces, lo cual producirá un aprendizaje y refinamiento de la fuerza de unión sináptica, se convierte en una especialista en detección de esa duración y disparará siempre luego de que ese tiempo haya pasado en un evento de estimación. MEPF está íntimamente relacionado con el modelo de SET. En el caso de los osciladores propuestos por el primer modelo, éstos proporcionan la misma información que los marcapasos-oscilador combinados en el modelo de SET. A su vez, las conexiones córtico-estriatales que se desarrollan y afinan a partir de las múltiples experiencias temporales cumplen un rol similar a la memoria del modelo SET. La etapa de decisión postulada en SET, puede ser entendida en MEPF como el disparo de una NEM luego de censar un patrón adecuado de activación por parte de sus osciladores aferentes.

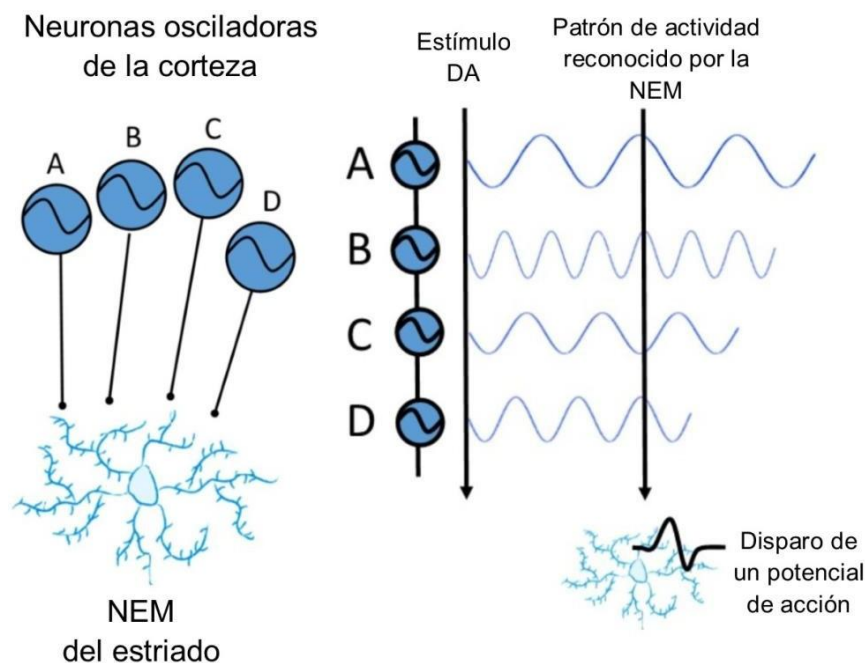


Figura 5. Mecanismo de estimación de intervalos cortos de tiempo según MEPF. Los intervalos son estimados a través de NEM del estriado que monitorean patrones de activación de neuronas corticales. En el comienzo de un evento de estimación estos osciladores de corteza son puestos en fase por un estímulo dopaminérgico y van desacoplándose a lo largo del tiempo transcurrido. Una NEM censa el patrón de activación y lo relaciona con el intervalo de tiempo que pasó hasta que ese grupo de osciladores alcanzó ese patrón de activación. Es así como una NEM se especializa en el reconocimiento de un patrón de activación de sus neuronas osciladoras asociadas y dispara ante un patrón de activación reconocido. Modificado de Droit-Volet y Meck (2007)

Hablemos de tiempos un poco más largos: ritmos circadianos.

Así como hay eventos que ocurren de forma aislada, hay otros que se repiten periódicamente: a esos eventos que se reiteran con una frecuencia determinada se los llama rítmicos. Cuando se introdujo el concepto de tiempos biológicos en el comienzo de esta introducción, se mencionaron eventos que tomaban tiempos largos, cercanos a un día. A estos ritmos particulares, que poseen un período cercano a 24 horas, se los conoce como “circadianos” (palabra de origen latín, que significa *circa*= cerca de y *diez*=día).

Estos ritmos se hacen visibles en funciones fisiológicas y comportamentales tales como el ciclo sueño/vigilia, el control de la temperatura corporal, funciones endócrinas y metabólicas, cognición, y otras tantas funciones (Refinetti y Menaker, 1992, Fuller et al.,

2006, Blatter y Cajochen, 2007, Hastings et al., 2007, Kyriacou y Hastings, 2010, Eckel-Mahan y Sassone-Corsi, 2013).

Pero empecemos por el principio. Como se mencionó anteriormente, los ritmos se repiten con una frecuencia determinada y tienen parámetros que los describen, como se indica en la Figura 6. El periodo (τ), describe la duración de un ciclo completo. La amplitud por su parte, se define como la diferencia entre el valor medio (mesor) y el máximo o mínimo de la variable medida. Por otro lado, al momento en el cual un evento específico del ritmo sucede se lo denomina fase (ϕ).

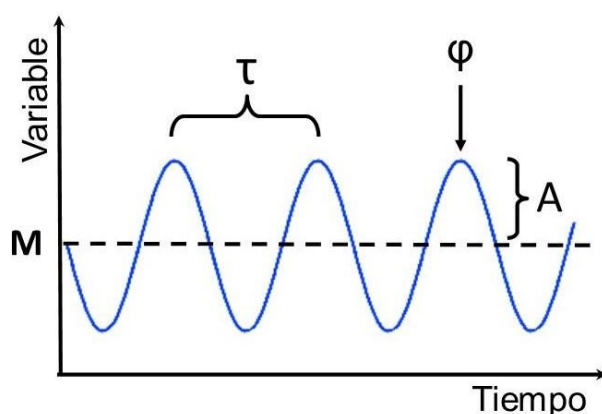


Figura 6. Parámetros de un ritmo. Representación de un ritmo sinusoidal donde M indica el valor medio (mesor) que toma la variable medida. El periodo está representado por la letra τ , ϕ es la fase que en este caso es el valor máximo (pero podría estar representada por cualquier otro punto de la variable en el cual queramos hacer referencia) y A representa la amplitud.

¡Pero ojo! Así como no todo lo que brilla es oro, no todo lo que oscila con un periodo de 24 horas es un ritmo circadiano. Para que un ritmo circadiano sea considerado como tal debe cumplir con las tres propiedades fundamentales que los describen:

- 1) Poseer un período cercano a 24 horas en ausencia de estímulos ambientales cíclicos, esto quiere decir que deben poseer un carácter endógeno.
- 2) Poder sincronizarse por un estímulo ambiental de período cercano a las 24 horas. Es decir que la fase de un ritmo debe conservar una relación estable con la fase del estímulo sincronizador o *Zeitgeber* (del alemán *zeit*=tiempo y *geber*=dador).
- 3) Estar compensados frente a los cambios de temperatura, es decir, que el período del ritmo debe mantenerse relativamente constante a pesar de posibles cambios en la temperatura ambiental a la que el organismo esté expuesto.

Además, en todos los organismos vivos el proceso y el mecanismo a través del cual

se generan y se mantienen los ritmos circadianos tiene una estructura general que consiste en tres elementos fundamentales y los mecanismos de interacción entre ellos. Los elementos fundamentales son: 1- un *Zeitgeber*, el factor del ecosistema cíclico que se impone sobre el organismo; 2- un reloj o un conjunto de relojes, que determinan el orden interno de las funciones biológicas; y 3- los ritmos biológicos propiamente dichos, que representan la salida del sistema (Aguilar-Roblero, 2015). En la Figura 7 puede verse un diagrama simple que esquematiza los componentes del sistema circadiano y las relaciones entre ellos, este esquema fue creado por Arnold Eskin y de allí proviene su nombre, eskinograma. Como se puede observar, los tres elementos básicos se relacionan entre sí mediante interacciones uni o bidireccionales que son indispensables para el correcto funcionamiento del sistema y le confieren, además, una flexibilidad apropiada para adaptarse a diversos entornos.

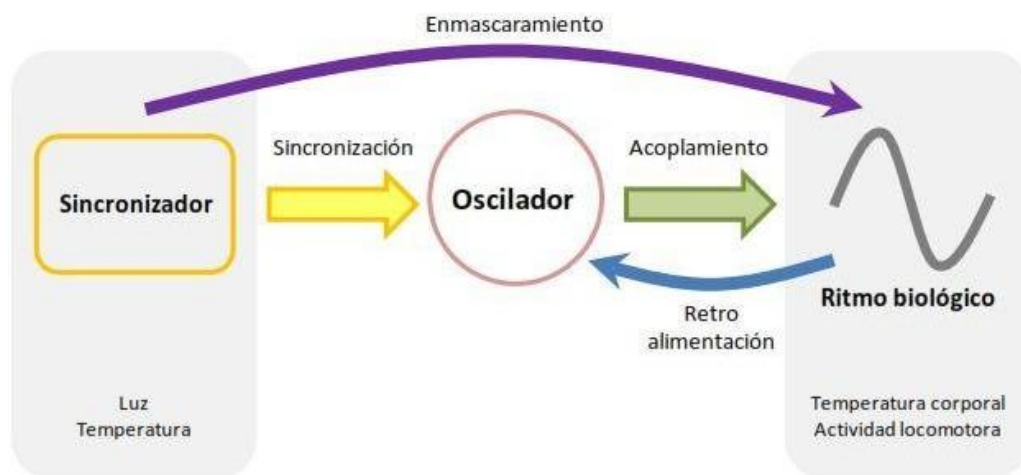


Figura 7. Eskinograma del sistema circadiano. En este esquema se puede apreciar la organización entre los tres componentes principales del sistema circadiano y las relaciones entre ellos. El *Zeitgeber* sincroniza al oscilador central a través de las vías de entrada. El reloj a su vez acopla los ritmos biológicos a través de las distintas vías de salida. Sin embargo, el *Zeitgeber* puede actuar directamente sobre la salida de los ritmos biológicos mediante mecanismos de enmascaramiento. Finalmente, los ritmos biológicos pueden retroalimentar hacia el reloj central afectando su fase.

El *Zeitgeber* es capaz de sincronizar al reloj marcapasos a través de las rutas de entrada del sistema. A su vez, el reloj, a través de las vías de salida, acopla los ritmos biológicos en los distintos niveles de organización del organismo. Por otro lado, se dan otras interacciones no tan lineales dentro de este sistema; por ejemplo, el *Zeitgeber* puede actuar directamente sobre los ritmos biológicos sin depender de la acción del reloj, a través

de un mecanismo conocido como enmascaramiento (Golombek y Rosenstein, 2010). Este mecanismo permite realizar ajustes rápidos de la salida del sistema ante cambios ambientales repentinos o inesperados. A su vez, ciertos ritmos biológicos pueden actuar sobre el reloj biológico mediante un mecanismo llamado retroalimentación, modificando su funcionamiento y permitiendo un control fino y autorregulación de los mismos.

Organización anatómica

El reloj central que regula los ritmos circadianos en mamíferos se encuentra localizado en el cerebro en la región anterior del hipotálamo. Específicamente, se ubica en la base del tercer ventrículo, a cada uno de sus lados, sobre el quiasma óptico, en una región denominada núcleos supraquiasmáticos (NSQ; Figura 8). Estos núcleos poseen alrededor de 10.000 neuronas en ratón y 50.000 en humanos (Buhr y Takahashi, 2013). Los NSQ fueron propuestos como oscilador central de los ritmos circadianos por C. Richter en 1967, quien demostró que la ablación de los mismos provoca arritmicidad. Algunos años más tarde, F. Stephan y R. Moore por separado, el primero mediante lesiones de regiones hipotalámicas y el segundo mediante seguimiento de la señal retiniana, identificaron la región de los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo como un candidato a marcapasos central, ya que no sólo al ser lesionados producían arritmicidad sino que también recibían la señal lumínica proveniente de la retina (Moore y Eichler, 1972, Stephan y Zucker, 1972). Más tarde, Ralph y Lehman (1991) demostraron que mediante trasplantes de tejido hipotalámico conteniendo los NSQ a animales lesionados, los ritmos circadianos de los transplantados se restauraban mostrando las características de los ritmos del donante.

Pero los núcleos supraquiasmáticos no están solos: además de un oscilador central, este sistema cuenta con múltiples osciladores secundarios o periféricos. Existen osciladores secundarios localizados en la retina (Tosini y Menaker, 1996, Cassone y Natesan, 1997) y en órganos como pulmón e hígado (Yamazaki et al., 2000) que muestran oscilaciones diarias en la expresión de determinados genes. Por lo tanto, el sistema circadiano es jerárquico, habiendo un reloj dominante o central que a la vez envía y recibe señales de los distintos relojes secundarios.

Figura 8. Localización anatómica de los NSQ. Los NSQ se encuentran ubicados en el hipotálamo, justo encima del quiasma óptico. En la figura se observa una sección coronal de un cerebro de roedor conteniendo a los NSQ, marcados con cresyl-violeta. En la parte superior se muestra una tinción inmunocitoquímica para neuropéptido Y (NPY) donde, se puede apreciar marca positiva en los NSQ.



Mecanismos moleculares de oscilación

La base del tan preciso funcionamiento del reloj circadiano central es una oscilación molecular, compuesta por ciclos de transcripción y traducción que toman un tiempo cercano a 24 horas en completarse.

El reloj molecular se compone de tres sistemas de expresión genética acoplados: un elemento negativo, un elemento positivo y un sistema de genes controlados por el reloj que participan en la regulación de los ritmos celulares. Los elementos negativos y positivos están formados por los llamados “genes reloj” y sus productos proteicos, que generan un patrón de oscilación mediante su expresión cíclica. Esta oscilación se encuentra fuertemente regulada, tanto a nivel transcripcional como traduccional y post- traduccional (Dunlap, 1999, Okamura et al., 2002). El sistema básico de oscilación consta de un ciclo de retroalimentación negativa en el que un componente positivo promueve la síntesis de un componente negativo que, al acumularse, reprime su propia síntesis (Figura 9). Los elementos positivos son dos proteínas de la familia PAS (dominio de dimerización que permite la unión a otras proteínas con dominio PAS): CLOCK (del inglés *Circadian Locomotor Output Cycle Kaput*) y BMAL (del inglés *Brain and Muscle ARNT- Like protein*). Estas proteínas se dimerizan y pueden unirse a ADN, particularmente a un sitio de la región promotora llamado *E-box* que regula positivamente la transcripción génica de varios genes reloj. Entre los elementos cuya transcripción se encuentra regulada por el dímero CLOCK/BMAL se encuentran los genes *per*, *cry*, *ror*, *Rev-erb*, entre otros (Munoz et al., 2002). En mamíferos, existen tres genes *per* (*period*), denominados *per1*, *per2* y *per3*. Las proteínas PER1 y PER2 funcionan como elementos negativos del reloj e interactúan con los productos proteicos de los genes *cryptochrome* (*cry*), llamados CRY1 y CRY2. En el citoplasma, las proteínas PER y CRY se unen formando heterodímeros que pueden translocar al núcleo e interactuar con el dímero CLOCK/BMAL, inhibiendo de esta forma su propia transcripción.

Cuando se encuentran en forma de monómero en el citoplasma, varias de las proteínas reloj sufren modificaciones post-traduccionales, principalmente de fosforilación y ubiquitinización (Miyazaki et al., 2004). La fosforilación de las proteínas PER (PER1 y PER2) por la enzima CKI ϵ (caseína kinasa I épsilon) promueve su ubiquitinización y degradación vía el proteosoma.

Pero este ciclo principal no está solo en esta cruzada, existe otro ciclo transcripcional/traducciona l que sucede en paralelo y le aporta robustez. En este segundo ciclo, las proteínas REV-ERB α y ROR cuya transcripción también es regulada por el dímero CLOCK/BMAL, se unen al promotor de *Bmal* mediante un sitio llamado RORE (*retinoid acid-related orphan receptor*). Así, la unión de REV-ERB α al sitio RORE es capaz de reprimir la síntesis de *Bmal*, mientras que la unión de ROR promueve la transcripción

de este factor (Preitner et al., 2002, Ueda et al., 2002).

Esta interacción entre los ciclos de retroalimentación negativa y positiva hace que los componentes positivos se expresen en antifase con respecto a los componentes negativos, lo que se ve reflejado en un ritmo circadiano con máximos durante el día para *Cry*, *Per1*, 2 y 3 y con máximos durante la noche para *Bmal*. En mamíferos la expresión de *Clock* es constitutiva. A su vez, estos ciclos de transcripción/traducción regulan la expresión rítmica de muchísimos otros genes, conocidos como “genes regulados por el reloj” (CCGs, del inglés *clock-controlled genes*). Por ejemplo, se ha reportado que aproximadamente el 50% del genoma del ratón oscila de forma circadiana (Zhang et al., 2014).

Mecanismos similares de retroalimentación negativa fueron descriptos en otros organismos, tales como *Drosophila*, pez cebra y cianobacterias (Bell-Pedersen et al., 2005), aunque con distinto grado de complejidad. Por ejemplo, osciladores no-transcripcionales fueron descubiertos en el alga *Ostreococcus tauri* (O'Neill et al., 2011) y en glóbulos rojos humanos (O'Neill y Reddy, 2011), los cuales pueden generar oscilaciones circadianas en ausencia de transcripción.

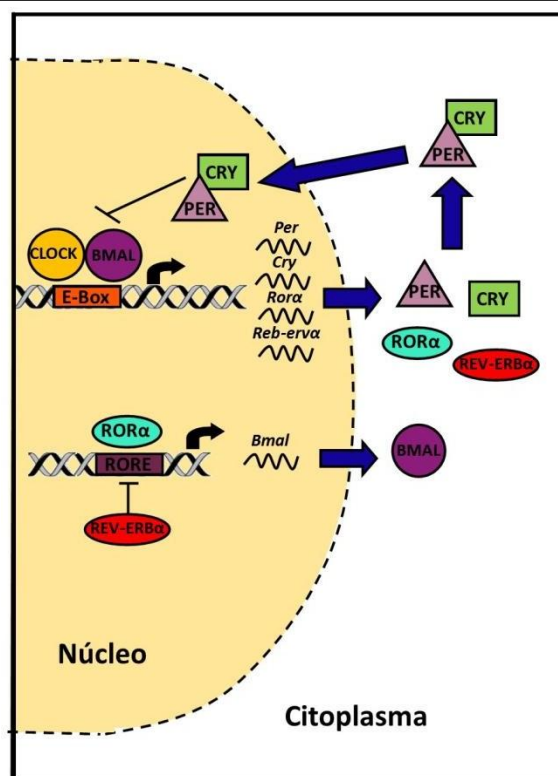


Figura 9. Esquema simplificado de las bases moleculares de la oscilación circadiana. Los elementos positivos CLOCK y BMAL, mediante la unión a sitios *E-box* en el DNA, activan la transcripción de una variedad de genes reloj. Entre ellos, *per* y *cry*, luego de su traducción se dimerizan en el citoplasma y se translocan al núcleo para inhibir su propia transcripción. REV-ERB α es el elemento negativo de un segundo ciclo, inhibiendo la transcripción de *Bmal*. La proteína ROR α , por su parte, activa la transcripción de *Bmal* en este segundo ciclo. REV-ERB α y ROR α actúan uniéndose a sitios RORE en el DNA.

Vías de entrada al reloj circadiano

El reloj circadiano puede ser sincronizado por un gran número de estímulos diferentes, incluyendo luz, temperatura, hábitos sociales, actividad, olores, etc. (Aschoff et al., 1982, Edgar y Dement, 1991, Mistlberger y Skene, 2004, Refinetti, 2010, Abraham et al., 2013). En la mayoría de los organismos, el sincronizador ambiental más poderoso es sin lugar a dudas el ciclo luz/oscuridad (Golombek y Rosenstein, 2010). La luz es percibida por el sistema circadiano a través de un sistema fotorreceptor especializado. En mamíferos, los fotorreceptores circadianos pertenecen a la familia de las opsinas, y se encuentran localizados en un grupo de células ganglionares en la retina del ojo. La principal opsina involucrada en la sincronización fótica es la melanopsina. Tanto las células ganglionares que contienen melanopsina como los fotorreceptores tradicionales (conos y bastones) contribuyen a la sincronización fótica (Doyle y Menaker, 2007). La luz actúa sobre el reloj a través de una vía monosináptica específica llamada tracto retinohipotalámico (TRH), un haz de fibras nerviosas localizado en el nervio óptico en mamíferos. En este proceso el principal neurotransmisor involucrado es el glutamato [Figura 10; Golombek y Rosenstein (2010)].

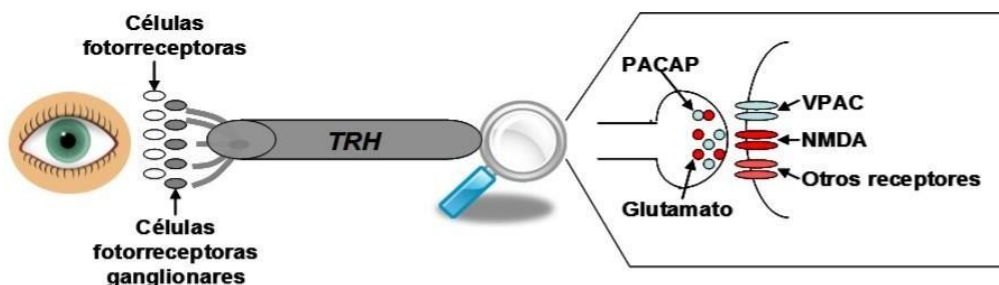


Figura 10. Representación del tracto retinohipotalámico (TRH). El TRH se origina en las células ganglionares de la retina y mediante neurotransmisores como el glutamato y el PACAP inerva la zona ventral de los NSQ. Modificado de Golombek y Rosenstein (2010).

Las vías de salida del reloj circadiano

Si el reloj central de los NSQ en mamíferos es el mayor responsable del mantenimiento de la función circadiana del organismo, cabe esperar que existan numerosas y variadas vías de salida de la información que produce. Se han descrito vías tanto humorales como neuronales. Los ritmos de actividad locomotora se controlan por vías humorales, ya que se han descrito factores liberados por los NSQ como por ejemplo TGF α (factor de crecimiento transformante alfa), PK2 (proquinecitina 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 (Kramer et al., 2001, Cheng et al., 2002, Kraves y Weitz, 2006).

Los experimentos de lesión y posterior trasplante de NSQ demostraron que el ritmo de actividad locomotora se recupera pero no ocurre lo mismo con algunos ritmos neuroendócrinos. Las eferencias de los NSQ culminan fundamentalmente en centros autonómicos (simpáticos o parasimpáticos) y neuroendócrinos en el hipotálamo, que controlan directa o indirectamente las oscilaciones en tejidos blanco. Brevemente, los NSQ controlan distintos ritmos hormonales mediante neuronas “endócrinas” (presentes en los núcleos paraventriculares y en el hipotálamo dorsomedial) y neuronas preautonómicas (en los núcleos paraventriculares y la medula espinal). Asimismo, la sensibilidad de los tejidos blanco a la información enviada vía neuronas endócrinas puede ser modificada mediante neuronas preautonómicas. De esta última clase neuronal existen células que se conectan con centros autonómicos simpáticos y otras con centros parasimpáticos, entre estos últimos el núcleo motor dorsal del nervio vago (Kalsbeek et al., 2006).

Por lo tanto, los NSQ pueden controlar ritmos fisiológicos diversos (entre ellos ritmos hormonales, pero también ritmos de otros tipos) que tienen fases completamente diferentes entre sí mediante señalización neuronal y humoral; comunicando a los osciladores periféricos presentes en el resto del organismo “la hora” del reloj central.

Un ritmo evidente y fácilmente medible: la actividad locomotora

Como se ha nombrado anteriormente, el ciclo actividad/reposo está finamente controlado por el reloj circadiano. Este comportamiento resulta muy sencillo de medir para su estudio y es muy poco invasivo para el sujeto experimental. Es por eso que desde el principio de la investigación de los ritmos circadianos se utilizó este comportamiento como variable de estudio.

La actividad locomotora en roedores puede medirse como actividad total - mediante la utilización de sensores infrarrojos - o como actividad en rueda. Cualquiera sea el método utilizado, la manera más fácil de visualizar la información resultante es mediante la

confección de un actograma. Este gráfico consta de un eje de ordenadas donde se representan los días sucesivos y un eje de abscisas donde se representa la hora del día, de 0 a 24. La actividad es representada por barras de color negro en el eje de las abscisas. La altura de cada barra vertical corresponde a la actividad acumulada en un intervalo mínimo de registro, como por ejemplo 5 minutos. La cantidad de actividad puede estar dada por el número de revoluciones de la rueda o por la cantidad de veces que el animal cruza un haz infrarojo (cuando lo que se registra es la actividad total del animal). Una manera aún más cómoda de visualizar los datos de actividad locomotora en un actograma es utilizando la forma doble de este tipo de gráfico. Esto se logra alineando el mismo actograma dos veces, de manera que dos días consecutivos queden graficados continuos en el eje de las abscisas, que ahora representa 48 horas (Figura 11).

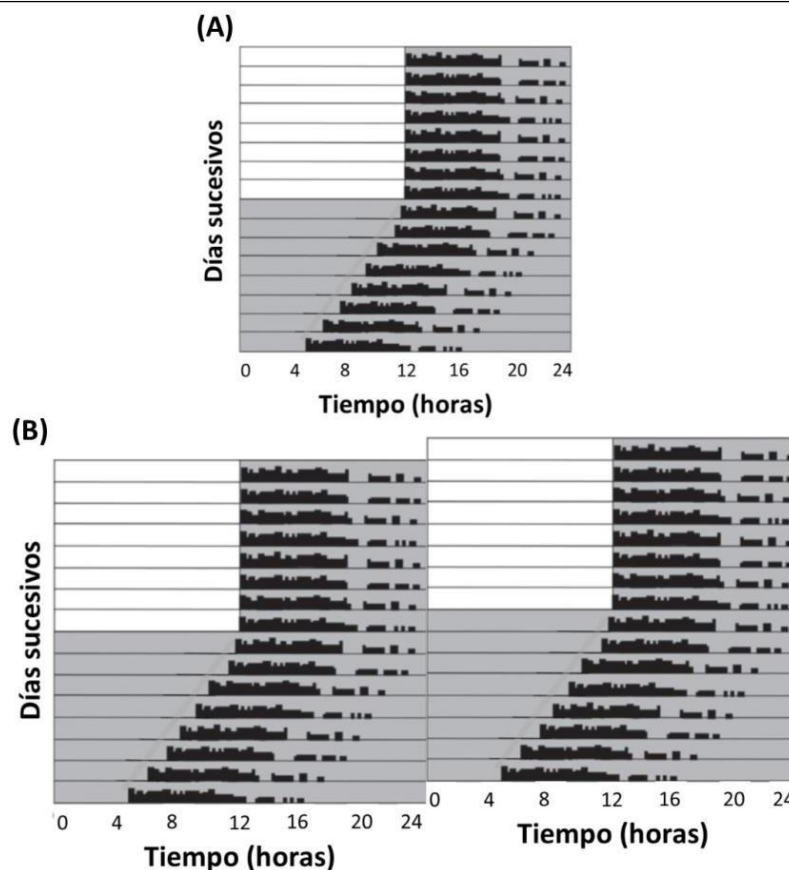


Figura 11. Construcción de un actograma. (A) Actograma de grafico simple. En el eje X se grafica la actividad a distintas horas del día y en el eje Y los días sucesivos. (B) Actograma de grafico doble (*double plot*). En este caso, se construye un actograma sencillo y luego se coloca a continuación una copia del mismo de manera que queden desfasados los días. Así, cuando termina el día 1, comienza el día 2 de registro. La región sombreada indica oscuridad.

Interacción entre el sistema circadiano y la estimación de intervalos cortos de tiempo

Luego de introducir conceptos teóricos acerca de los dos sistemas temporales en los cuales se basa esta tesis, llegó la hora de hablar de las evidencias que existen sobre la relación entre ellos. Cabe aclarar que la búsqueda del eslabón perdido entre el sistema circadiano y el de estimación de intervalos cortos de tiempo viene de larga data y que los aportes que se han hecho en el campo reúnen experimentos llevados a cabo en distintos modelos animales (incluyendo al humano) y con distintas aproximaciones, comportamentales y moleculares.

Algunas evidencias provenientes de trabajos realizados en humanos afirman que los ritmos circadianos modifican la percepción del tiempo (Pfaff, 1968, Morofushi et al., 2001). Además, pudo verse una variación circadiana en el desempeño o *performance* de producción temporal que correlaciona con otras variaciones circadianas como la temperatura corporal y los niveles de melatonina, sugiriendo que esta capacidad está influenciada por el oscilador circadiano (Kuriyama et al., 2005). Luego, un trabajo realizado en ratas logró demostrar que la estimación de tiempo en estos animales fluctuaba de manera circadiana (Shurtleff et al., 1990).

Varios trabajos demostraron que la estimación de tiempo se ve afectada en condiciones desafiantes para el sistema circadiano. Por ejemplo, Pati y Gupta en 1994 observaron que el desempeño en una tarea de estimación de tiempo varía entre trabajadores de turno fijo y trabajadores en turnos rotativos, en los cuales se registraron problemas circadianos (Pati y Gupta, 1994). En línea con esto último, se encontró que la privación de sueño disminuye la capacidad de estimar el tiempo de manera precisa (Soshi et al., 2010). Por otra parte, los estudios realizados en modelos animales con mutaciones circadianas presentan argumentos divididos frente a la hipótesis de una posible modulación circadiana de la estimación de intervalos cortos de tiempo. Por un lado, un trabajo realizado en *Drosophila* utilizando mutantes del gen reloj *per* demostraron que presentaban un déficit en estimación temporal (Kyriacou y Hall, 1980). Sin embargo, dos estudios realizados en ratones con mutaciones circadianas (el *knockout* de CLOCK y el *knockout* doble CRY1/CRY2) indicaron que estos animales no presentaban anomalías en sus desempeños frente a un test de estimación temporal (Cordes y Gallistel, 2008, Papachristos et al., 2011). Estas discrepancias se comentarán luego en la Discusión.

Capítulo1. Modulación circadiana de la estimación de intervalos cortos de tiempo en ratones

Introducción

El ratón y su caracterización circadiana

El ratón (*Mus musculus*) es un modelo comúnmente utilizado en el laboratorio para una gran variedad de temas de investigación. La elección de este modelo en Cronobiología se basa en el gran conocimiento de su sistema circadiano, debido a la predictibilidad de sus ritmos. Estos roedores son animales nocturnos, es decir, que se encuentran activos durante la noche. Cuando se encuentran sometidos a un ciclo de luz/oscuridad, todos sus ritmos (tanto los comportamentales como los moleculares) se sincronizan al ciclo ambiental (Challet et al., 2003). En la Figura 1.1 se puede ver su actividad locomotora graficada en un actograma doble. La actividad locomotora en rueda del animal comienza todos los días a la misma hora, es decir, se encuentra sincronizada al ciclo de luz/oscuridad y tiene un periodo de 24 horas. En condiciones de oscuridad constante, los ratones se encuentran en "libre curso", siendo su período endógeno menor a 24 horas (aproximadamente 23,5 horas). Esto hace que, en ausencia de un ciclo luz/oscuridad que actúe como sincronizador, los animales comiencen a correr en la rueda cada día más temprano. En condiciones constantes el animal mantiene sus ritmos según la hora que le indica su reloj biológico; podemos así hablar de día subjetivo (aquel momento en que el animal está en reposo) y noche subjetiva (cuando el animal se encuentra en actividad).

En condiciones de luz constante, los ratones muestran un patrón de actividad locomotora con un periodo mayor a 24 horas. Este periodo sufre un alargamiento progresivo a lo largo de los días y luego de alrededor de 20 días desemboca en una completa arritmicidad, presentando actividad fragmentada en cualquier momento del día [Figura 1.2; Moriya et al. (2000)]. Cabe aclarar que esta arritmicidad inducida por luz constante no solo se expresa en la actividad locomotora del animal sino que se da también a nivel molecular (Sudo et al., 2003).

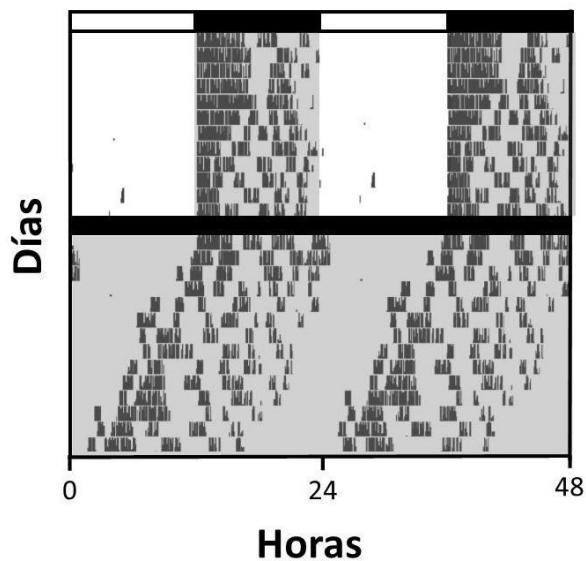


Figura 1.1 Actograma doble de la actividad locomotora en rueda de un ratón C57 en condiciones de luz/oscuridad (LO) y oscuridad constante (OO). Las barras superiores blancas y negras indican las condiciones de luz/oscuridad 12:12. La barra negra ubicada en la mitad del gráfico indica que desde ese momento la condición es de OO. En LO el ratón comienza su actividad todos los días a la misma hora coincidiendo con el comienzo de la fase de oscuridad. En OO el ratón comienza su actividad cada vez más temprano en los días sucesivos, dado que su periodo es menor a 24 hs.

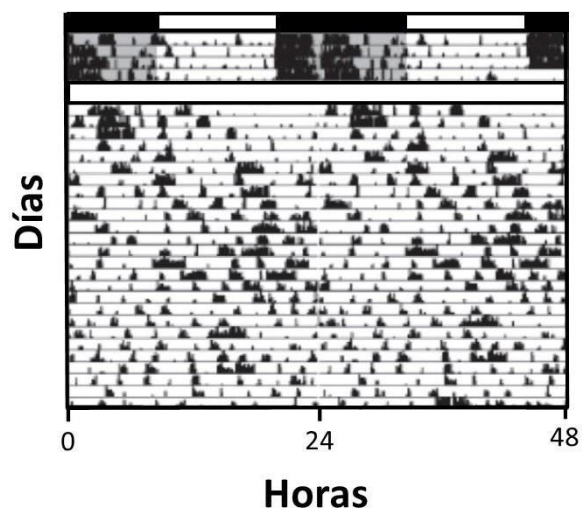


Figura 1.2 Actograma doble de la actividad locomotora en rueda de un ratón C57 en condiciones de luz constante (LL). Las barras superiores blancas y negras indican las condiciones de luz/oscuridad 12:12. La barra blanca indica que desde ese momento la condición fue LL. En LL el ratón comienza su actividad cada día más tarde en los días sucesivos hasta que luego de aproximadamente veinte días se torna arrítmico.

Otro comportamiento que está bien caracterizado en ratones es su respuesta a un cambio abrupto en el esquema de iluminación, el mismo se llama comúnmente *jet-lag* simulado y puede ser por avance o por retraso de fase. Un cambio abrupto del esquema de luz deja a los ratones en una situación transitoria de desincronización, ya que su horario interno no se corresponde con el horario que marca el *Zeitgeber* (Salgado- Delgado et al., 2008, Casiraghi et al., 2012). El reloj interno puede reacomodarse y ponerse en fase con el sincronizador externo, sin embargo esto le lleva un tiempo (denominado “transiente”). Sin embargo, no es lo mismo para el sistema resincronizarse a un adelanto de fase que a un retraso, y eso se debe a que estos dos procesos utilizan distintas estrategias (incluyendo distintas vías de señalización y activación de genes reloj) para alcanzar al *Zeitgeber* y ponerse en fase con éste (Reddy et al., 2002). No vamos a ahondar en detalles en esta tesis, pero sí vale la pena aclarar que para el reloj interno es mucho más complicado afrontar un *jet-lag* por adelanto que por retraso. El transiente en la resincronización a un adelanto de fase de 6 horas, por ejemplo, suele tomar entre 5 y 7 días (Figura 1.3). En cambio, la resincronización frente a un *jet-lag* por retraso de 8 horas es mucho más corta, en ratones toma entre 4 y 5 días (Reddy et al., 2002, Kiessling et al., 2010).

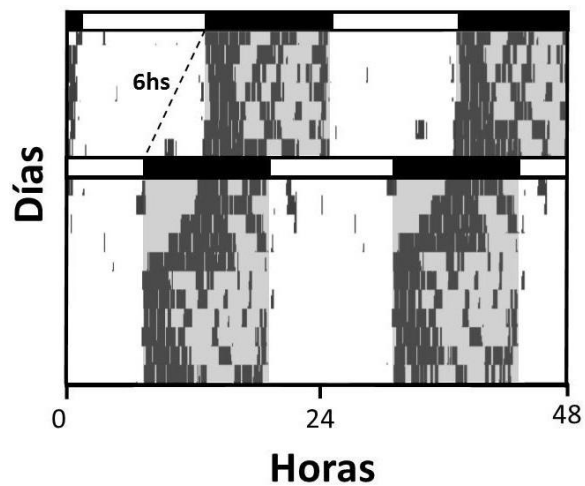


Figura 1.3. Actograma doble de la actividad locomotora en rueda de un ratón C57 con un adelanto de fase de 6 horas en el ciclo de LO. Las barras superiores blancas y negras indican las condiciones de luz/oscuridad 12:12. La barra ubicada en la mitad del gráfico indica el nuevo ciclo de LO 12:12 adelantado 6 hs respecto del anterior. En LO el ratón comienza su actividad todos los días a la misma hora, coincidiendo con el comienzo de la fase de oscuridad. Luego del adelanto de fase, el ratón comienza su actividad cada vez más temprano en los días sucesivos hasta sincronizarse con el nuevo ciclo. Se observa un transiente de cinco días.

Objetivos

Objetivo general

Determinar si la estimación de tiempo en ratones se encuentra sujeta al control del sistema circadiano.

Objetivos particulares.

- Evaluar si la estimación de intervalos cortos de tiempo presenta una fluctuación a lo largo del día.
- Determinar si la estimación de intervalos cortos de tiempo presenta una variación en condiciones de oscuridad constante, condición en la cual los ritmos circadianos expresan su período de libre curso.
- Estudiar si la estimación de tiempo se ve afectada en condiciones de luz constante, las cuales causan arritmicidad circadiana en ratones.
- Evaluar si la estimación del tiempo es afectada por un cambio abrupto en el esquema de iluminación, el cual produce la desincronización transitoria de los ritmos circadianos.
- Estudiar los niveles de ansiedad y memoria, y hacer un diagnóstico de la visión de los animales en luz constante, a fin de verificar que su estado no esté interfiriendo en la tarea de estimación temporal.

Materiales y Métodos

Animales.

Se utilizaron ratones machos C57/BL6 de 4-6 meses de edad, de origen comercial (provenientes del Bioterio Central de la Universidad Nacional de La Plata) y mantenidos en el Bioterio de la Universidad Nacional de Quilmes. Los animales fueron puestos bajo un fotoperíodo de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de oscuridad (llamado LO, por luz/oscuridad), ocurriendo el encendido de las luces a las 8 AM. Las condiciones de temperatura fueron constantes ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y los animales tuvieron libre acceso a agua y comida (alimento balanceado), salvo durante algunos protocolos comportamentales en los que el acceso a la comida fue restringido con el fin de mantenerlos al 90% de su peso original (especificado en cada protocolo). En condiciones de LO se utilizó como referencia la hora de apagado de las luces, denominada por convención hora del sincronizador o *Zeitgeber* (*Zeitgeber time*) 12 (ZT 12).

En condiciones de oscuridad constante (OO, por oscuridad/oscuridad) 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). Para la manipulación de animales bajo un régimen de oscuridad constante se utilizó una fuente de luz roja tenue (<5 lux) para su manipulación, la cual no posee efectos sobre la sincronización de los mismos.

En condiciones de luz constante (LL, por luz/luz), la intensidad de luz utilizada fue de 100 lux (medición realizada al nivel de las jaulas).

Registro de actividad locomotora.

Los animales fueron ubicados en jaulas individuales de acero inoxidable provistas con una rueda de 15 cm de diámetro. Cada rueda contiene un imán que es detectado por un sensor magnético cada vez que gira (un evento por vuelta). La actividad locomotora fue registrada mediante el sistema de adquisición de datos Archon versión 2.1, diseñado en el laboratorio de Cronobiología de la Universidad Nacional de Quilmes. Los datos obtenidos fueron almacenados en una computadora PC.

Protocolo de estimación de intervalos cortos de tiempo.

Equipo de entrenamiento:

El equipo de entrenamiento y registro de estimación del tiempo para ratones (Figura 1.4) fue íntegramente diseñado en el Laboratorio de Cronobiología de la Universidad Nacional de Quilmes. Se

emplearon jaulas plásticas (dimensiones internas: 30 cm x 22 cm x 14 cm) con techo enrejado. Cada jaula se encuentra acondicionada con una palanca retráctil, un *led* de luz blanca, y un bebedero conectado a una bomba peristáltica para proporcionar la recompensa. La palanca retráctil se sitúa a 3 cm del suelo, en la misma pared que el bebedero. El *led* de luz blanca se encuentra en el extremo superior derecho de la jaula. La recompensa utilizada fue sacarosa al 5% en agua.

Las jaulas de entrenamiento están ubicadas en un cuarto aislado, provisto de un generador de ruido constante para atenuar sonidos externos.

Los datos comportamentales fueron registrados en una PC. Para llevar a cabo el procedimiento experimental y la recopilación de los datos de estimación del tiempo, se utilizó un programa de informática específicamente diseñado por el Laboratorio de Cronobiología y programado por el Lic. Natanael Olaiz. El mismo permitió modificar los valores de diversos parámetros para alcanzar las condiciones necesarias para las distintas fases de entrenamiento (duración de la sesión, cantidad de recompensa ofrecida, encendido y apagado de la luz, etc.).

Procedimiento.

Se utilizó el protocolo de entrenamiento llamado Intervalo al Pico (del inglés, *Peak Interval procedure*), previamente descrito (Cheng y Meck, 2007; Drew et al., 2007). Este protocolo consistió en el entrenamiento de los animales en cuatro fases consecutivas (Figura 1.4). En las fases I y II se utilizó condicionamiento operante, en el cual los animales aprenden la asociación trabajo-recompensa, en ambas fases cada presión de la palanca recibe una recompensa. La diferencia entre las fases I y II reside en que en la fase I, cada 20 recompensas recibidas la palanca se retrae y da lugar a un intervalo entre ensayos (*inter-trial interval*, *IT*) variable (de entre 10 y 110 segundos); mientras que en la fase II esto pasa cada dos recompensas obtenidas. En la fase III, se utilizó un tipo de prueba llamado intervalo fijo (*fixed interval training*) en el cual se introduce un criterio temporal al ensayo. En este caso se utilizaron 24 segundos como criterio temporal, señalizados por la aparición de la palanca y el encendido de una señal lumínica. En los ensayos de intervalo fijo, la presión de la palanca sólo tuvo recompensa si fue ejecutada luego del intervalo *target* (24s). Por último, en la fase IV se agregó un tipo de ensayo llamado intervalo al pico (*peak interval*), en el cual la presión de la palanca no es recompensada en ningún momento y la señal lumínica permanece

encendida y la palanca extendida por 96 segundos (el cuádruple del tiempo *target*). Este tipo de ensayos (llamados de prueba o *probe trials*) se presentan intercalados con los ensayos de intervalo fijo en una relación 50%-50%, con la única restricción de que no sean presentados cinco intervalos de prueba consecutivos. Una vez que el animal aprendió la tarea, el análisis de los ensayos de prueba genera una respuesta que puede ajustarse a una curva de tipo Gaussiana cuyo pico coincide con el intervalo a estimar.

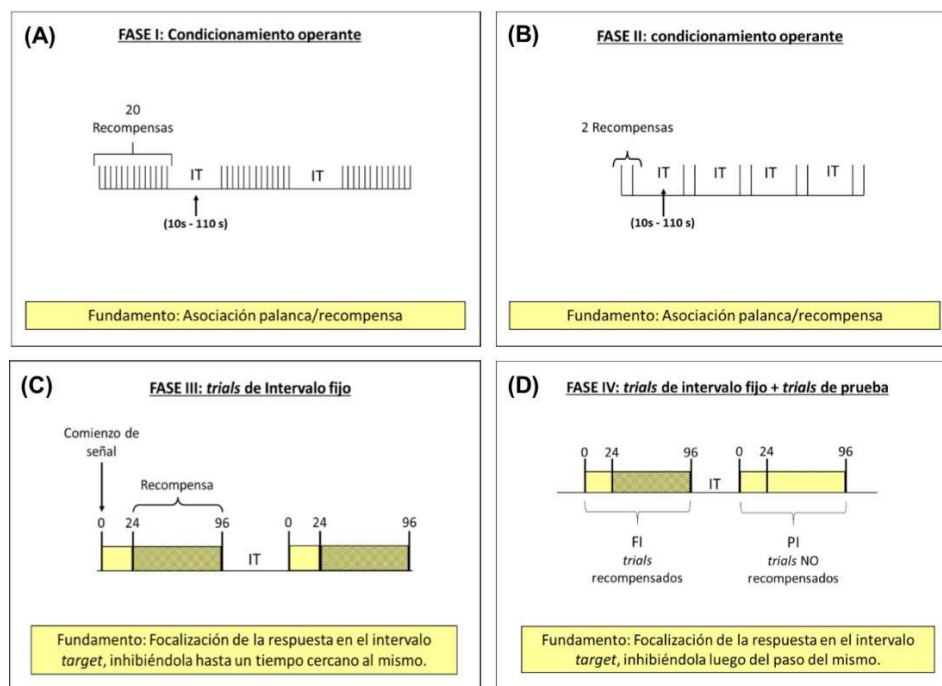


Figura 1.4. Esquema de las fases del protocolo de estimación de tiempo utilizado (*Peak interval protocol*). (A) La fase I consta de un condicionamiento operante simple, donde cada 20 recompensas obtenidas se da lugar a un intervalo entre ensayos (IT), (B) en la fase II el IT se da cada dos recompensas obtenidas. En la fase III (C) se incorpora el criterio temporal (24 seg) y las presiones son recompensadas sólo si son realizadas después de pasado el tiempo *target*. De esta forma, el animal acota su respuesta en un intervalo de tiempo corto cercano al intervalo *target*. En la fase IV (D) se incorporan los ensayos o *trials* de prueba, los cuales no son recompensados. De esta manera, el animal aumenta su respuesta cerca del intervalo pero al no ser recompensada la disminuye paulatinamente una vez pasado el intervalo a estimar.

En todos los casos se realizó una sesión diaria de entrenamiento durante 5 días a la semana (los animales no recibieron entrenamiento durante los fines de semana).

Al menos una semana antes de comenzar con la fase I de entrenamiento, los animales fueron pesados y puestos bajo un régimen de restricción calórica, lo cual los mantuvo entre el 85% y el 90% de su peso original durante todo el protocolo de entrenamiento.

Grupos experimentales en el protocolo de estimación de intervalos cortos de tiempo

Diferencias día-noche en la estimación de intervalos cortos de tiempo

Los animales fueron divididos en dos grupos ($n=8/\text{grupo}$), los cuales fueron mantenidos bajo un régimen de LO de 12:12. Para el grupo entrenado durante su fase de luz, el encendido de la misma fue a las 8 AM y para los entrenados durante su fase de oscuridad, a las 8 PM (ciclo de luz invertida). De esta manera, ambos grupos pudieron ser entrenados al mismo tiempo. El horario de los animales entrenados durante su fase de luz fue ZT 5-8 (mitad del día) y el de los ratones entrenados durante la fase de oscuridad fue ZT 16-19 (mitad de la noche). Luego de la sesión 25 de la fase IV de entrenamiento, estos animales fueron sometidos a condiciones de oscuridad constante y siguieron siendo entrenados y testeados en esta fase durante 24 sesiones más.

Estimación de intervalos cortos de tiempo en condiciones de luz constante.

Se utilizaron dos grupos de ratones ($n=8/\text{grupo}$), uno de los cuales fue mantenido bajo un ciclo LO 12:12, y el otro bajo condiciones de luz constante (LL). El grupo mantenido en LL fue expuesto a estas condiciones aproximadamente 20 días antes del comienzo del ensayo, con el objeto de inducir arritmicidad circadiana en los ratones. La disrupción de los ritmos circadianos en la actividad locomotora fue verificada por medio de actogramas registrados en los días previos al comienzo del protocolo de estimación del tiempo. El grupo en LO fue entrenado durante su fase de oscuridad (ZT 16-19), mientras que el grupo en LL fue entrenado a la misma hora reloj que el grupo LO al largo de las cuatro fases del protocolo de estimación del tiempo.

Estimación de intervalos cortos de tiempo luego de un *jet-lag* simulado.

Un grupo de animales fue entrenado bajo condiciones de LO (en su fase de luz, con el encendido de la misma a las 8 AM) hasta la sesión número 28 de la fase IV del protocolo de estimación de tiempo. Luego de dicha sesión, se practicó un avance de 6 horas en su ciclo de luz/oscuridad. El horario de entrenamiento se mantuvo luego del adelanto del ciclo LO, tal como se indica en la figura 1.5. Los animales fueron entrenados y evaluados durante 20 sesiones

posteriores al *jet-lag*. La actividad locomotora fue registrada con el fin de seguir el proceso de resincronización al nuevo ciclo de luz/oscuridad de los animales.

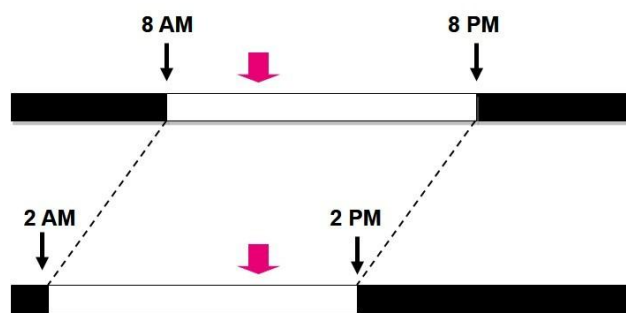


Figura 1.5. Esquema de luz/oscuridad previo y posterior al *jet-lag* por avance. La hora reloj del entrenamiento (indicado por la flecha) se mantuvo luego del adelanto del ciclo LO.

Análisis de datos del protocolo de estimación del tiempo

Análisis de los datos promedio

En las fases I y II se analizó la cantidad de presiones de la palanca en condicionamiento operante para ambos grupos, con el objeto de observar si hubo diferencias en la adquisición del comportamiento entre los grupos de ratones. En las fases III y IV del protocolo, se calculó la tasa de respuesta de cada animal en cada sesión de la siguiente forma: Tasa de respuesta (respuestas / minuto) = $\# \text{ presiones de la palanca} \times 60 / \# \text{ trials o ensayos de la sesión}$. El $\#$ de presiones de la palanca fue calculado a partir de histogramas con una ventana temporal de 1 segundo. De esta forma, se obtuvo la tasa de respuesta entre 0 y 24 segundos para los ensayos de intervalo fijo y entre 0 y 96 segundos para los ensayos de prueba. Luego, los datos de tasa de respuesta fueron normalizados al valor máximo, obteniendo de esta forma una tasa de respuesta normalizada cuyos valores varían entre 0 y 1. Por otro lado, los datos de las últimas sesiones de los ensayos de prueba (cuando los animales aprendieron la tarea) se ajustaron a una curva de tipo Gaussiana con pendiente utilizando el algoritmo de Levenberg-Marquardt (Marquardt, 1963). Este algoritmo optimiza los parámetros de una ecuación particular con el fin de obtener el mejor ajuste de los datos, y ha sido ampliamente utilizado para el ajustar funciones de PI

[*peak interval training*, ver (Cheng y Meck, 2007)]. La ecuación utilizada fue la siguiente:

$$R(t) = a \times \exp(-0.5 \times \left[\frac{t - t_0}{b}\right]^2) + c \times (t - t_0) + d$$

Donde $R(t)$ es el número medio de respuestas en un tiempo t , y los parámetros a , b , c , d y t_0 corresponden a: a y d : amplitud del ajuste; b : ancho del ajuste; c : inclinación de la base o pendiente y t_0 : posición del pico.

A partir de este ajuste, se pueden determinar tres parámetros que permiten caracterizar la exactitud y la precisión de la estimación temporal: la posición del pico (en inglés conocido como *peak time* o *peak location*), la amplitud del pico (*peak height* o *peak rate*), y el ancho del pico (*peak width* o *peak spread*). La ecuación con pendiente es utilizada con el fin de no considerar dentro del comportamiento evaluado el aumento en la presiones que comúnmente se registra durante los últimos segundos de los ensayos o *trials* de prueba, el cual tiene una base motivacional y se corresponde con la espera del próximo *trial*.

Además, se analizaron también los índices S1 y S2, los cuales corresponden a la relación entre la tasa de presiones promedio en momentos cercanos al intervalo *target* en comparación con la primer o segunda parte del *trial* respectivamente (Figura 1.6). Estos parámetros están asociados con el comienzo y la finalización del comportamiento. El índice S1 abarca la porción ascendente de la curva Gaussiana, la cual indica la adquisición del comienzo de la respuesta previo al intervalo *target*, mientras que el índice S2 abarca la porción descendente que denota la adquisición de la finalización de la respuesta un tiempo después del intervalo *target*. El índice S1 es calculado en las fases III y IV, mientras que el índice S2 se calcula solo para los datos de los ensayos de prueba en la fase IV. El índice S1 se obtuvo haciendo la relación entre la tasa de respuesta en los 3 segundos previos al intervalo a estimar sobre la tasa de respuesta total previa a dicho intervalo (de 0 a 24 segundos). Por otro lado, el índice S2 se calculó mediante la relación de la tasa de respuesta en los 3 segundos posteriores al intervalo a estimar sobre la tasa de respuesta total posterior a dicho intervalo (de 24 a 96 segundos).

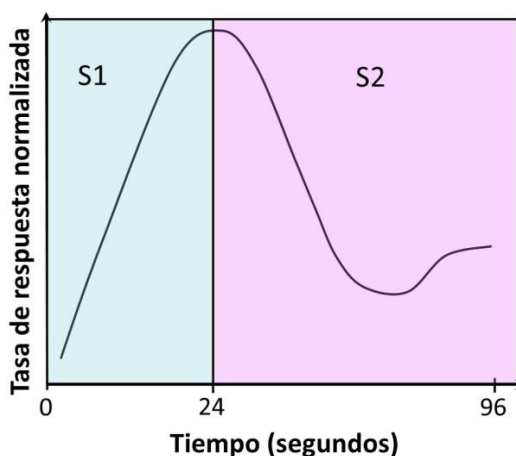


Figura 1.6. Esquema representativo de los índices S1 y S2. El índice S1 abarca la porción ascendente de la curva Gaussiana (adquisición del comienzo de la respuesta, de 0 a 24 segundos), mientras que el índice S2 abarca la porción descendente de la misma (adquisición de la finalización de la respuesta, de 24 a 96 segundos). Cuanto mayor es el valor de estos índices, mejor es el desempeño en la tarea de estimar un intervalo de tiempo.

Análisis de *trials* individuales (*trial por trial*)

Se analizaron los datos de las presiones realizadas durante los *trial* de prueba (PI) de las últimas cuatro sesiones para cada animal individualmente. Se realizó un histograma de presiones para cada *trial* utilizando un rango de 1 segundo. A partir de cada histograma se detectaron las zonas de respuesta baja-alta-baja y a partir de allí se definieron dos parámetros: el “comienzo” y el “final” de la fase de respuesta alta. El comienzo de la respuesta se definió como el momento en que la respuesta tuvo un incremento abrupto que superó el 70% de la respuesta máxima. Por otro lado, el final de la respuesta, se definió como el momento del ensayo donde la respuesta tuvo un decremento abrupto al 70% de la respuesta máxima. Esto es posible de calcular solo en los *trials* que presentan un formato de respuesta baja- alta-baja a lo largo del tiempo y en los que el momento de alta respuesta comience antes del intervalo *target* (Figura 1.7). Por consiguiente, todos los *trials* que no poseían este formato de respuesta no pudieron ser utilizados para este tipo de análisis y fueron descartados (Church et al., 1994, Gallistel et al., 2004, Matell et al., 2006). A partir de estos parámetros se calcularon otros dos: la ubicación del pico y la distribución de la respuesta. La ubicación del pico se calcula como el punto medio entre el momento de final y el comienzo de respuesta ($[(\text{final}-\text{comienzo})/2]$). Este parámetro muestra el punto medio en la zona de máxima respuesta que representa el momento esperado de recompensa y que idealmente se ubica cercano al intervalo *target*. Por otro lado, la distribución de la respuesta se calcula restando el momento de final de la respuesta y el principio de respuesta (final-comienzo), y da una idea de la persistencia del comportamiento y de cuán aguda es la respuesta del animal cercana al intervalo a estimar.

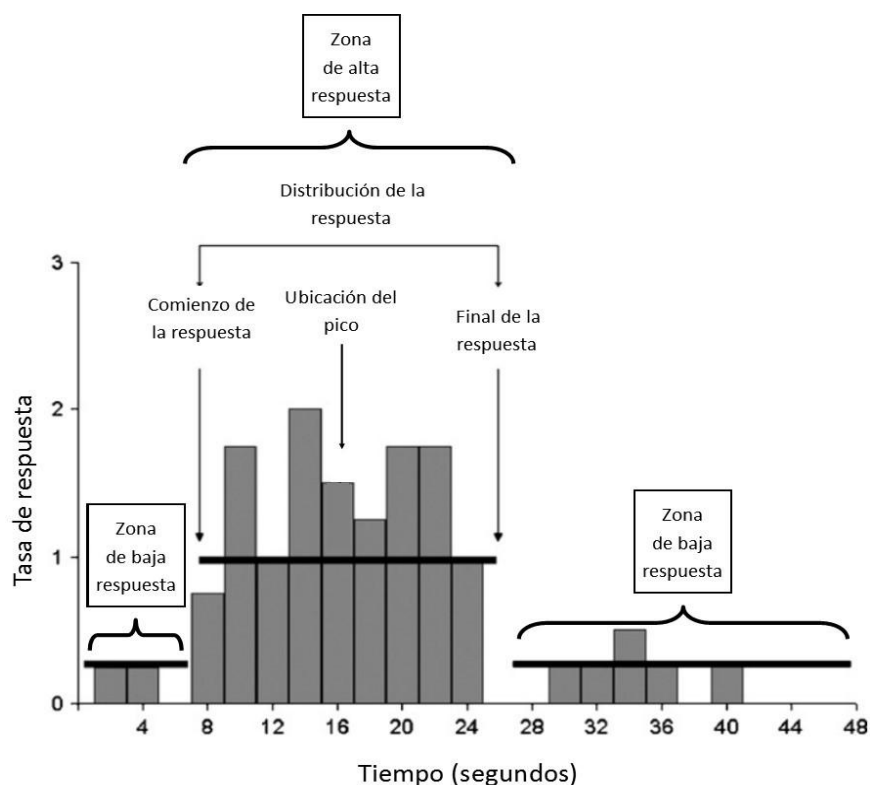


Figura 1.7. Análisis de trial portrial. Ejemplo de un histograma realizado con las presiones de un único ensayo de PI de fase IV de la última sesión utilizando una ventana de 2 segundos, en este caso utilizando como intervalo *target* 16 seg. Se distinguen tres zonas en la tasa de respuesta, una de baja respuesta al comienzo, seguida de una de alta respuesta cercana al intervalo *target* y luego una de baja respuesta al final del *trial*. De la zona de alta respuesta se identifican el comienzo y el final de la misma, los cuales se corresponden con el comienzo y el final de la fase de alta respuesta. Luego se calcula el punto medio para esos dos puntos y ése se toma como la ubicación del pico, siendo éste el momento esperado de recompensa. La distribución se calcula como la diferencia entre el comienzo y el final, y refleja la duración de la zona de alta respuesta. Modificado de Taylor et al. (2007).

Electroretinogramas

Con el objetivo de determinar si la exposición de los ratones a condiciones de luz constante producía daño en la retina, se les realizó un electroretinograma escotópico siguiendo el protocolo descrito por Moreno et al. (2005) y Sande et al. (2008). Brevemente, los animales recibieron 6 horas de adaptación en oscuridad antes del experimento. Luego, bajo condiciones de luz rojatenue, los ratones fueron anestesiados mediante inyección i.p. de ketamina/xilazina (150/10

mg/kg). Para inducir dilatación pupilar se utilizó una solución de fenilefrina 2.5% y tropicamida 1% (Laboratorios Alcon, Argentina). La córnea fue hidratada intermitentemente con solución salina balanceada (Laboratorios Alcon, Argentina). Todos los registros se realizaron dentro de los 20 min seguidos a la inducción de la anestesia. Los electrorretinogramas (ERGs) de ambos ojos se registraron simultáneamente y en completa oscuridad. Para ello, se aplicaron 10 pulsos de luz blanca sin atenuación (5 ms, 0,2 Hz) generados por un estimulador fótico de diodos aplicados con una intensidad máxima de $9 \text{ cd} \times \text{seg}/\text{m}^2$. Los registros se amplificaron utilizando un equipo Akonic BIO-PC (Akonic, Argentina). La señal se registró con una ganancia de 100V, sin atenuación, con filtros de ruido (50 Hz) y filtros de alta (1000 Hz) y baja frecuencia (1,5 Hz) para optimizar el registro. Se determinó la amplitud de la onda-a (*a-wave*) como la diferencia en amplitud entre la subida y la caída de la onda-a, y la amplitud de la onda-b (*b-wave*) como la diferencia entre la caída de la onda-a y el pico de la onda-b (para más detalles, ver Sande et al., 2008). La respuesta electrorretinográfica se obtuvo como el promedio de los valores de cada corrida. Se realizaron tres estímulos, con un intervalo de 5 minutos cada uno.

Test de ansiedad.

Con el objetivo de determinar si los animales en luz constante (LL) tenían problemas de ansiedad, se realizaron los tests de laberinto en cruz elevado y locomoción en campo abierto.

Laberinto en cruz elevado

El mismo consta de un laberinto en cruz, el cual se compone de dos brazos abiertos de 50 x 10 cm opuestos a dos brazos cerrados de 50 x 10 x 40 cm, y se encuentra elevado 50 cm por encima del suelo.

El estado de ansiedad que presenta un individuo se refleja en la cantidad de tiempo que permanece en cada tipo de rama. Un animal que permanece la mayoría del tiempo en las ramas abiertas y que posee una gran proporción de entradas y salidas de las ramas, se encuentra poco ansioso, ya que presenta conducta exploratoria (Pellow y File, 1986). En cambio, los animales con alto grado de ansiedad se mantienen en las ramas cerradas, con escasa conducta exploratoria y pueden presentar conductas como *freezing* (inmovilización) y defecación en las ramas abiertas (Walf y Frye, 2007).

Los animales fueron testeados colocándolos en la intersección de los 4 brazos. El ensayo se realizó en oscuridad en presencia de luz roja tenue (<5 lux). Cada animal fue evaluado en el laberinto durante 5 minutos. Se registró el número de entradas en brazos abiertos y cerrados (índice de locomoción) así como el tiempo de permanencia en cada brazo (índice de ansiedad).

Locomoción en campo abierto

El equipamiento para el test consta de una caja de Plexiglas de 64 cm x 64 cm x 16 cm. La misma posee 16 cuadrados marcados en el piso. El animal fue colocado en el comienzo del ensayo en el centro de la caja. El ensayo constó de una única sesión de 15 minutos, donde se filmó a los animales con una cámara colocada sobre la caja. La iluminación del cuarto utilizada fue una luz tenue menos a 5 lux.

Se midieron parámetros como la locomoción total en el tiempo del test, la locomoción en el centro del campo (una superficie de 25 cm X 25 cm en el centro de la caja) y la locomoción del animal en la periferia de la caja (espacio restante fuera de la superficie definida como centro). Un mayor tiempo de permanencia en la periferia indica un mayor nivel de ansiedad (Thompson et al., 2015).

La cuantificación se realizó utilizando el software Any Maze (Stoelting, USA).

Los grupos testeados se encontraban en LO 12:12 y LL. Los ratones en LO fueron testeados durante el día, y el grupo LL se testó a la misma hora que los LO.

Memoria: Test de reconocimiento de objetos.

Esta prueba se fundamenta en la tendencia natural de los ratones a explorar nuevos objetos y ambientes y compararlos con otros que les son familiares. El protocolo fue realizado sobre dos grupos de ratones, uno de ellos bajo un ciclo LO 12:12 y el otro en condiciones de luz constante ($n=9/\text{grupo}$). En una primera fase de habituación, se colocó al animal en el campo abierto sin ningún objeto y se dejó transcurrir 20 minutos con el fin de que se familiarizara con el entorno. La habituación se realizó durante dos días consecutivos. En el tercer día tuvo lugar la fase de familiarización, en la cual se colocó al ratón en el campo abierto con dos objetos idénticos durante 10 minutos. Luego, 6 horas después de la familiarización, se testó la memoria a corto plazo, registrando durante 8 minutos la exploración que presentó cada animal a un objeto novedoso que reemplazó a uno de los familiares (aleatorizando el cambio por el objeto A o B en el 50% de las veces). Por otro lado, se testó la memoria a largo plazo, registrando la exploración al objeto novedoso pasados 4 días desde el proceso de familiarización. Los animales fueron filmados durante la tarea para facilitar la cuantificación. El criterio utilizado para cuantificar las aproximaciones del animal a cada objeto fue que se acercara con la nariz o extremidades delanteras a menos de 2 cm del objeto. Los resultados fueron representados como porcentaje de exploración del objeto nuevo, el cual se calculó como la relación entre el tiempo de exploración del objeto novedoso sobre el tiempo de exploración total (exploración de ambos objetos):

$$[\text{Exploración de objeto novedoso} / (\text{Exploración de objeto familiar} + \text{Exploración de objeto novedoso})] \times 10$$
 (Drew et al., 2007).

Estadística

En todos los casos se chequeó la normalidad de los datos con el test de Shapiro-Wilk. En caso en que los datos fueron normales se procedió a utilizar tests estadísticos paramétricos. Se utilizaron pruebas de ANOVA de dos vías con medidas repetidas (diseño mixto) para analizar datos paramétricos en dos grupos distintos a lo largo de las sesiones. Se utilizó el test de ANOVA de una vía para el análisis de los parámetros analizados en tres o más grupos. En el caso de la comparación de una variable entre dos grupos, se utilizó el test de Student (t-test) a dos colas.

Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Resultados

Ritmo diario en la estimación de intervalos cortos de tiempo.

Son varias las funciones cognitivas que poseen ritmos a lo largo del día (Eckel-Mahan y Storm, 2009, Gritton et al., 2012). Como se definió anteriormente, la estimación de intervalos cortos de tiempo es una función compleja que depende de otras funciones cognitivas, como por ejemplo la memoria de trabajo y la de largo plazo.

Con el objeto de evaluar si la estimación de intervalos cortos de tiempo varía según el momento del día en que se lleve a cabo, la misma fue testeada mediante el protocolo PI en ratones bajo un ciclo normal de luz/oscuridad 12:12, en su fase diurna (ZT 4-6) o en su fase nocturna (ZT 15-17).

Durante las fases I y II de entrenamiento, donde el paradigma evaluado fue la adquisición de la relación trabajo-recompensa, los grupos no presentaron diferencias significativas en el número de respuestas (Figura 1.8 A, fase I: $p=0,4733$, Figura 1.8 C fase II: $p=0,6972$, t-test a dos colas, $n=8$) ni en la velocidad de adquisición de la respuesta (Figura 1.8 B, fase I: $p=0,3065$ para el factor grupos, $p=0,8468$ para el factor sesiones; Figura 1.8 D, fase II: $p=0,9281$ para el factor grupos, $p=0,0583$ para el factor sesiones; ANOVA de dos vías de medidas repetidas; $n=8$ /grupo).

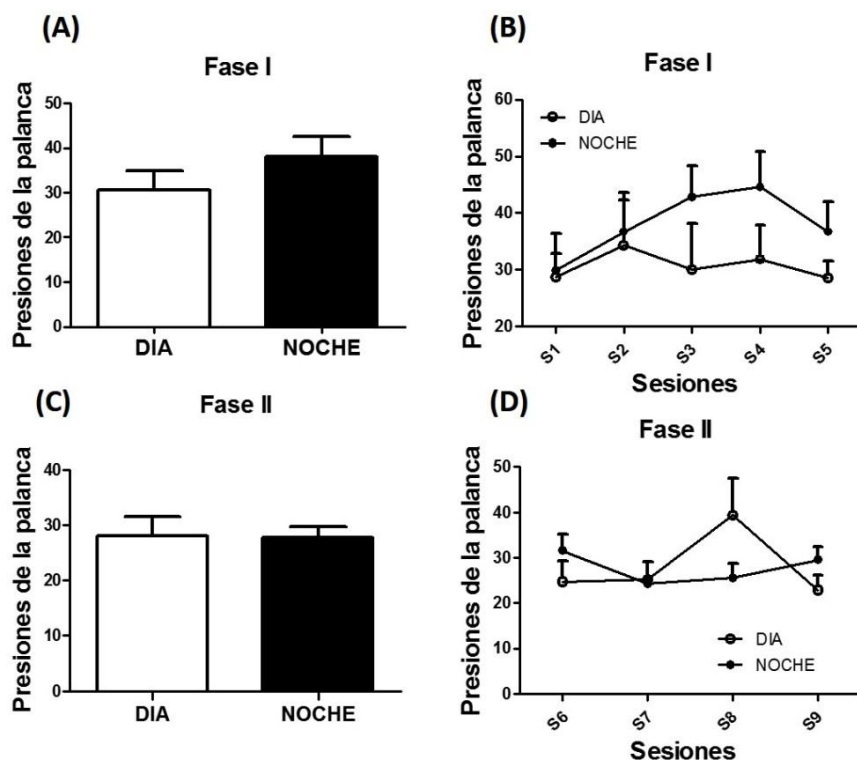


Figura 1.8. Fases I y II en los grupos día vs. noche. (A) Promedio de las presiones de palanca realizadas en las cinco sesiones de fase I para los grupos: día (barra blanca) y noche (barra negra). $p=0,4733$, t-test a dos colas, $n=8/\text{grupo}$. (B) Evolución del promedio de presiones a través de las cinco sesiones de fase I para los grupos: día (círculos blancos) y noche (círculos negros). $p=0,3065$ para el factor grupos, $p=0,8468$ para el factor sesiones, ANOVA de dos vías de medidas repetidas, $n=8/\text{grupo}$. (C) Promedio de las presiones de palanca realizadas en las cinco sesiones de fase II para los grupos: día (barra blanca) y noche (barra negra). $p=0,6972$, t-test a dos colas, $n=8/\text{grupo}$. (D) Evolución del promedio de presiones a través de las cinco sesiones de fase II para los grupos: día (círculos blancos) y noche (círculos negros). $p=0,9281$ para el factor grupos, $p=0,0583$ para el factor sesiones, ANOVA de dos vías de medidas repetidas, $n=8/\text{grupo}$). Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

En la fase III del protocolo de entrenamiento se incorporó el criterio temporal de 24 segundos, que debió ser respetado previo a presionar la palanca para recibir la recompensa. En esta fase ambos grupos mostraron un desempeño similar en el comportamiento evaluado. Esto se vio reflejado en el índice S1, el cual indica el aprendizaje de la focalización de la respuesta cuando se está en las cercanías del intervalo *target* (Figura 1.9; $p=0,8023$ para el factor grupos y $p=0,1462$ para el factor sesiones, ANOVA de dos vías de medidas repetidas, $n=8/\text{grupo}$).

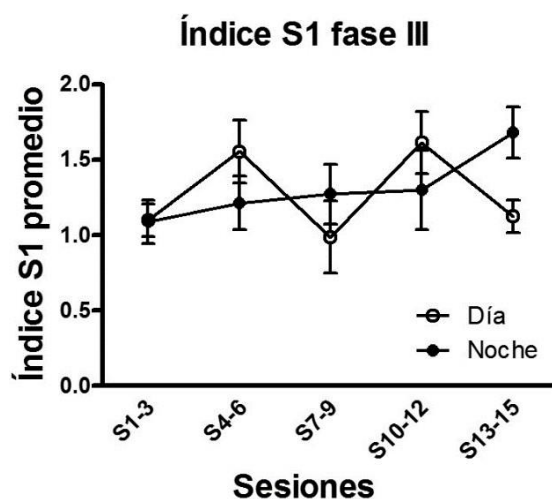


Figura 1.9. Fase III en los grupos día vs. noche. Índice S1 durante la fase III de entrenamiento del protocolo de estimación de intervalos cortos de tiempo para los grupos: ratones entrenados durante el día (círculos blancos) y durante la noche (círculos negros). $p=0,8023$ para grupos, $p=0,1462$ para sesiones, ANOVA de dos vías de medias repetidas, $n=8/\text{grupo}$. Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

A partir de los datos de las últimas cuatro sesiones de los ensayos de prueba de la fase IV, se confeccionaron las curvas de tasa de respuesta normalizada en función del tiempo para cada grupo (Figuras 1.10 A y B). Ambos grupos lograron producir una respuesta que pudo ser ajustada a una curva de tipo Gaussiana centrada en el intervalo *target*. Luego se calcularon los parámetros de estas curvas (ubicación, ancho y alto del pico) para realizar una comparación de los mismos entre los grupos de ratones estudiados (Figuras 1.10 C, D y E). Comparado con el grupo entrenado y testeado durante la noche, el grupo entrenado y testeado durante el día mostró un pico de respuesta corrido hacia valores mayores al intervalo *target*. Además, el alto del pico se vio disminuido y el ancho (variabilidad) aumentado ($p < 0.05$ para ubicación del pico, $p < 0.05$ para alto del pico y $p < 0.01$ para el ancho del pico, t-test a dos colas, $n = 8/\text{grupo}$). Esto indica que la respuesta en el grupo entrenado y testeado durante el día fue más dispersa, siendo mayor tanto la exactitud como la precisión de los ratones entrenados y testeados durante la noche.

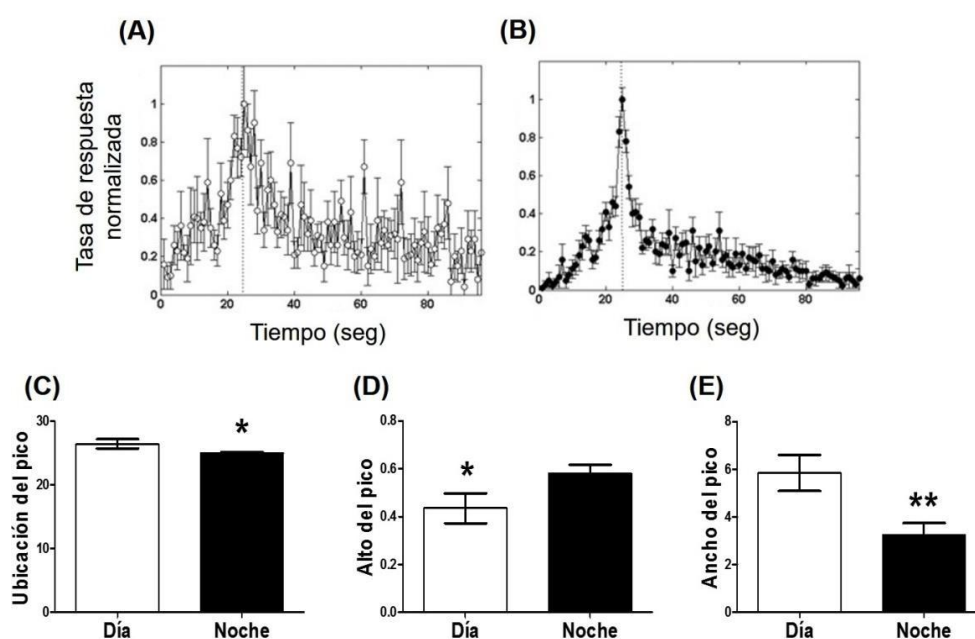


Figura 1.10. Fase IV en los grupos día vs. noche. Tasa de respuesta de respuesta normalizada en función del tiempo de los ensayos PI correspondientes al último bloque de sesiones (sesiones 21-24) para los grupos: (A) Ratones entrenados y testeados durante la noche y (B) ratones entrenados y testeados durante el día. La línea punteada indica el intervalo *target*. (C), (D) y (E) representan los parámetros derivados del ajuste a una curva de tipo Gaussiana para los grupos: día (barras blancas) y noche (barras negras). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, t-test a dos colas, $n = 8/\text{grupo}$. Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

Por otro lado, se analizaron los índices S1 y S2, los cuales reflejan el comienzo (S1) y el cese de la respuesta (S2) en una ventana de tiempo cercana al intervalo *target*. Los resultados del análisis del índice S1 a lo largo de las sesiones de entrenamiento mostraron que si bien ambos grupos aprendieron a aumentar su respuesta en intervalos próximos al intervalo *target*, los animales entrenados y testeados durante la noche lo hicieron de manera más eficiente, adquiriendo valores más altos del índice S1 comparados con los animales entrenados y testeados durante el día (Figura 1.11 A; $p=0,0229$ para el factor grupos, $p<0.0001$ para el factor sesiones, ANOVA de dos vías de medidas repetidas, $n=8/\text{grupo}$).

Por otro lado, el análisis del índice S2 reveló que ambos grupos incrementaron el valor del mismo a través de las sesiones, lo cual indica la adquisición de una disminución de la respuesta una vez que pasó el intervalo *target*. Sin embargo, el grupo entrenado y testado durante la noche alcanzó valores más altos de este índice comparados con los ratones evaluados durante el día (Figura 1.11 B; $p<0.0001$ para el factor sesiones y $p=0,0062$ para el factor grupos, ANOVA de dos vías de medidas repetidas, $n=8/\text{grupo}$). La rápida inhibición de la respuesta luego del intervalo de 24 segundos por parte de los ratones testados durante la noche, dio como resultado una curva Gaussiana de mayor amplitud y menos ancho, con una caída mayor luego del pico, lo que refleja una respuesta más precisa de este grupo. Este comportamiento se ve representado también por un mayor aumento del índice S2 en el grupo evaluado durante la noche.

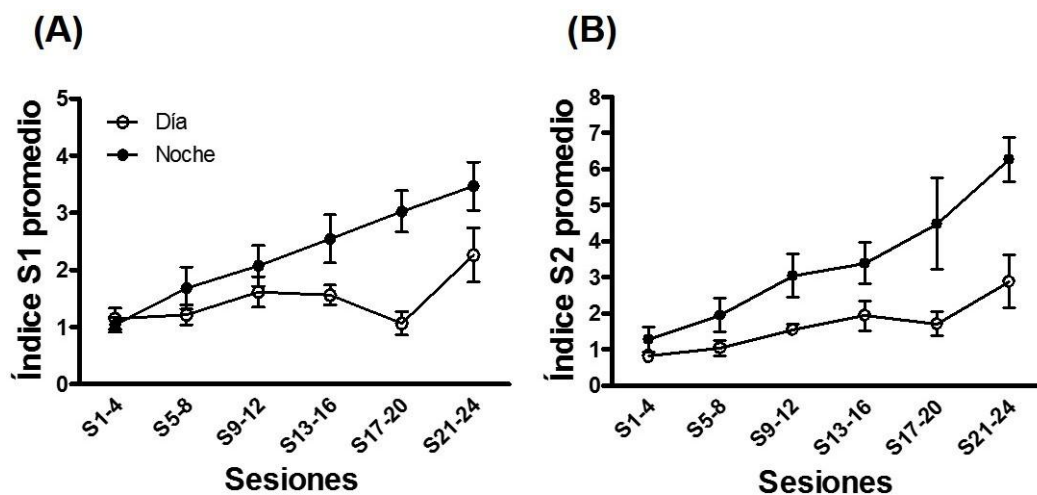


Figura 1.11. Fase IV en los grupos día vs. noche. Índices S1 (A) y S2 (B) a través de los bloques de sesiones para los grupos día (círculos blancos) y noche (círculos negros). Índice S1: $p=0,0229$ para el factor grupos, $p<0.0001$ para el factor sesiones; Índice S2: $p=0,0062$ para el factor grupos y $p<0.0001$ para el factor sesiones, ANOVA de dos vías de medidas repetidas, $n=8/\text{grupo}$. Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

Estimación de intervalos cortos de tiempo en oscuridad constante.

Como se ha descrito en la introducción general, una de las propiedades fundamentales de los ritmos circadianos es que son endógenos, haciendo referencia a su capacidad de persistir aún en ausencia de sincronizadores externos.

Habiendo encontrado una variación diaria en la estimación de intervalos cortos de tiempo en ratones, se quiso comprobar si la misma persistiría en condiciones de oscuridad constante. Con este fin, los ratones ya entrenados y testeados bajo un ciclo LO fueron puestos en condiciones de oscuridad constante a partir de la sesión 25 de fase IV, y fueron evaluados durante otras 24 sesiones en esta condición. De esta forma, uno de los grupos continuó siendo entrenado y testado durante el día subjetivo y el otro durante la noche subjetiva.

Al igual que los ratones testeados en luz/oscuridad, los grupos continuaron exhibiendo diferencias significativas en la estimación de intervalos cortos de tiempo, siendo más precisos aquéllos que fueron evaluados durante la noche subjetiva. En la Figura 1.12 A y B, pueden verse las curvas de la tasa de respuesta normalizada en función del tiempo para ambos grupos. Los parámetros extraídos del ajuste de los datos a una curva de tipo Gaussiana, mostraron que hubo diferencias significativas en el ancho del pico (Figura 1.12 E), siendo menor para los ratones entrenados y testeados durante la noche subjetiva. Esto se relacionó con una mayor precisión en la respuesta por parte de este grupo. Sin embargo no se encontraron diferencias en los parámetros ubicación del pico y alto del pico (figura 1.12 C y D respectivamente).

A su vez, se evaluaron los índices S1 y S2 como indicadores de la adquisición del comienzo y detención de la respuesta que debe darse previo y posterior al intervalo *target*, respectivamente (Figura 1.13 A y B). En este caso, al haber sido ya entrenados y testeados durante 24 sesiones previas en LO, los índices no mostraron un gran aumento a lo largo de las 24 sesiones restantes evaluadas en oscuridad constante. El índice S1 no mostró diferencias significativas entre los grupos (Figura 1.13 A; $p=0,2873$ para el factor grupos, ANOVA de dos vías de medidas repetidas, $n=8/\text{grupo}$). En cambio, el índice S2 exhibió una amplia diferencia entre los grupos (Figura 1.13 B; $p<0.0001$ para el factor grupos, ANOVA de dos vías de medidas repetidas, $n=8/\text{grupo}$), obteniéndose valores más altos del mismo para el grupo evaluado durante la noche subjetiva, coincidiendo con lo observado en este índice comparando los ratones testeados de día versus noche.

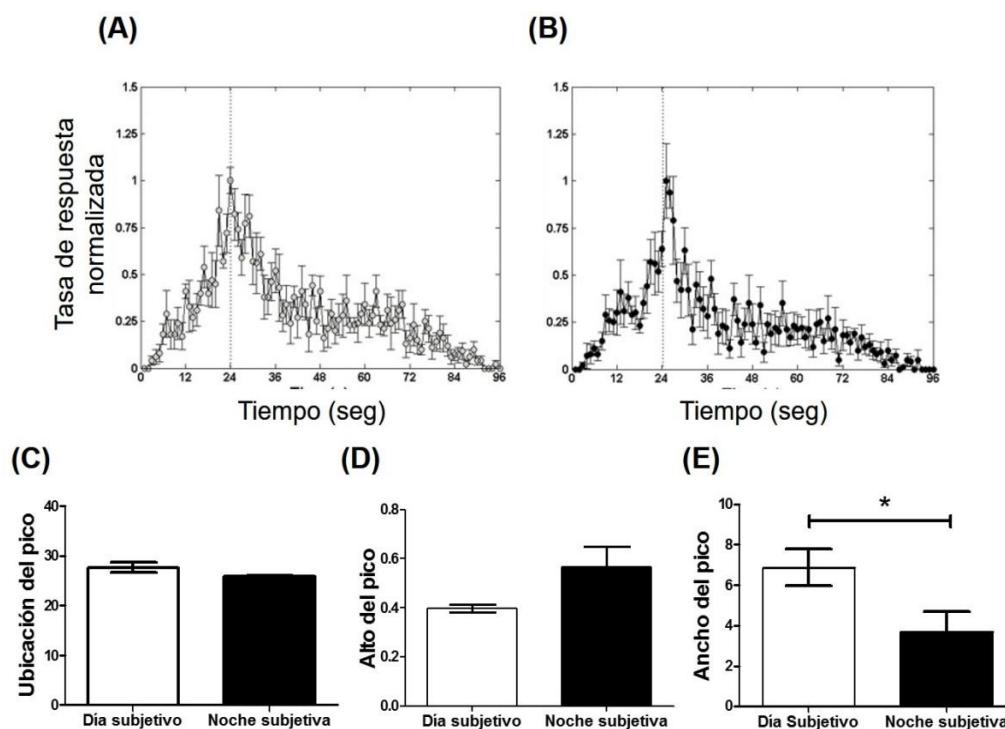


Figura 1.12. Fase IV en los grupos día subjetivo vs. noche subjetiva. Tasa de respuesta normalizada en función del tiempo de los ensayos PI correspondientes al último bloque de sesiones (sesiones 45-48) para los grupos evaluados en oscuridad constante: (A) Ratones entrenados durante el día subjetivo y (B) ratones entrenados durante la noche subjetiva. La línea punteada representa el intervalo *target* (24 segundos). (C), (D) y (E) parámetros derivados del ajuste de los datos a una curva de tipo Gaussiana para los grupos: día subjetivo (barras blancas) y noche subjetiva (barras negras). * $P < 0.05$, t-test a dos colas, $n = 8/\text{grupo}$. Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

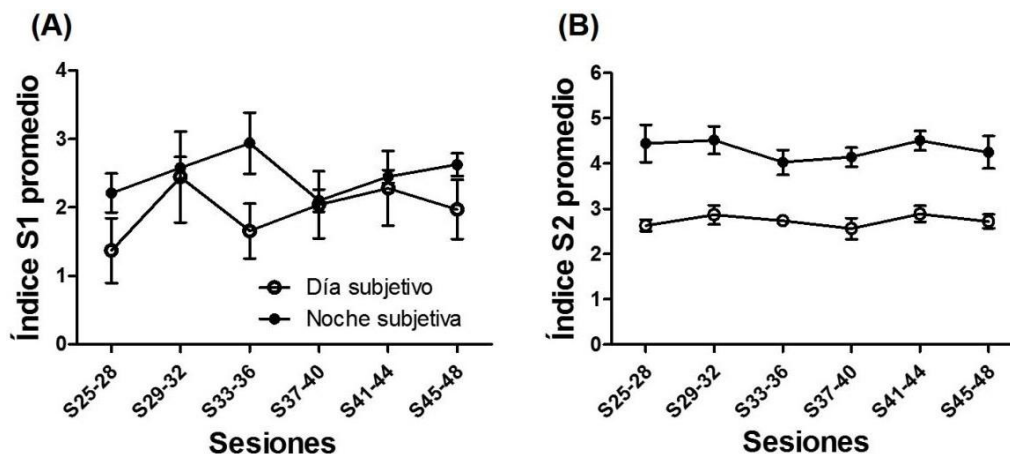


Figura 1.13. Fase IV en los grupos día subjetivo vs. noche subjetiva. (A) y (B) Índices S1 y S2, respectivamente, a través de los bloques de sesiones para los grupos día subjetivo (círculos blancos) y noche subjetiva (círculos negros). Índice S1: $p=0,2873$ para grupos, $p=0,0816$ para sesiones; Índice S2: $p<0.0001$ para grupos, $p=0,3162$ para sesiones, ANOVA de dos vías de medidas repetidas, $n=8/\text{grupo}$. Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

Efecto de un *jet-lag* simulado sobre la estimación de intervalos cortos de tiempo.

Los cambios abruptos en el ciclo luz/oscuridad ocasionados por vuelos transmeridianos ocasionan la desincronización del reloj interno con las claves ambientales externas, obligando al sistema circadiano a una rápida resincronización con la “hora del día” en el exterior. Este cambio abrupto conlleva al denominado síndrome de *jet-lag*, el cual afecta transitoriamente múltiples procesos fisiológicos y cognitivos (Cho, 2001).

Con el objetivo de comprobar si un cambio abrupto en el esquema de luz podía afectar el desempeño en un test de estimación de tiempo, se sometió a uno de los grupos de ratones entrenados y testeados en LO a un *jet-lag* por adelanto de 6 horas durante la fase IV de dicho protocolo. Al finalizar la sesión 28, el grupo que sufrió el adelanto del ciclo LO fue el grupo entrenado y testado durante el día, mientras que el otro grupo se mantuvo como control en las mismas condiciones en las que venía siendo evaluado.

La Figura 1.14 muestra la tasa de respuesta normalizada en función del tiempo para cada bloque de cuatro sesiones de fase IV antes y después del adelanto del ciclo LO. Pudo verse a simple vista que la tasa de respuesta normalizada del bloque de sesiones 29-32 presenta mayor dispersión que en el bloque de sesiones anterior al *jet-lag* (sesiones 25-28).

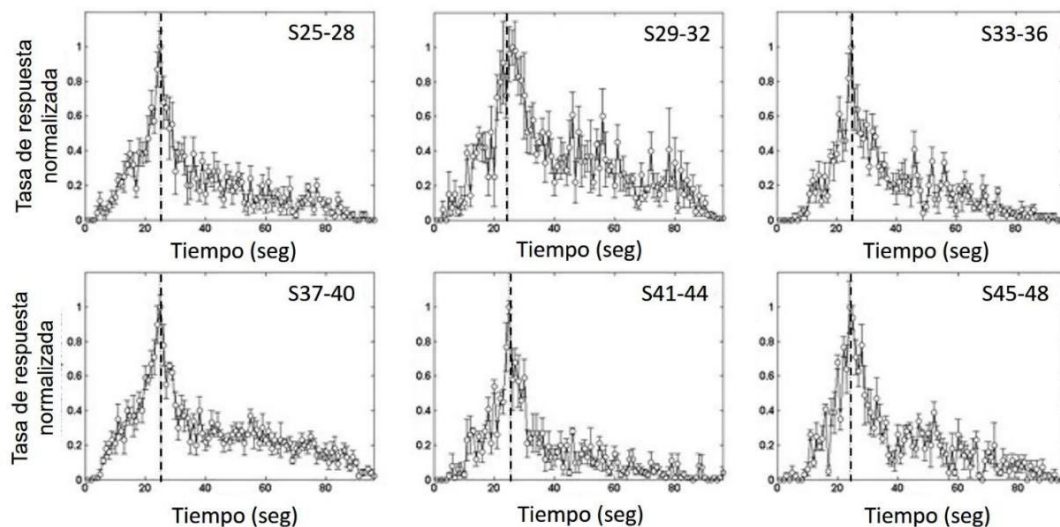


Figura 1.14. Efecto de un *jet-lag* simulado sobre la estimación de intervalos cortos de tiempo. El grafico muestra las tasas de respuesta normalizadas en función del tiempo para los bloques (de cuatro sesiones cada uno) durante la fase IV del protocolo de estimación de tiempo en ratones sometidos a un *jet-lag* simulado por un adelanto de 6 horas del ciclo LO. El bloque de sesiones 25-28 corresponde al bloque de sesiones previo al *jet-lag*, mientras que los bloques siguientes son los bloques de sesiones posteriores al cambio del ciclo LO. La línea punteada representa el intervalo *target* (24 segundos). Datos expresados como promedio + SEM.

Los parámetros que se desprenden del ajuste de los datos a una curva de tipo Gaussiana mostraron que hubo una descompensación transitoria de la *performance* de los ratones sometidos al *jet-lag*. Se observó un aumento en el valor temporal de la ubicación del pico de respuesta, es decir, un corrimiento hacia la derecha que denotó la sobreestimación del intervalo *target* (Figura 1.15 A; $p=0.02$, ANOVA de medidas repetidas seguido de test de Dunnet comparado contra el bloque de sesiones 25-28 previo al *jet-lag*, $n=7$ /grupo). Si bien no se observaron diferencias significativas en el alto de la curva, se observó un aumento en el ancho de la misma, lo que hizo referencia a un decremento en la exactitud y precisión de la respuesta en el bloque de sesiones posterior al *jet-lag* (Figuras 1.15 B y C, respectivamente; alto de la curva: $p=0.13$, ancho de la curva: $p=0.04$, ANOVA de medidas repetidas seguido de test de Dunnet, $n=7$ /grupo). Se analizaron además los índices S1 y S2 a través de los bloques de sesiones. El índice S1 no se mostró perjudicado por el *jet-lag*, de hecho los valores para el mismo siguieron aumentando a

través de la sesiones (Figura 1.15 D; $p=0.005$, ANOVA de una vía de medidas repetidas seguido de Dunnet, $n=7$ /grupo). Sin embargo, se encontró una disminución significativa en el índice S2 luego del *jet-lag* (Figura 1.15 E; $p=0.0002$, ANOVA de una vía seguida de test de Dunnet, $n=7$ /grupo) el cual persiste hasta las sesiones 41-44, indicando que el efecto del *jet-lag* fue más profundo sobre este índice.

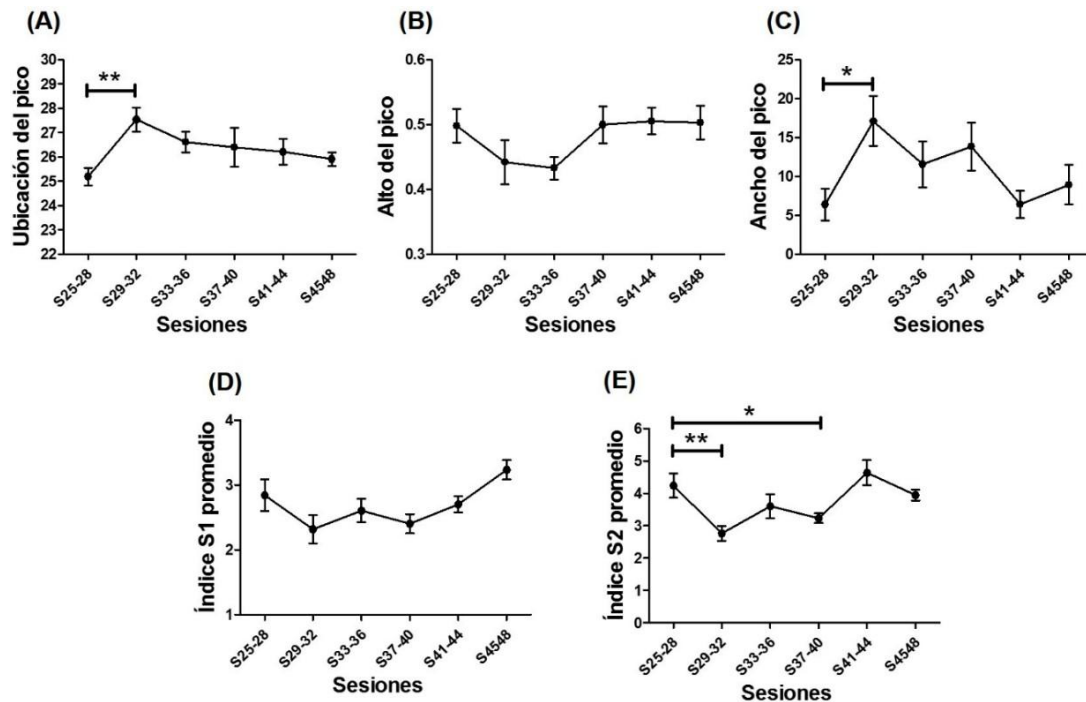


Figura 1.15. Efecto de un *jet-lag* simulado sobre la estimación de intervalos cortos de tiempo. (A) Ubicación del pico, (B) alto del pico y (C) ancho del pico, parámetros derivados del ajuste de los datos a una curva de tipo Gaussiana. (E) y (F) muestran los índices S1 y S2, respectivamente, a lo largo de las sesiones. $p=0.02$ para ubicación del pico, $p=0.13$ para alto del pico, $p=0.04$ para ancho del pico, $p=0.005$ para el índice S1 y $p=0.0002$ para S2; ANOVA de medidas repetidas seguido de test de Dunnet comparado contra las sesiones 25-28 previas al *jet lag*; * $p<0.05$, ** $p<0.01$; $n=7$ /grupo). Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

Estos resultados sugieren que la desincronización circadiana ocasionada por un cambio abrupto en el ciclo de luz/oscuridad causó una afección transitoria en la capacidad de estimar intervalos cortos de tiempo. Sin embargo, el déficit observado fue de carácter transitorio, ya que la estimación mejoró a medida que los animales se resincronizaron al nuevo ciclo de luz/oscuridad.

Estimación de intervalos cortos de tiempo en condiciones de luz constante.

Las condiciones de luz constante producen en primera instancia un alargamiento del período endógeno, seguido de arritmicidad circadiana en ratones (Moriya et al., 2000). Con el objeto de probar si la arritmicidad circadiana tendría efectos sobre la estimación de intervalos cortos de tiempo, se mantuvo a un grupo de ratones en condiciones de iluminación constante y se los entrenó utilizando el protocolo de estimación de tiempo descrito en los métodos. Los animales estuvieron al menos 20 días en LL previo al comienzo del entrenamiento. Como control se utilizó un grupo de ratones bajo un ciclo LO 12:12, que fue entrenado y testeado durante la fase nocturna (ZT 15-17).

La Figura 1.16 muestra los resultados de las fases I y II del protocolo de entrenamiento. Los grupos no presentaron diferencias significativas en el número de respuestas (Figura

A, fase I: $p=0,8390$; Figura 1.16 C, fase II: $p=0,0635$, t-test a dos colas, $n=8/\text{grupo}$) ni en la velocidad de adquisición de la respuesta (Figura 1.16 B, fase I: $p=0,0028$ para el factor sesiones y $p=0,8256$ para el factor grupos; Figura 1.16 D fase II: $p=0,5943$ para el factor sesiones y $p=0,0945$ para el factor grupos, ANOVA de dos vías de medidas repetidas, $n=8/\text{grupo}$).

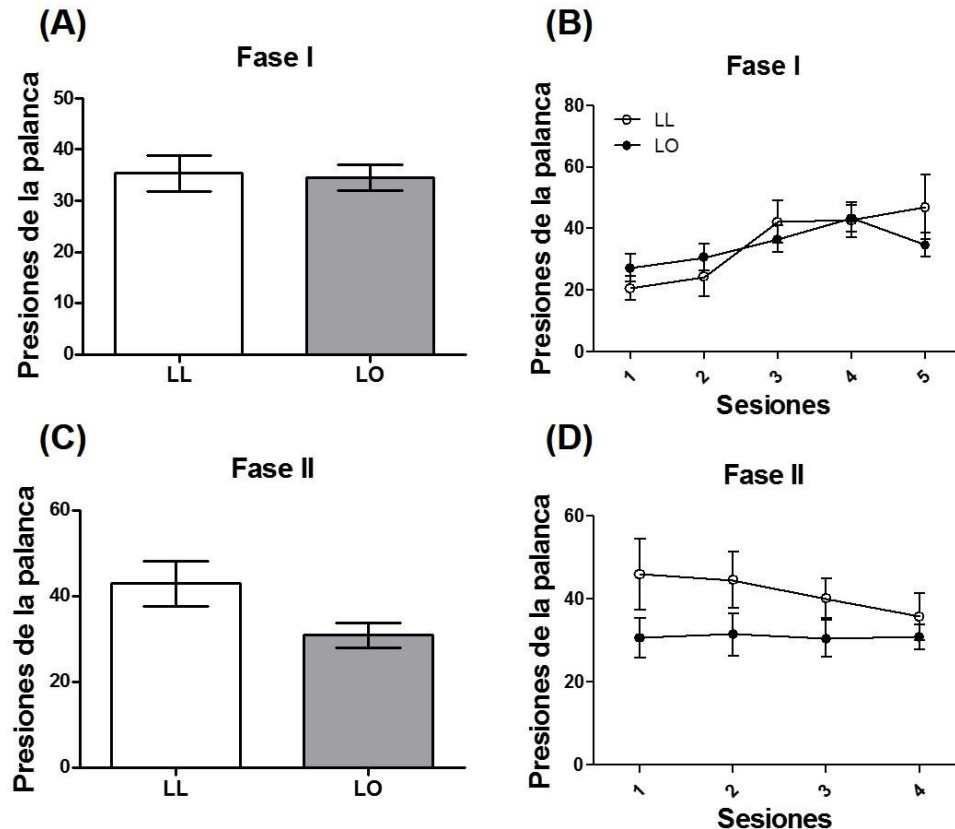


Figura 1.16. Fases I y II en animales entrenados en condiciones de LL y LO. (A) Promedio de presiones de la palanca realizadas en las cinco sesiones de fase I para los grupos LO (barra negra) y LL (barra blanca). $p=0,8390$, t-test a dos colas, $n=8/\text{grupo}$. (B) Evolución del promedio de presiones a través de las cinco sesiones de fase I para los grupos LO (círculos negros) y LL (círculos blancos) $p=0,0028$ para el factor sesiones y $p=0,8256$ para el factor grupos, ANOVA de dos vías de medidas repetidas, $n=8/\text{grupo}$). (C) Promedio de presiones de la palanca realizadas en las cinco sesiones de fase II para los grupos LO (barra negra) y LL (barra blanca). $p=0,0635$, t-test, $n=8/\text{grupo}$. (D) Evolución del promedio de presiones a través de las cinco sesiones de fase II para los grupos LO (círculos negros) y LL (círculos blancos). $p=0,5943$ para el factor sesiones y $p=0,0945$ para el factor grupos, ANOVA de dos vías de medidas repetidas, $n=8/\text{grupo}$). Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

Durante la fase III de entrenamiento, se comenzaron a observar las diferencias entre los grupos entrenados. Evaluando el índice S1 a lo largo de las sesiones, se encontró una diferencia significativa en la adquisición del aumento de la respuesta previo al intervalo *target*. En el caso de los grupos estudiados, se observó que los ratones bajo un ciclo de luz/oscuridad entrenados durante la noche obtuvieron valores más altos para el índice S1 a lo largo de las sesiones, comparados con los ratones en condiciones de luz constante (Figura 1.17; $p=0,0006$ para el factor grupos, ANOVA de dos vías de medidas repetidas, $n=8/\text{grupo}$).

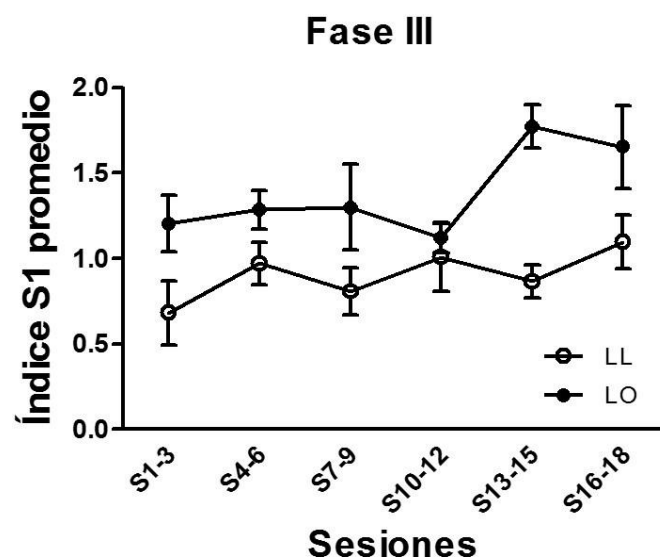


Figura 1.17. Fase III en los grupos de ratones LO vs. LL. Índice S1 a lo largo de las sesiones durante la fase III del protocolo de estimación de intervalos cortos de tiempo para los grupos: LO (círculos negros) y LL (círculos blancos). $p=0,0006$ para grupos, $p=0,0692$ para sesiones, ANOVA de dos vías de medidas repetidas, $n=8/\text{grupo}$. Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

En la fase IV del protocolo, las diferencias entre los grupos evaluados se profundizaron. Las Figuras 1.18 A y B muestran las curvas de tasa de respuesta normalizada en función del tiempo para cada grupo. Se puede ver a simple vista que, mientras los ratones bajo un ciclo de luz/oscuridad lograron producir una respuesta ajustable a una curva de tipo Gaussiana, los ratones en condiciones de luz constante presentaron una respuesta dispersa y variable en función del tiempo, la cual no pudo ser ajustada a una curva Gaussiana para calcular los parámetros de la misma. Por esta razón, el único método de comparación entre los grupos fueron los índices S1 y S2.

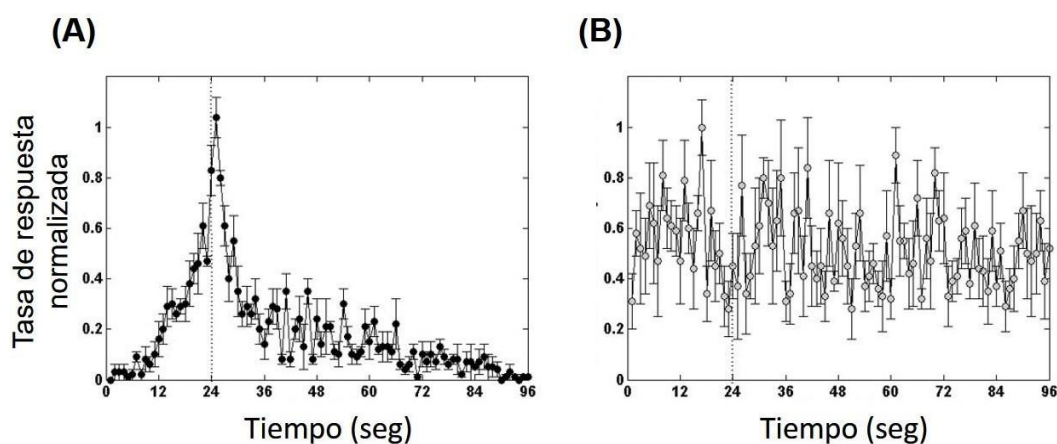


Figura 1.18. Fase IV en los grupos de ratones LO vs. LL. Tasa de respuesta normalizada en función del tiempo de los ensayos PI correspondientes al último bloque de sesiones (sesiones 21-24) para los grupos: (A) LO y (B) LL. La línea punteada representa el intervalo *target* (24 segundos). Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

En las Figuras 1.19 A y B puede verse la misma tendencia para ambos índices. Los ratones entrenados y testeados bajo un ciclo LO presentaron un aumento en ambos índices a lo largo de las sesiones, reflejando la adquisición del comportamiento a través del tiempo. Sin embargo, los ratones entrenados y testeados en condiciones de luz constante presentaron valores bajos de estos índices, así como pendientes muy pequeñas a lo largo del tiempo evaluado, denotando que no hubo aprendizaje del comportamiento a lo largo de las sesiones en este grupo (Figura 1.19 A; índice S1: $p < 0.0001$ para el factor sesiones, $p = 0.0023$ para el factor grupos; Figura 1.19 B; Índice S2: $p < 0.0001$ para el factor sesiones, $p = 0.0016$ para el factor grupos, ANOVA de dos vías de medidas repetidas, $n = 8/\text{grupo}$).

Estos resultados sugieren que las condiciones de luz constante, las cuales inducen arritmicidad circadiana, son también disruptivas del proceso de aprendizaje de la tarea de estimación temporal evaluada.

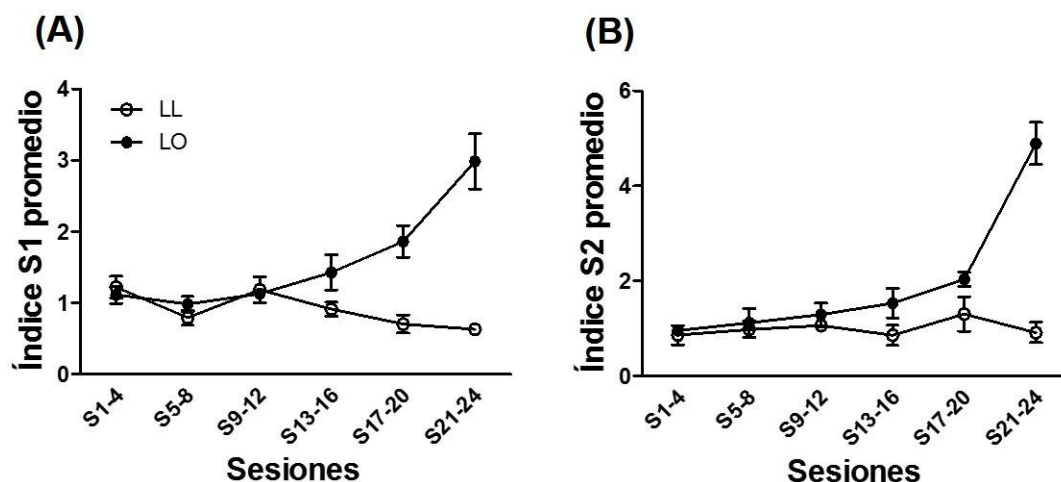


Figura 1.19. Fase IV en los grupos de ratones LO vs. LL. Índices S1 (A) y S2 (B) para los grupos: LL (círculos blancos) y LO (círculos negros). Índice S1: $p < 0.0001$ para el factor sesiones, $p = 0.0023$ para el factor grupos; Índice S2: $p < 0.0001$ para el factor sesiones, $p = 0.0016$ para el factor grupos, ANOVA de dos vías de medidas repetidas, $n = 8/\text{grupo}$. Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

Electroretinograma

Con el objetivo de determinar si la diferencia en la estimación del tiempo encontrada entre los grupos mantenidos en condiciones de luz/oscuridad (LO) y luz constante (LL) se debía a problemas visuales ocasionados por la luz constante en el último grupo, se realizó un electroretinograma (ERG) para evaluar la existencia de daño en la retina.

Debido a que los animales del grupo LL están continuamente expuestos a luz, podrían presentar daños en la retina. Esto les ocasionaría problemas para identificar la palanca dentro de la jaula donde se lleva a cabo el protocolo de estimación o bien, para detectar la señal lumínica que indica el comienzo del ensayo.

En la figura 1.20 se comparan los valores de los parámetros medidos para los distintos grupos, los cuales corresponden a la amplitud y la latencia de las ondas a y b, dadas por las respuestas eléctricas de las retinas analizadas. Los resultados obtenidos no arrojaron diferencias significativas en la respuesta eléctrica de las retinas de individuos de los distintos grupos ($p > 0.05$, t-test a dos colas). Tanto la amplitud como la latencia de las ondas a y b arrojó valores normales para ambos grupos, por lo que se asume que la visión no fue comprometida por las condiciones de luz constante utilizadas en nuestro protocolo (100 lux).

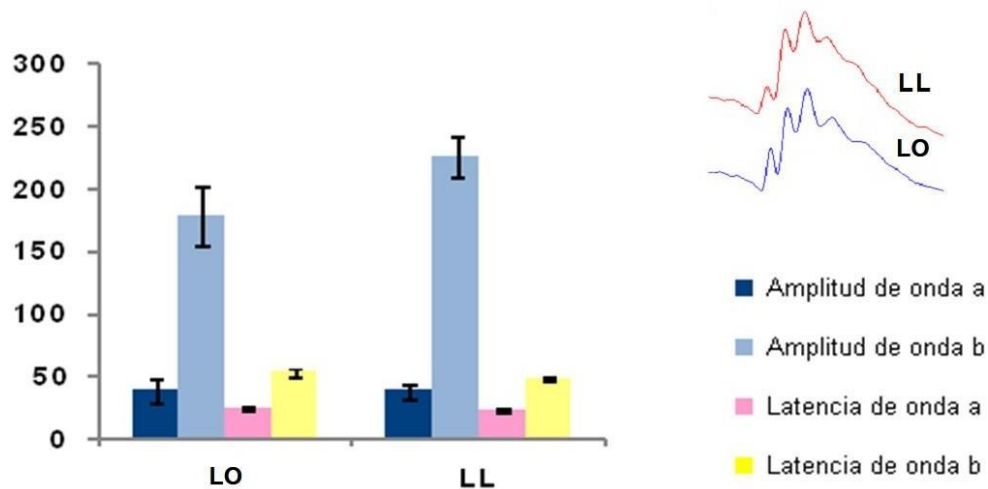


Figura 1.20. ERG en los grupos de ratones LO vs. LL. Se muestran los parámetros obtenidos mediante electroretinograma (ERG) escotópico realizado en ratones mantenidos en LO y en LL. No se encontraron diferencias significativas entre los valores de los cuatro parámetros estudiados (amplitud de onda a: $p=0.9260$; amplitud de onda b: $p=0.0871$; latencia de onda a: $p=0.3896$; latencia de onda b: $p=0.2398$, t-test a dos colas). A la derecha se muestran trazas representativas para ambos grupos. Datos expresados como promedio $\pm$ SEM ($n=6$ /grupo).

Ensayos de ansiedad.

Otro punto a evaluar fue el estado de ansiedad al que podía estar sometido el grupo de ratones mantenido en condiciones de luz constante, lo que podía llegar a condicionar su aprendizaje. Este estado podría llegar a causar presiones compulsivas de la palanca sin necesidad de que el individuo reparara en la estimación del intervalo temporal y la obtención de la recompensa (McGrath et al., 1999). Para este fin, se llevaron a cabo los ensayos de laberinto en cruz elevado y de campo abierto con dos grupos experimentales: ratones en condiciones de luz constante y ratones bajo un ciclo de luz/oscuridad durante su fase de luz.

Los resultados obtenidos en el laberinto en cruz elevado demostraron que no hay diferencias significativas en cuanto al estado de ansiedad presentado por los distintos grupos (figura 1.21). Esto se vio reflejado en los parámetros obtenidos a partir del *test*, ya que no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos (Figura 1.21 A; $p=0,68$, t-test a dos colas), en el porcentaje de tiempo de permanencia en brazos cerrados (Figura 1.21 B; $p=0,88$, t-test a dos colas), ni en el número de entradas totales a los brazos abiertos (Figura 1.21 C; $p=0,57$, t-test a dos colas, $n=13$ /grupo).

Al igual que en el test de laberinto en cruz elevado, los datos obtenidos a partir del ensayo de campo abierto no mostraron diferencias significativas entre los grupos evaluados (Tabla 1.1). Los parámetros comparados entre los grupos fueron: distancia total recorrida ($p=0,3685$, t-test a dos colas), tiempo permanecido en la periferia del campo ($p=0,1524$, t-test a dos colas), distancia recorrida en la periferia del campo ($p=0,1003$, t-test a dos colas), tiempo permanecido en el centro del campo ($p=0,1524$, t-test a dos colas) y distancia recorrida en el centro del campo ($p=0,7689$, t-test a dos colas, $n=9$ /grupo).

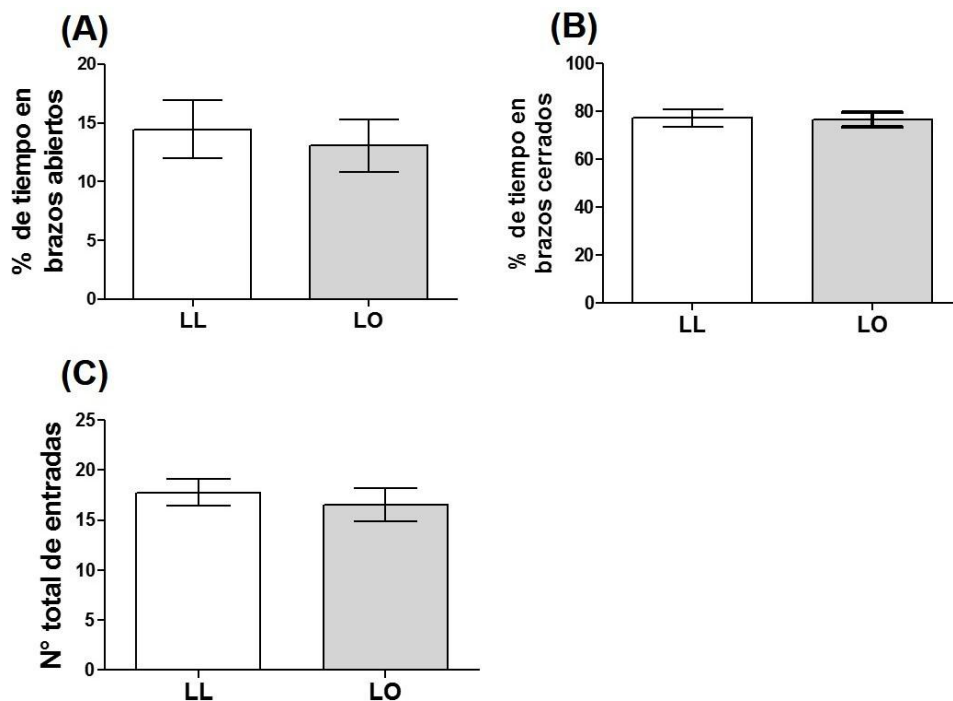


Figura 1.21. Prueba de laberinto en cruz elevado en los grupos de ratones LO vs. LL. Se muestran los parámetros obtenidos (A) Porcentaje de tiempo de permanencia en brazos abiertos, (B) Porcentaje de tiempo de permanencia en brazos cerrados y (C) Número total de entradas a los brazos cerrados, para los grupos en LL (barras grises) y LO testeados durante el día (barras blancas). $p=0,68$ para % de tiempo en brazos abiertos, $p=0,88$ para % de tiempo en brazos cerrados y $p=0,57$ para N° total de entradas, t-test a dos colas, $n=13$ /grupo. Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

Tabla 1.1. Parametros adquiridos a partir del ensayo de locomoción en campo abierto en los grupos de ratones LO vs. LL. Los valores se expresan como promedio $\pm$ DS (n=9/grupo).

Parámetro	Grupos	
	LL	LO
Distancia total recorrida	38.93 $\pm$ 11.06	34.43 $\pm$ 9.46
Tiempo en la periferia	771.46 $\pm$ 42.62	730.53 $\pm$ 69.73
Distancia en la periferia	28.18 $\pm$ 6.10	22.92 $\pm$ 6.67
Tiempo en el centro	128.52 $\pm$ 42.63	169.45 $\pm$ 69.72
Distancia en el centro	10.74 $\pm$ 5.79	11.51 $\pm$ 5.04

Los datos obtenidos a partir de estos *test* comportamentales confirman que las condiciones de luz constante no ocasionan un aumento de ansiedad en los animales sujetos a esta condición. Por lo cual, se puede afirmar que el estado de ansiedad de los animales en luz constante no fue el causante del mal desempeño que presentaron los ratones sujetos a estas condiciones de iluminación en el protocolo de estimación de intervalos cortos de tiempo.

Test de reconocimiento de un objeto novedoso (NOR)

Con el objetivo de corroborar que las condiciones de luz constante no estuvieran influyendo en la memoria de los animales mantenidos en LL y así, de manera indirecta, afectando la estimación de intervalos cortos de tiempo, se realizó una prueba de memoria a largo y corto plazo. Para esto se utilizó el *test* de reconocimiento de un objeto novedoso, el cual se detalla en la sección Materiales y métodos de este capítulo (página 63). El *test* fue realizado sobre ratones bajo un ciclo LO 12:12, particularmente en la fase de luz, y en ratones mantenidos en condiciones de luz constante (LL).

La comparación entre grupos de los datos obtenidos en la prueba de memoria no mostró diferencias significativas entre los mismos. Los parámetros evaluados fueron el índice de discriminación del objeto novedoso, medido luego de 6 horas o de 4 días de la familiarización (Figura 1.22 A; p=0.23 y Figura 1.22 C; p=0.46, respectivamente, t-test a dos colas, n=10/grupo), y el índice de preferencia por el objeto novedoso, medido luego de 6 horas o de 4 días de la familiarización (Figura 1.22 B; p=0.23 y Figura 1.22 D; p=0.39, respectivamente, t-test a dos colas, n=10/grupo).

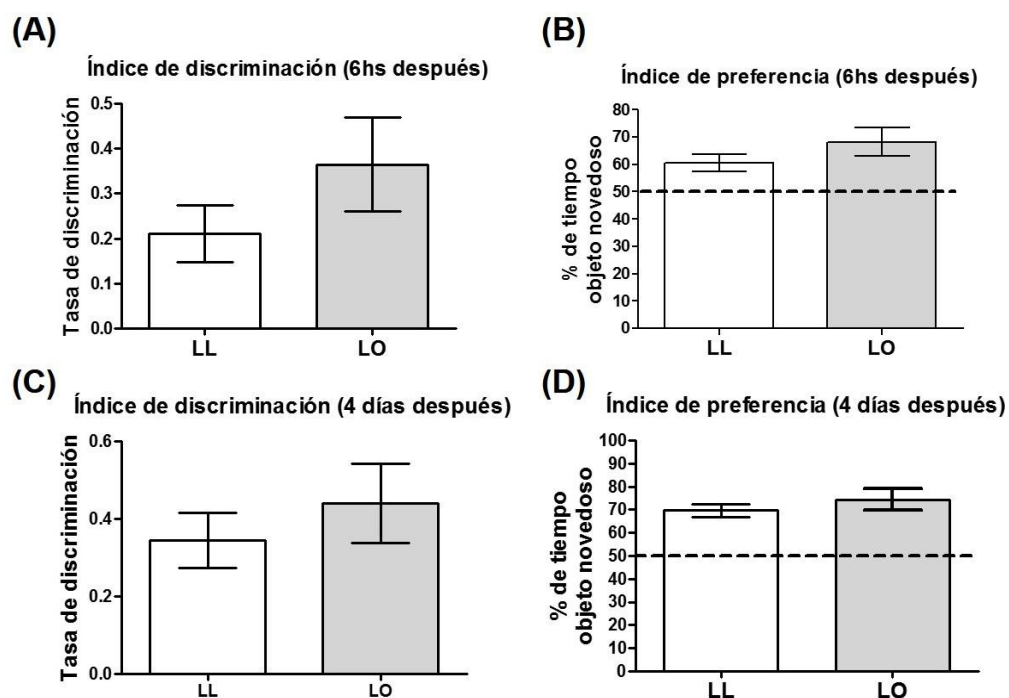


Figura 1.22. Test de reconocimiento de un objeto novedoso. Luego de 6 hs posteriores al entrenamiento, el índice de discriminación (A) ni el índice de preferencia (B) mostraron diferencias significativas entre los grupos LL (barras blancas) y LO (barras grises; $p=0.232$ para discriminación y $p=0.232$ para preferencia, t-test a dos colas. $n=10$ /grupo). A su vez, tanto la discriminación (C) como la preferencia (D) tampoco mostraron diferencias significativas entre los grupos cuando fueron evaluados 4 días después del entrenamiento ($p=0.46$ y $p=0.39$, respectivamente, t-test a dos colas. $n=10$ /grupo). Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

Discusión

Este primer capítulo estuvo abocado al estudio de la estimación de intervalos cortos de tiempo, con especial énfasis en cómo esta tarea cognitiva se ve afectada por variables que modifican el comportamiento circadiano o lo desafían.

Como primer paso se realizó una evaluación de la estimación del tiempo en ratones comparando el desempeño en la tarea durante el día vs. durante la noche, basándonos en trabajos previos que reportaban que varias funciones cognitivas se encontraban sometidas a control circadiano y presentaban un ritmo diario (Chaudhury y Colwell, 2002, Gerstner y Yin, 2010). Nuestros resultados mostraron que el desempeño de los ratones en la tarea de estimación ensayada fue superior cuando se realizó durante la noche que durante el día (Figuras 1.10 y 1.11). Este resultado está en línea con múltiples trabajos que demostraron que aquellas funciones cognitivas que poseen un ritmo diario, presentan mejor desempeño durante la fase en que los animales se encuentran activos (Valentinuzzi et al., 2001, Roedel et al., 2006).

Además, se demostró en este capítulo que en condiciones de oscuridad constante (en las cuales los ritmos circadianos se encuentran en libre curso y expresan su periodo endógeno) el ritmo previamente encontrado en luz/oscuridad en el desempeño frente al protocolo de estimación de tiempo se mantiene, siendo los ratones más precisos durante su noche subjetiva comparado con los entrenados y testeados durante el día subjetivo (Figura 1.12 y 1.13). Esto sugiere que el ritmo diario encontrado en la habilidad de estimar el tiempo es de carácter endógeno.

Por otra parte, se estudió la variación en el desempeño de la tarea de estimación del tiempo en ratones sujetos a un cambio abrupto en su esquema de iluminación, simulando un *jet-lag* por adelanto de fase de 6 horas. Este *jet-lag* simulado presenta un desafío para el sistema circadiano, ya que produce una desincronización transitoria debido a que “la hora” del reloj interno no coincide con la que está dando el reloj externo o *Zeitgeber*. Sin embargo, el sistema puede reacomodarse a esta nueva condición y eso se lleva a cabo en un periodo de entre 5 y 7 días (Reddy et al., 2002, Kiessling et al., 2010). Mediante el testeo de los ratones utilizando el protocolo de estimación temporal antes mencionado, durante y luego de la resincronización de los mismos al nuevo ciclo de luz/oscuridad, se pudo ver que la desincronización transitoria perjudicó la estimación de intervalos cortos de tiempo. Esta desmejora se evidenció en varios de los parámetros estudiados para *interval timing* en el bloque de sesiones posterior al *jet-lag*. Posteriormente, se observó una ligera mejora con el paso de las sesiones que coincidió con el proceso de resincronización, en las que los parámetros evaluados fueron retomando los valores que poseían antes del cambio en el esquema de luz/oscuridad (Figuras 1.14 y 1.15). Estos resultados están en línea con múltiples trabajos que demostraron que la desincronización afecta a funciones cognitivas, no solo en organismos modelo sino también en humanos que sufren *jet-lag* frecuente o tienen trabajos en turnos rotativos (Cho, 2001, Gibson et al., 2010, Reid et al., 2010, Kott et

al., 2012).

Por otro lado, se estudió cómo la arritmicidad circadiana causada por exposición a condiciones de luz constante podía influir sobre la estimación de intervalos cortos de tiempo. Se demostró que los ratones sometidos a estas condiciones fueron incapaces de estimar correctamente el intervalo de tiempo, denotando una pérdida total del control temporal (Figuras 1.18 y 1.19). Este resultado indica que la arritmicidad circadiana afecta negativamente la estimación de intervalos cortos de tiempo. Sin embargo, un estudio previo realizado por Lewis et al. (2003) mostró lo contrario. Ellos indujeron arritmicidad circadiana por medio de lesiones específicas en los NSQ, y observaron que la estimación de intervalos cortos de tiempo se mantenía intacta en animales lesionados y por lo tanto no dependía de un reloj circadiano funcional. Sin embargo, el análisis de las curvas de respuesta muestra un ajuste forzado a una función de tipo Gaussiana tanto antes de la lesión como después de efectuar la misma. Tampoco se muestra histología que revele el alcance de las lesiones de los NSQ. Por consiguiente, es difícil evidenciar un efecto de la lesión de los NSQ sobre la estimación temporal de esos animales. A su vez, en un estudio realizado con ratones doble *knockout* para las proteínas reloj CRY1/CRY2 (los cuales son arrítmicos en condiciones de oscuridad o luz constantes), mostró que los mismos estiman el tiempo sin dificultad alguna, al igual que los controles heterocigotas (Papachristos et al., 2011). Sin embargo, en este trabajo no fue registrada la actividad locomotora de los ratones evaluados en el protocolo de estimación temporal. De esta manera, no se registran evidencias de que esos ratones estuviesen realmente arrítmicos, ya que los mismos pudieran estar sincronizándose con estímulos no-fóticos tales como el acceso al alimento o la tarea cognitiva realizada (Mendoza, 2007, Gritton et al., 2009). Además, un estudio posterior demostró que estos dobles mutantes de CRY presentan grandes niveles de ansiedad y problemas cognitivos (De Bundel et al., 2013), lo que refuerza la idea de que el estudio de Papachristos et al. (2011) no estuvo realizado en las condiciones adecuadas para que este fenotipo se expresara y se pudieran detectar problemas en la estimación de intervalos cortos de tiempo.

Por otro lado, en el presente capítulo se realizó una batería de ensayos comportamentales asociados a funciones cognitivas varias. Estas evaluaciones se llevaron a cabo con el objeto de dilucidar si la respuesta que los ratones arrítmicos desde el punto de vista circadiano obtuvieron frente a la tarea de estimación temporal fue producto de la alteración de algún comportamiento asociado a la estimación de intervalos cortos de tiempo *per se* o si se trató de una alteración cognitiva en general. Para ello se ensayaron pruebas de ansiedad, tales como el *test* de laberinto en cruz elevado y el *test* de campo abierto, y pruebas de memoria a corto y largo plazo, como el *test* de reconocimiento de objetos (NOR). Respecto a los ensayos de ansiedad, y de acuerdo con el trabajo realizado por Castro et al. (2005), se encontró que los ratones mantenidos en condiciones de luz constante no mostraron diferencias con los controles mantenidos en LO. Ambos grupos registraron valores similares en los parámetros analizados en ambos *tests* utilizados (Figura 1.21 y Tabla 1.1), mostrando que la falta de control temporal de los animales arrítmicos no está dada por un nivel alto de ansiedad que impida la exploración y la

realización de la tarea.

En línea con estos resultados, en el ensayo de NOR los grupos de ratones en LL y LO no mostraron diferencias significativas en la diferenciación del objeto conocido tanto a corto (6 horas) como a largo plazo (4 días, Figura 1.22). Sin embargo, estos resultados son opuestos a estudios realizados en hamsters, que muestran que la arritmicidad circadiana causada a través de un protocolo de *jet-lag* crónico está asociada a problemas de reconocimiento de objetos a corto y largo plazo, y que esto se debe al desarreglo a nivel de los NSQ, los cuales disparan señales inhibitorias (GABAérgicas) al hipocampo perjudicando su funcionamiento (Ruby et al., 2013, Fernandez et al., 2014). La diferencia entre los resultados, además de tratarse de modelos animales distintos, podría provenir del protocolo que fue aplicado para inducir arritmicidad circadiana. En esta tesis se utilizó el protocolo de arritmicidad inducida por luz constante, el cual posee un efecto paulatino ya que la arritmicidad se da luego de más de 20 días en esas condiciones. De esta manera, podría no producir un desarreglo generalizado a nivel de los NSQ, a diferencia del protocolo utilizado en los trabajos citados anteriormente donde la arritmicidad se induce en pocos días mediante cambios de fase abruptos y repetidos.

Además de los ensayos comportamentales, se realizó un electroretinograma para descartar posibles daños en la retina generados por las condiciones de iluminación constante (que dificultaran, por ejemplo, la realización de la tarea de estimación del tiempo en estos ratones a causa de la falta de visión de la señal lumínica). Este experimento demostró que los animales en LL no poseían signos de deterioro retiniano, mostrando ondas A y B similares a los controles mantenidos en LO (Figura 1.20).

La importancia de los resultados obtenidos en este capítulo reside en la demostración de que existe una relación entre los dos sistemas temporales bajo estudio, el circadiano y el de estimación de intervalos cortos de tiempo. Una relación en la que cambios en los esquemas de luz (que provocan cambios bien caracterizados en los ritmos circadianos) también provocan cambios en la percepción del tiempo.

Finalizando este capítulo, es justo afirmar que no queda claro si los eslabones que unen estos dos sistemas son múltiples o individuales, pero sí sabemos que estos dos sistemas temporales están relacionados. En los siguientes capítulos de esta tesis se proponen algunos posibles mensajeros que mediarían la comunicación entre los sistemas en estudio.

Capítulo 2. Rol dopaminérgico en la modulación circadiana de la estimación de intervalos cortos de tiempo

Introducción

Con ustedes, la dopamina

La dopamina (DA) es un neurotransmisor de la familia de las catecolaminas, al igual que la epinefrina y la adrenalina. Estos neurotransmisores son sintetizados a partir del aminoácido tirosina. En particular, la síntesis de dopamina comienza con la conversión de la tirosina en dihidroxifenilalanina (DOPA), paso que está catalizado por la enzima tirosina hidroxilasa (TH). Luego, DOPA es convertida en DA por la acción de la enzima DOPA descarboxilasa. El paso de conversión de tirosina a DOPA, que cataliza la TH, es el paso limitante de la síntesis, por lo cual la cantidad y actividad de enzima TH se convierten en un dato indirecto de la tasa de síntesis del neurotransmisor (Lindgren et al., 2002). Luego de sintetizada, la dopamina es almacenada en vesículas. Estas vesículas cumplen un rol dual: mantienen listo el *stock* de dopamina disponible y, a su vez, intervienen en el proceso de liberación. Cuando un potencial de acción alcanza una terminal nerviosa, los canales de Ca^{+2} se abren provocando la entrada de este catión a la neurona. El Ca^{+2} favorece la fusión de las vesículas que contienen el neurotransmisor con la membrana de la neurona, allí las vesículas liberan su contenido al espacio sináptico (Smith et al., 2008). El proceso de finalización de la señalización dopaminérgica se da por la remoción del neurotransmisor del espacio sináptico. El neurotransmisor puede ser recaptado por las células dopaminérgicas, que promueven el reciclaje del mismo, o degradado luego de ser captado por células adyacentes (como células gliales) y del endotelio. Cuando la dopamina es recaptada por las células dopaminérgicas mediante el transportador de dopamina (DAT), la misma es secuestrada nuevamente en vesículas. Sin embargo, la dopamina que quedara en el citosol es degradada por la enzima monoamina oxidasa (MAO) que convierte a la dopamina en ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC). Por otro lado, cuando la degradación se da en células de la glía, la dopamina puede ser degradada vía MAO o vía una enzima denominada catecol- O-metiltransferasa (COMT). El producto de degradación de la dopamina por esta vía es el ácido homovanílico (HVA) que junto con DOPAC son ambos los principales productos de degradación del neurotransmisor (Meiser et al., 2013).

La dopamina es un neurotransmisor ampliamente distribuido en el sistema nervioso central y en algunos sistemas periféricos como el sistema cardiovascular y el renal. Este neurotransmisor es producido mayormente en estructuras tales como el área ventral tegmental (VTA) y la sustancia nigra (SN). La dopamina está involucrada en procesos como el control del movimiento voluntario, la alimentación, la recompensa, el sueño, la atención, la memoria de trabajo y el aprendizaje, entre otras funciones (Beaulieu y

Gainetdinov, 2011). Es por eso que las fallas en el sistema dopaminérgico dan lugar a múltiples desórdenes neuropsiquiátricos y neurodegenerativos como déficit atencional e hiperactividad (ADH), síndrome de Tourette, esquizofrenia, depresión, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y esclerosis múltiple, entre otros (Bohnen et al., 2000, Lotharius y Brundin, 2002, Steeves et al., 2010, Howes et al., 2012).

Dopamina: de dónde viene y hacia dónde va

En el sistema nervioso central la dopamina tiene tres orígenes: la vía nigroestriatal, la vía mesocorticolímbica y la vía tuberoinfundibular, cada una de ellas asociadas a distintas funciones del neurotransmisor. La vía nigroestriatal está relacionada con la función motora. En este circuito, la sustancia nigra pars compacta (SNPC) envía proyecciones al estriado dorsal y regula mediante la liberación de dopamina la actividad de los ganglios de la base. Por otro lado, en la vía mesocorticolímbica, el área ventral tegmental proyecta al núcleo accumbens, a la amígdala, al bulbo olfatorio, al hipocampo, al giro cingulado y a la corteza prefrontal orbital y media. Esta vía está asociada a funciones cognitivas, motivación y emociones. Por último, en la vía tuberoinfundibular, el núcleo arcuato del hipotálamo proyecta sobre la glándula pituitaria anterior y controla funciones neuroendócrinas como la secreción de prolactina [revisado en Rangel-Barajas et al. (2015)].

La dopamina ejerce sus diversas funciones actuando sobre sus receptores específicos. Estos receptores pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G. Los receptores de dopamina poseen cinco isoformas divididas en dos grandes familias, denominadas D1 y D2. Dentro de la familia D1 están los receptores D1 y D5; en cambio, D2, D3 y D4 pertenecen a la familia D2.

Los receptores de la familia D1 están acoplados positivamente a adenil ciclasa induciendo la acumulación de 3,5 adenina monofosfato cíclico (cAMP) intracelular y la activación de la kinasa dependiente de cAMP (PKA). Contrariamente, los receptores de la familia D2 están acoplados negativamente a adenil ciclasa, con lo cual su activación induce una disminución en la concentración de cAMP intracelular (Surmeier et al., 2007). Otra diferencia entre las dos familias de receptores de dopamina es que los receptores de la familia D1 son expresados postsinápticamente, y actúan como receptores heterólogos del neurotransmisor. Sin embargo, los receptores de la familia D2 se expresan tanto en las postsinapsis como en la presinapsis. En esta localización, estos receptores actúan como autorreceptores inhibiendo la liberación del neurotransmisor (Sokoloff et al., 2006, Rankin y Sibley, 2010, Rondou et al., 2010).

El protagonista: D2

El receptor D2, integrante de la familia de receptores de dopamina con el mismo

nombre, comparte un 75% de homología en la región transmembrana con el receptor D3 y un 53% con el receptor D4. Este receptor está mayormente expresado en el cuerpo estriado, el globo pálido, el núcleo accumbens, la amígdala, la corteza cerebral, el hipocampo y la glándula pituitaria. Además, se encuentra en las neuronas dopaminérgicas de VTA y SNPC (Missale et al., 1998, Gerfen, 2000, Vallone et al., 2000, Seeman, 2006).

Debido a un *splicing* alternativo de un exón de 87 pares de bases entre los intrones 4 y 5 del gen que codifica el receptor de dopamina D2, se da lugar a dos isoformas del receptor en cuestión, una larga y una corta (Giros et al., 1989, Monsma et al., 1989). Las dos isoformas difieren en 29 aminoácidos en el tercer *loop* intracelular del receptor. Ambas isoformas se expresan tanto presináptica como postsinápticamente. Algunas evidencias proponen la asignación de una función específica para cada isoforma. El trabajo de De Mei et al. (2009) demuestra que en ratones *knock out* para la forma larga del receptor de dopamina D2, la autorregulación de la liberación de dopamina no se ve afectada, sugiriendo que la isoforma corta del receptor sería la encargada de esa función. Sin embargo, el fenómeno también podría explicarse como compensación a la falta de la isoforma larga del receptor desde el desarrollo.

Como ya se nombró anteriormente, el receptor D2 en la presinapsis actúa como autorreceptor, proveyendo un mecanismo de retroalimentación negativa que controla la frecuencia de disparo de las neuronas dopaminérgicas, la síntesis de DA y la liberación de la misma cuando hay altos niveles extracelulares del neurotransmisor (Wolf y Roth, 1990, Missale et al., 1998, Sibley, 1999).

Estas observaciones de la función autoregulatoria del receptor D2 llevaron a estudiar la influencia del mismo frente a condiciones de hiperdopaminergia provocada por drogas de abuso. Trabajos realizados en humanos, primates y roedores mostraron que la vulnerabilidad a la adicción a drogas correlaciona con una menor disponibilidad del receptor D2 en el estriado (Thanos et al., 2001, Morgan et al., 2002, Volkow et al., 2009). Por otro lado, un estudio realizado en ratones mutantes condicionales para el receptor D2 en neuronas dopaminérgicas (autorreceptores) mostró que estos ratones presentan tasas elevadas de síntesis y liberación de dopamina, hiperlocomoción y supersensibilidad a los efectos psicomotores de la cocaína. Además, estos mutantes mostraron una incrementada preferencia de lugar asociado a cocaína, y motivación aumentada por una recompensa alimenticia (Bello et al., 2011). Estas evidencias sugieren un rol fundamental regulatorio del receptor D2 en las respuestas comportamentales frente a drogas de abuso y recompensas naturales.

Procesos controlados por dopamina: motivación por una recompensa

Entre los comportamientos guiados por dopamina nos centraremos un poco en la motivación que, como su definición lo indica, es “un conjunto de factores que determinan

las acciones de un sujeto". Hay vastas evidencias que aseguran que DA modula directamente los mecanismos de motivación. En un estudio realizado en humanos, se demostró que el "vigor" para responder a una prueba es mayor cuanto mayor es la recompensa. Además, en los mismos individuos se probó que la administración de L-DOPA, que aumenta la disponibilidad de DA, aumenta también la motivación para responder a la prueba utilizada (Beierholm et al., 2013). Por otro lado, un estudio realizado en ratas donde se registró DA por microdialisis en el núcleo accumbens en tiempo real mientras las ratas realizaban un ensayo de toma de decisiones, demostró que cuanto más grande era la recompensa mayor era el pico de DA observado y que, a su vez, este pico en los niveles del neurotransmisor aumentaba el vigor motivacional. Además, vieron que este efecto era directamente ocasionado por el aumento de DA y no de otros factores, ya que por medio de optogenética pudieron emular el aumento de DA en un determinado momento y ver que los animales respondían del mismo modo que cuando el pico de DA ocurría naturalmente frente a la expectativa por una recompensa (Hamid et al., 2016)

Rol de la dopamina en el proceso de estimación de intervalos cortos de tiempo.

Como ya se ha nombrado brevemente en la introducción general, la DA es un neurotransmisor clave para el proceso de estimación de intervalos cortos de tiempo. Por esta razón, en el Modelo Estriatal de pulso de Frecuencia, a este neurotransmisor se le ha asignado el rol de señalizador de comienzo y finalización en los eventos de estimación temporal. Esto parte de observaciones empíricas donde distintas modificaciones de la función dopaminérgica dieron por resultado alteraciones en la estimación de tiempo (Buhusi y Meck, 2005).

En primer lugar, estudios realizados en pacientes con enfermedades neurodegenerativas relacionadas con una disfunción dopaminérgica (como son la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington y la esquizofrenia) demostraron que la capacidad de estimar el tiempo se encuentra disminuida (Buhusi y Meck, 2005, Davalos et al., 2011, Harrington et al., 2011). Otros desórdenes psiquiátricos como la depresión y ansiedad, también generaron dificultades en la tarea de estimación temporal (Bauer, 2001).

Además, distintos polimorfismos en genes relacionados con la transmisión dopaminérgica encontrados en humanos (como DRD2/ ANKK1-Taq1a, COMT Val158Met and DAT 30 VNTR) fueron relacionados con la precisión en tareas de estimación temporal (Portnova et al., 2007, Wiener et al., 2011, Balci et al., 2013).

Ensayos farmacológicos en organismos modelo han permitido profundizar en la importancia del rol dopaminérgico sobre la estimación de intervalos cortos de tiempo. Ensayos realizados con agonistas y drogas potenciadoras de la actividad dopaminérgica producen una aceleración de la velocidad del reloj, lo cual conlleva a la subestimación de

un intervalo dado. Inversamente, antagonistas de receptores de dopamina desaceleran la velocidad de dicho reloj, lo cual trae aparejado la sobreestimación del intervalo (Meck, 1996, Drew et al., 2003, Matell et al., 2004, Buhusi y Meck, 2005, Taylor et al., 2007). Por otro lado, estudios realizados con ratones mutantes que sobreexpresan el receptor de dopamina de tipo D2 en estriado, demostraron que los mismos presentaban respuestas menos precisas en la tarea de estimación de tiempo comparados con los ratones de fenotipo salvaje (Drew et al., 2007) probablemente actuando sobre un mecanismo motivacional (Ward et al., 2009).

Por otra parte, la subexpresión de DAT, el cual está encargado de la recaptación postsináptica del neurotransmisor, causa altos niveles de dopamina extracelular. Los ratones con esta característica subestimaron los intervalos de tiempo estudiados. En este mismo trabajo, la administración de un antagonista D2 eliminó las diferencias entre los grupos, sugiriendo que el efecto sobre la estimación de tiempo de la disminución crónica de DAT está mediado por receptores de tipo D2 (Balci et al., 2010). Además, un trabajo reciente demostró que ratones *knockout* de DAT presentan una pérdida total del control temporal (Meck et al., 2012).

Si bien no se ha llegado a un acuerdo sobre la función exacta que cumpliría la dopamina en la estimación de intervalos cortos de tiempo, se cree que podría cumplir una función moduladora en la conexión entre las neuronas oscilatorias de la corteza y las neuronas del estriado (Matell y Meck, 2004).

Modulación circadiana de la señalización dopaminérgica.

Múltiples evidencias demuestran la conexión que existe entre el sistema circadiano y el sistema dopaminérgico. Todo indica que el sistema circadiano cumple un rol modulador sobre algunos elementos de la señalización dopaminérgica. Estudios realizados en animales mutantes de algunos genes circadianos, como por ejemplo los mutantes del gen *Clock*, indican que estos animales poseen alterada la actividad dopaminérgica en VTA, e incrementadas la expresión de la enzima TH y la síntesis de DA (Sidor et al., 2015). A su vez, los ratones mutantes para el gen *Per2*, presentan trastornos en comportamientos asociados a recompensa, además de una expresión alterada de la enzima MAO (Hampp et al., 2008).

Por otro lado, se sabe que los comportamientos asociados a la función dopaminérgica (como aquellos relacionados con la recompensa tanto por apareamiento como por drogas) poseen ritmos diarios (Webb et al., 2009). Por otro lado, varios elementos de la transmisión dopaminérgica, como MAO, TH, DAT y el receptor D3 están regulados por elementos del reloj circadiano que actúan sobre sitios *E-box* y RORE (*retinoid-related orphan receptor response element*) en las secuencias promotoras de estos genes, modulando así su expresión (Yoon y Chikaraishi, 1992, Kawarai et al., 1997,

Sleipness et al., 2007, Ikeda et al., 2013).

En un trabajo reciente, Ferris y colaboradores encontraron ritmos diarios en dopamina y sus principales metabolitos (DOPAC y HVA) en el estriado de ratas, donde el neurotransmisor mostró niveles aumentados en la transición entre la fase de luz y la de oscuridad. En cambio, DOPAC obtuvo su nivel máximo 6 horas después del pico de DA, consistente con el tiempo que tarda la metabolización de dopamina a DOPAC. Además, hallaron que la recaptación de DA por parte de DAT es rítmica y la curva que presenta coincide con los niveles de DA extracelular registrados. Por otro lado, encontraron que la sensibilidad de los autorreceptores D2 en la presinapsis es rítmica y que poseen mayor sensibilidad al agonista quinpirol durante la noche (Ferris et al., 2014).

Por otro lado, hay evidencias que sugieren una modulación cruzada entre los sistemas circadiano y dopaminérgico, ya que se demostró por ejemplo que el agonista de D2, quinpirol, inhibe la expresión de CLOCK y PER1 en neuronas estriatales en cultivo (Imbesi et al., 2009). Por otra parte, se comprobó que el bloqueo de receptores D2 elimina el ritmo de la proteína reloj PER2 en el estriado. A su vez, la activación diaria controlada de D2 mediante el uso de agonistas, logra restablecer el ritmo de expresión de PER2 en ratas que no poseen dopamina (Hood et al., 2010)

Si bien falta profundizar el conocimiento en la posible regulación dopaminérgica de elementos circadianos, estas evidencias en conjunto sugieren que hay una fuerte regulación circadiana en la señalización dopaminérgica y que, a su vez, existe un mecanismo de retroalimentación entre ambos sistemas que involucra la regulación de la expresión de algunos genes reloj mediada por la activación de elementos dopaminérgicos.

Objetivos

Objetivo general

Estudiar el funcionamiento del sistema dopaminérgico como conector de los sistemas circadiano y de estimación de intervalos cortos de tiempo

Objetivos específicos

- Determinar si un aumento transitorio en los niveles de dopamina mejora el desempeño de los ratones en el protocolo de estimación temporal en condiciones de luz constante.
- Evaluar los niveles de dopamina estriatal a lo largo del día en ratones en condiciones normales de luz oscuridad y en condiciones de luz constante.
- Determinar si la síntesis y degradación de dopamina en el estriado presenta una fluctuación a lo largo del día en ratones en condiciones de luz/oscuridad y en condiciones de luz constante.
- Estudiar posibles cambios en los niveles de mRNA del receptor de dopamina D2 presentes en el estriado a lo largo del día, en ratones bajo un ciclo luz/oscuridad y en ratones bajo condiciones de luz constante.
- Evaluar la expresión del receptor de dopamina D2 en el estriado a lo largo del día en ratones bajo un ciclo luz/oscuridad.
- Estudiar los niveles de expresión de mRNA y de proteína del gen reloj *Per2* en estriado en ratones bajo un ciclo luz/oscuridad y en luz constante.
- Determinar si hay cambios a lo largo del día en la motivación por una recompensa en ratones bajo un ciclo luz oscuridad y en condiciones de luz constante, como posible explicación de las diferencias encontradas en el desempeño de estos grupos en el protocolo de estimación temporal.

Materiales y Métodos

Animales.

Se utilizaron ratones machos C57/BL6 de 4-6 meses de edad, de origen comercial (provenientes del Bioterio Central de la Universidad Nacional de La Plata) y mantenidos en el Bioterio de la Universidad Nacional de Quilmes. Los animales fueron puestos bajo un fotoperiodo de 12 horas de luz seguidas de 12 horas de oscuridad (LO 12:12), ocurriendo el encendido de las luces a las 8 AM. Las condiciones de temperatura fueron constantes ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y los animales tuvieron libre acceso a agua y comida (alimento balanceado), salvo durante algunos protocolos comportamentales donde el acceso a la comida fue restringido con el fin de mantenerlos al 90% de su peso original (especificado en cada protocolo). En condiciones de LO se utilizó como referencia la hora de apagado de las luces, denominada por convención hora del sincronizador (*Zeitgeber time*) 12 (ZT 12). En condiciones de luz constante (LL), la intensidad de luz utilizada fue de 100 lux (medición realizada al nivel de las jaulas).

Registro de actividad locomotora.

Tal como se describió en los Métodos del Capítulo 1, los animales fueron ubicados en jaulas individuales de acero inoxidable provistas con una rueda de 15 cm de diámetro. Cada rueda contiene un imán que es detectado por un sensor magnético cada vez que gira (un evento por vuelta). La actividad locomotora fue registrada mediante el sistema de adquisición de datos Archon versión 2.1, diseñado en el laboratorio de Cronobiología de la Universidad Nacional de Quilmes. Los datos obtenidos fueron almacenados en una computadora PC.

Protocolo de estimación de intervalos cortos de tiempo.

Se utilizó el mismo protocolo previamente descrito en los Métodos del Capítulo 1 (página 51).

Estimación de intervalos cortos en individuos inyectados periódicamente con

L-

DOPA/Carbidopa.

Se llevó a cabo nuevamente el protocolo de estimación de tiempo previamente descrito utilizando dos grupos de ratones ($n=5/\text{grupo}$). Uno de ellos se encontraba bajo

un ciclo de LO 12:12 y el otro en condiciones de LL. La actividad locomotora en rueda de ambos grupos fue registrada previamente y a lo largo de todo el protocolo. El grupo mantenido en luz constante fue expuesto a esta condición 20 días antes del comienzo del ensayo, con el objeto de inducir arritmicidad circadiana. La disrupción de los ritmos circadianos en la actividad locomotora fue verificada por medio de actogramas registrados en los días previos al comienzo del protocolo de estimación de tiempo.

El grupo de ratones mantenidos en LO 12:12 fue entrenado y testeado durante su fase de oscuridad (ZT 16-19). El grupo entrenado bajo condiciones de luz constante fue entrenado a la misma hora reloj en la que se entrenó a los ratones en LO.

Las fases I y II se llevaron a cabo según el protocolo descrito anteriormente. En la sesión 7 de la fase III se comenzó a inyectar Levodopa/Carboxidopa (Lebocar[®] 100/25, Pfizer Farmacia Argentina). La dosis utilizada fue de 30 mg/kg, i.p., 30 minutos antes del entrenamiento. Como vehículo se utilizó solución fisiológica estéril.

Medición de Dopamina y DOPAC por HPLC-ED

Ratones bajo un ciclo LO o condiciones de luz constante (LL) fueron sacrificados por dislocación cervical y sus cerebros fueron removidos y conservados a -80°C. A partir de los mismos fueron tomadas muestras de estriado dorsal y homogeneizadas en 1 ml de ácido perclórico 0.3 M, centrifugadas por 15 minutos a 3000 g a 4°C y luego conservadas a -80°C. Posteriormente, los niveles de dopamina (DA) y de su metabolito ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) fueron medidos utilizando una columna 4.6 x 250-mm Hypersil Gold C18 (Termo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). La cuantificación se realizó exponiendo el efluente de la columna a potenciales oxidantes y reductores en serie, usando un sistema de triple electrodo (Coulchem II; ESA, Bedford, MA, USA; Eisenhofer et al., 1986). La concentración de cada muestra fue corregida mediante el uso de controles internos de DA y DOPAC y fue referida al contenido de proteínas totales de cada muestra. Las proteínas fueron cuantificadas con el fluorómetro Qubit (Invitrogen) y utilizando el kit *Quant-iT Protein Assay Kit* (Invitrogen).

Western Blot.

Con el objetivo de medir la expresión de la enzima limitante de la síntesis de dopamina, Tirosina Hidroxilasa (TH), y la proteína reloj PER2 en el cuerpo estriado, se utilizó la técnica de Western Blot. Los animales fueron sacrificados por decapitación y sus cerebros fueron inmediatamente disecados y puestos en hielo. A partir de ellos se obtuvieron secciones de estriado dorsal. Las mismas fueron homogeneizadas en 200 µl de buffer Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), conteniendo sacarosa 0.32 M, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaF 50 mM, ortovanadato de sodio 2 mM y un cóctel inhibidor de proteasas (SIGMA,

catálogo # P2714). La cuantificación de proteínas fue realizada con el fluorómetro Qubit (Invitrogen) y utilizando el kit *Quant- iT Protein Assay Kit* (Invitrogen). Las muestras fueron sometidas a un tratamiento desnaturalizante mediante el agregado de β -mercaptoetanol y calor. Luego fueron separadas por el método de electroforesis en gel de poliacrilamida 9% y transferidas a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Luego del bloqueo realizado con leche descremada durante una hora, las membranas fueron incubadas a 4°C durante 24 horas con anticuerpos diluidos 1:1000 en TTBS específicos para TH (Millipore, Billerica, MA, USA) y PER2 (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, USA). Para la relativización de las bandas obtenidas se utilizó un anticuerpo específico para α -tubulina (Sigma), el cual se incubó en las mismas condiciones que los anteriores. Posteriormente, las membranas fueron lavadas en TTBS e incubadas con los anticuerpos secundarios correspondientes. La presencia de inmunoreactividad se visualizó con el kit ECL (GE Healthcare, Piscataway, NJ) en placas radiográficas (AGFA). Las placas fueron escaneadas y la densitometría de las bandas se realizó utilizando el programa Image J (NIH, USA).

Extracción de mRNA y síntesis de cDNA

Ratones bajo un ciclo de LO 12:12 o en condiciones de LL fueron sacrificados por dislocación cervical a distintos puntos horarios a lo largo del día (0 hs, 4 hs, 8 hs, 12 hs, 16 hs y 20 hs). Los cerebros fueron extraídos y congelados instantáneamente a -80°C. Luego, los mismos fueron disecados, conservando el estriado dorsal y sustancia nigra. El RNA total de estas estructuras fue aislado utilizando Trizol (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA). Se realizó luego la cuantificación del mismo por espectrofotometría y verificación de su integridad en gel de agarosa desnaturalizante.

Posteriormente, 1 μ g de RNA fue transcripto de forma reversa utilizando oligo dT y Superscript RT (Invitrogen, Carlsbad, CA).

PCR en tiempo real

Para llevar a cabo esta técnica se utilizó el sistema Step One Plus (Termo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) y la mezcla de reacción Power SYBR Green PCR Master Mix (Termo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). El ciclado utilizado fue de 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Se realizaron curvas con distintas concentraciones de cDNA molde para calcular la eficiencia de amplificación de los *primers* y el tamaño del producto se chequeó en un gel de agarosa 2%. Los *primers* utilizados se detallan en la Tabla 2.1. Los resultados fueron cuantificados usando el método de Δ CT (Rao et al., 2013). Los niveles de *drd2* fueron normalizados a los niveles del gen de referencia *hprt*.

Tabla 2.1. Secuencia de los *primers* utilizados para PCR en tiempo real. El gen *drd2* corresponde al gen del receptor de dopamina D2 y el gen de referencia *hprt* (hipoxantina fosforibosiltransferasa), es el gen utilizado como control interno.

Gen	Secuencia <i>primer forward</i>	Secuencia <i>primer reverse</i>
<i>drd2</i>	CAGAAGGAGAAGAAAGCCACTC	GGTATAGATGATGGGGTTCACG
<i>hprt</i>	TGTTGGATACAGGCCAGAC	TGGCAACATCAACAGGACTC

PCR semicuantitativa

La PCR semicuantitativa se llevó a cabo utilizando un ciclado con los siguientes pasos: 2 minutos a 94°C (desnaturalización inicial) seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 92°C, 15 segundos a 51°C y 30 segundos a 72°C, y una extensión final de 5 minutos a 72°C. Los productos de la reacción fueron separados en un gel de agarosa 2% y teñidos con GelRed™. La cuantificación de las bandas obtenidas se realizó por densitometría utilizando el programa ImageJ (NIH, USA). Los *primers* utilizados se detallan en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Secuencia de los *primers* utilizados para PCR semicuantitativa. El gen *per2* corresponde gen que codifica para la proteína reloj PER2) y el gen de referencia *Gapdh* (Glicerinaldehído-3-fosfato deshidrogenasa) fue utilizado como gen de referencia.

Gen	Secuencia <i>primer forward</i>	Secuencia <i>primer reverse</i>
<i>Per2</i>	CGGATGCTCGTGGAATCTTCC	GGTTGTGCTCTGCCTCTGTC
<i>Gapdh</i>	GGGGAGCCAAAAGGGTCATCATCT	GACGCCTGCTTACCACCTTCTTG

Inmunohistoquímica de tejido de cerebro.

Los animales fueron anestesiados con un cóctel de ketamina/xilacina (80 mg/Kg y 10mg/Kg respectivamente) y perfundidos intracardíacamente con paraformaldehído 4% en PBS (solución salina con buffer fosfato, del inglés *Phosphate-Buffered Saline*). Los cerebros fueron extraídos, postfijados en paraformaldehído 4% en PBS y deshidratados en PBS/Sacarosa 30%. Luego fueron congelados y posteriormente se obtuvieron secciones coronales de 30 µm utilizando un crióstato (Leica, Wetzlar, Alemania). Los cortes, conteniendo el cuerpo estriado, fueron lavados con PBS 0,01 M y luego con PBST 0,4%. Se bloquearon los posibles sitios de unión inespecífica mediante incubación con una solución de leche descremada 10% en PBST 0,04% (PBS con 0.04% de Tritón) durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego, los cortes se incubaron con un anticuerpo específico

para el receptor de dopamina D2 (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA, 1:200) en PBST 0,04% por 24 horas a 4°C. Luego, fueron lavados con PBST 0,04% y se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con *alexa fluor 484* (Abcam 1:300) en PBST durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de lavados con PBST 0.04%, se montaron los cortes en portaobjetos de vidrio con medio de montaje con DAPI (Vectashield, Vector Laboratories, CA, USA). Los cortes fueron observados y fotografiados utilizando un microscopio de fluorescencia (Leica DMI4000 B, Wetzlar, Alemania) con un aumento de 1,5X.

La cuantificación de los cortes se realizó mediante el programa Fiji (Image J, NIH, USA). Se les sustrajo a las imágenes el *background* calculado para cada fotografía. Luego se midió la intensidad de fluorescencia promedio en la región del estriado dorsal (izquierdo y derecho por separado) y se la relativizó a la fluorescencia promedio de una región de similar extensión de la corteza (derecha o izquierda, respectivamente).

Protocolo de motivación hacia una recompensa

Con el objeto de conocer si el estado motivacional en ratones posee una variación diaria, se utilizó el protocolo de tasa progresiva o *Progressive Ratio (PR)* descrito en la literatura (Richardson y Roberts, 1996, Drew et al., 2007). El mismo se llevó a cabo en jaulas de comportamiento para ratones MED-307W-D1 Med-Associates (St Albans, VT). Brevemente, las dimensiones de las mismas fueron 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 se encuentran dos palancas retráctiles. Entre ambas palancas, se localiza un comedero en donde se depositan las recompensas por medio de un sistema dispensador de *pellets*. La recompensa consistió en un *pellet* de comida a base de granos de 20 mg (Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ, USA).

El protocolo consistió en una fase de condicionamiento operante con refuerzo positivo, donde cada presión de la palanca le otorga al animal un *pellet* de alimento balanceado. Se utilizó una sola de las palancas, balanceando entre los animales el uso de la palanca izquierda y derecha. Luego de que cada animal alcanzara las 60 recompensas obtenidas en una sesión de 60 minutos, fue promovido a la fase de PR. En esta fase, el “precio” de la recompensa aumenta conforme el animal las va obteniendo, es decir que cada vez debe realizar más presiones de la palanca para recibir una *pellet* de alimento a lo largo de los 120 minutos de la sesión. El aumento progresivo de las presiones necesarias para recibir la recompensa viene dado por la ecuación:

$$\text{Número de presiones necesarias} = 5e^{ik}$$

Donde i es igual al número de recompensas, y k es una constante con un valor igual a 0,2, lo cual da lugar al siguiente esquema de recompensas:

Progressive ratio array = 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 (Richardson y Roberts, 1996). Es decir, en el primer ensayo el animal debe realizar una sola presión de la palanca para obtener la recompensa de comida, en el segundo ensayo debe realizar 2 presiones de palanca, en el tercero 4 presiones, y así sucesivamente. Se define el "punto de quiebre" del ratón ("*mouse's break point*") como el punto en la serie en el cual la respuesta cesa, y refleja el máximo esfuerzo que el animal está dispuesto a hacer para obtener un *pellet* de comida.

Los parámetros que denotan el nivel motivacional del animal son el número de recompensas obtenidas y la cantidad de presiones de palanca realizadas en el lapso de 120 minutos. Asimismo, la cantidad de respuestas que realizaron los animales durante la sesión de PR se representó como una curva de supervivencia de Kapan-Meier [*Kapan-Meier survival curve*, Drew et al. (2007)] para cada grupo experimental utilizado.

Los ratones utilizados fueron pesados y puestos bajo un régimen de restricción calórica, lo cual los mantuvo entre el 85% y el 90% de su peso original durante todo el protocolo de entrenamiento para realzar la motivación por conseguir el alimento.

Estadística

En todos los casos se chequeó la normalidad de los datos con el test de Shapiro-Wilk. En caso en que los datos fueron normales se procedió a utilizar *tests* estadísticos paramétricos. Se utilizaron pruebas de ANOVA de dos vías con medidas repetidas para analizar parámetros en dos grupos distintos a través de las sesiones. Se utilizó el test de ANOVA de una vía para el análisis de los parámetros analizados en tres o más grupos. En el caso de la comparación de una variable entre dos grupos, se utilizó el test de Student (*t*-test) a dos colas. Se utilizó también la curva de supervivencia de Kapan-Meier para la prueba de motivación.

Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Resultados

Efecto de la administración de L-DOPA sobre la estimación de intervalos cortos de tiempo.

Como se mencionó en el capítulo anterior, la condición de luz constante induce un alargamiento de período seguido de arritmicidad circadiana en ratones. Por otro lado, también se mostró que los ratones sometidos a esta condición derivan en la pérdida total del control temporal en el protocolo de estimación de tiempo realizado. Con el objeto de evaluar si un aumento en la disponibilidad de dopamina podría mejorar el procesamiento temporal en los animales arrítmicos, se inyectó un precursor de la síntesis de DA para incrementar los niveles de dicho neurotransmisor en el sistema nervioso central. Para ello, se administró por vía intraperitoneal (i.p.) levodopa (L- DOPA)/carbidopa (30/7.5 mg/kg) o vehículo (solución fisiológica) 30 minutos antes del inicio del protocolo de estimación temporal. La administración se realizó a partir de la fase III de entrenamiento (ensayos de intervalo fijo o FI).

Durante las fases I y II de entrenamiento, en las que el paradigma evaluado fue la adquisición de la relación trabajo-recompensa, los grupos no presentaron diferencias significativas en el número total de respuestas (Figura 2.1 A, fase I $p=0,39$; Figura 2.1 C fase II $p=0,83$, t-test a dos colas, $n=10$ /grupo), ni en la velocidad de adquisición de la respuesta (Figura 2.1 B, fase I $p=0,40$ para el factor grupos y $p=0.0002$ para el factor sesiones; Figura 2.1 D, fase II $p=0,81$ para el factor grupos y $p=0.28$ para el factor sesiones; ANOVA de medidas repetidas a lo largo de las cinco sesiones de cada fase, $n=10$ /grupo). Estos resultados son similares a los previamente descriptos en el Capítulo 1 (Figura 1.16).

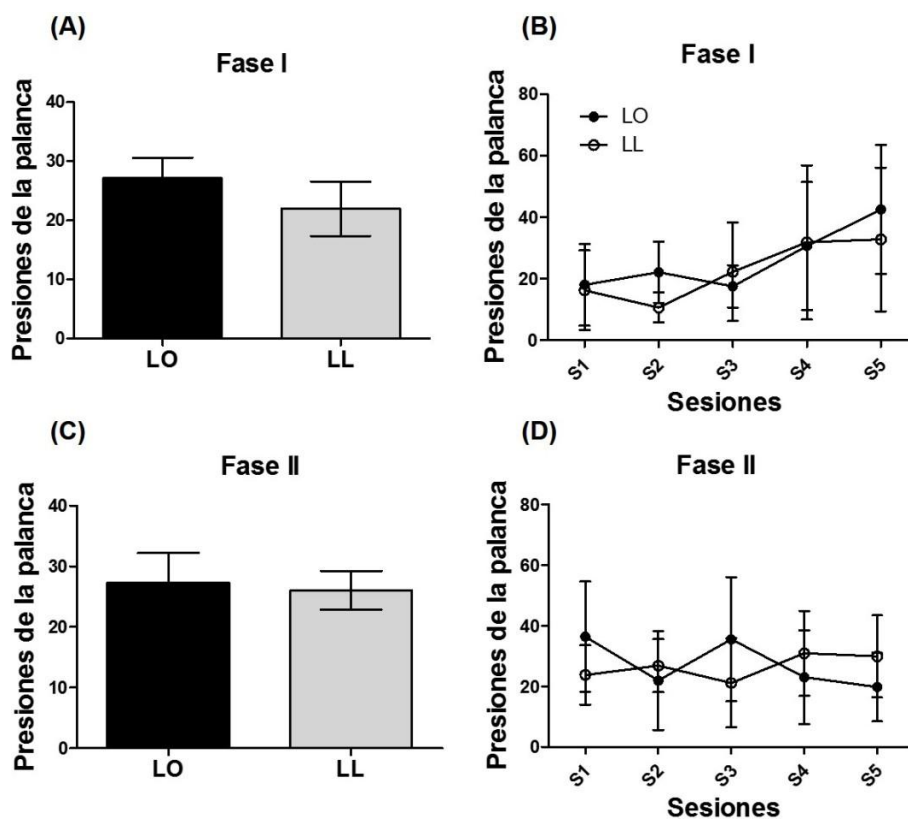


Figura 2.1. Fase I llen los ratones LO vs. LL. (A) Promedio de las presiones totales realizadas durante las cinco sesiones de fase I para los grupos LO (barra negra) y LL (barra gris). $p = 0,3902$, t-test a dos colas, $n=8$ /grupo. (B) Evolución del promedio de las presiones a través de las cinco sesiones de fase I para los grupos LO (círculos negros) y LL (círculos blancos). $p = 0,3989$ para el factor grupos, $p = 0,0002$ para el factor sesiones, ANOVA a dos vías de medidas repetidas, $n=8$ /grupo. (C) Promedio de las presiones totales realizadas durante las cinco sesiones de Fase II para los grupos LO (barra negra) y LL (barra gris). $p = 0,8351$, t-test a dos colas, $n=8$ /grupo. (D) Evolución del promedio de presiones a través de las cinco sesiones de fase II para los grupos LO (círculos negros) y LL (círculos blancos). $p = 0,8076$ para grupos, $p = 0,2780$ para sesiones, ANOVA a dos vías de medidas repetidas, $n=10$ /grupo). Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

Durante la fase III de entrenamiento, se comenzó con la administración de la droga (o su respectivo vehículo) tanto en el grupo de ratones en condiciones de LO como en LL. En esta instancia del protocolo, los ratones en condición de LO tratados con L-DOPA o vehículo no presentaron diferencias significativas en su desempeño en la tarea de estimación temporal (Figura 2.2). Ambos grupos mostraron un aumento del índice S1 a lo largo de las sesiones, pero no se encontraron diferencias significativas entre L-DOPA versus vehículo ($p = 0,002$ para el factor sesiones, $p = 0,06$ para el factor tratamiento, ANOVA a dos vías de medidas repetidas comparando el índice S1 promedio a lo largo de los cuatro bloques de sesiones, $n=5$ /grupo). Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas entre los ratones en condiciones de LL tratados con L-DOPA versus vehículo. Los animales tratados con vehículo no aumentaron su respuesta en un tiempo cercano al intervalo *target*, esto se refleja en el bajo índice S1 a lo largo de las sesiones (Figura 2.2). Contrariamente, los ratones en LL tratados con L-DOPA mostraron valores más altos de este índice, denotando una mejor *performance* en el incremento de la respuesta cercana al intervalo *target* ($p = 0,0002$ para el factor sesiones, $p = 0,0437$ para el factor tratamiento, ANOVA a dos vías de medidas repetidas, $n=5$ /grupo).

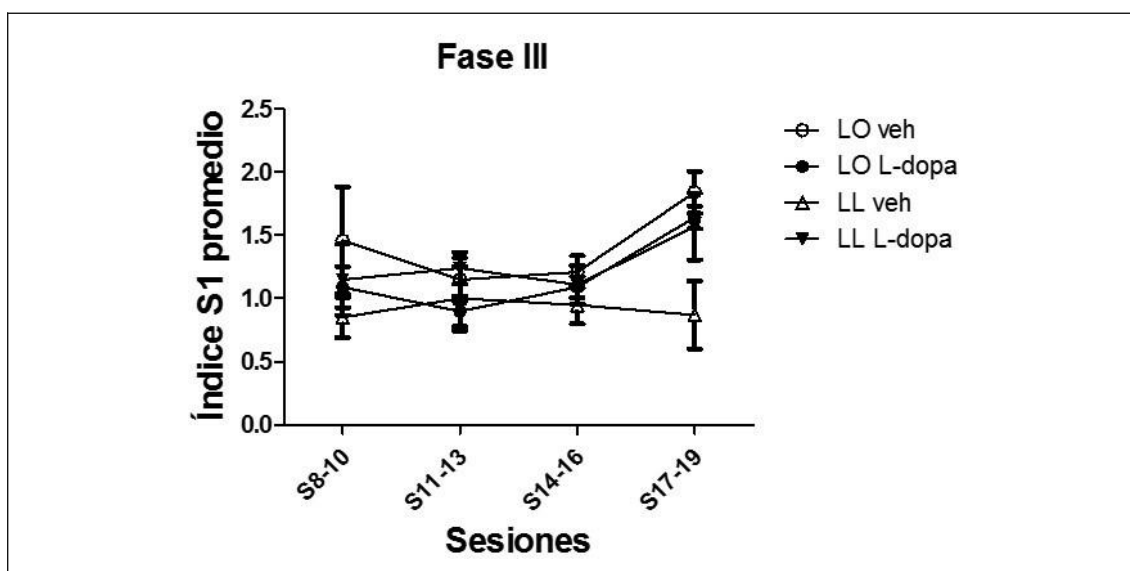


Figura 2.2. Fase III en los grupos de ratones LO vs. LL con administración de L-DOPA. Evolución de los promedios del índice S1 a través de las sesiones para los distintos grupos: LO con administración de vehículo (círculos blancos), LO con administración de L-DOPA (círculos negros), LL con administración de vehículo (triángulos blancos) y LL con administración de L-DOPA (triángulos negros). LO: $p=0.002$ para el factor sesiones, $p=0.06$ para el factor tratamiento, ANOVA a dos vías de medidas repetidas comparando el índice S1 promedio a lo largo de los cuatro bloques de sesiones, $n=5/\text{grupo}$). LL: $p=0.0437$ para el factor tratamiento, $p=0.0002$ para el factor sesiones, ANOVA a dos vías de medidas, $n=5/\text{grupo}$). Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

A partir de las últimas cuatro sesiones de la fase IV de entrenamiento (sesiones 21-24), se confeccionaron las curvas de respuesta normalizada promedio para los distintos grupo de ratones y tratamientos (Figura 2.3). Los ratones bajo un ciclo LO con administración de vehículo lograron focalizar la respuesta temporal cercana al intervalo *target*, alcanzando de esta forma una respuesta similar o ajustable a una curva de tipo Gaussiana centrada en 24 segundos (Figura 2.3 A). A su vez, en los ratones bajo un ciclo LO no se observaron efectos significativos producto de la administración de L-DOPA (Figura 2.3B).

En concordancia con los resultados mostrados en el Capítulo 1, los ratones en condiciones de luz constante, en este caso tratados con vehículo, no adquirieron una respuesta focalizada en el intervalo *target*; en su lugar, mostraron una tasa de respuesta dispersa durante todo el ensayo (Figura 3.3C). Sin embargo, los ratones en la misma condición de luz (LL) tratados con L-DOPA, mostraron una mejora en el desempeño de la tarea (Figura 3.3 D). Si bien los mismos no alcanzaron a producir una tasa de respuesta que pudiera ajustarse a una curva de tipo Gaussiana centrada en 24 segundos, sí incrementaron su respuesta en tiempos cercanos al intervalo *target*, sugiriendo un mejoramiento en la adquisición del control temporal.

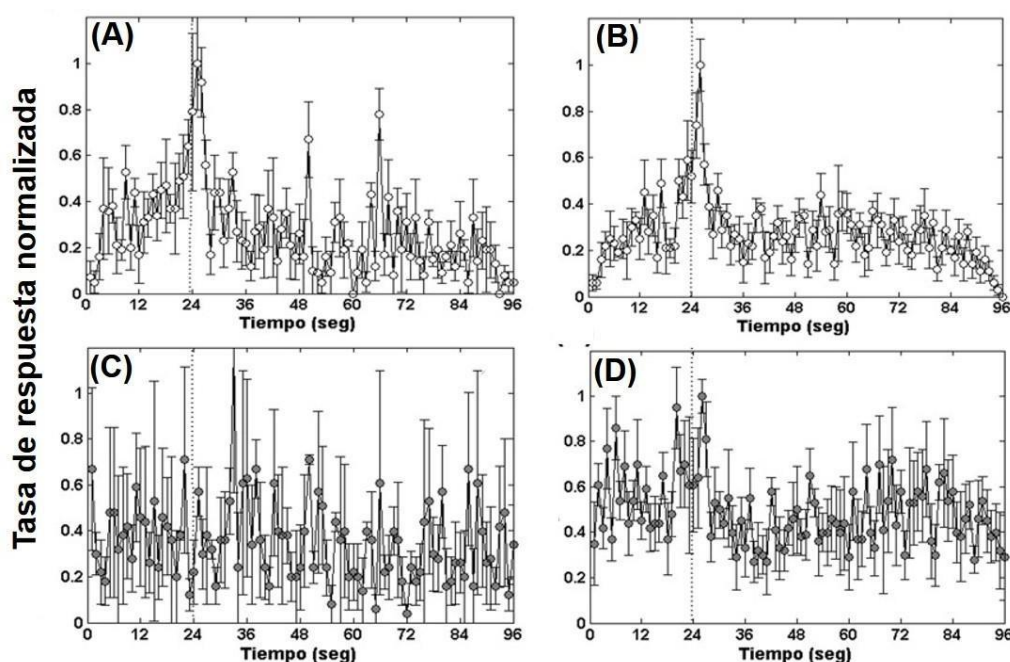


Figura 3.3. Efecto de la administración de L-DOPA sobre la estimación de tiempo. Los gráficos muestran la tasa de respuesta normalizada para cada grupo en función del tiempo durante el último bloque de sesiones PI en la fase IV del protocolo (sesiones 21-24). (A) ratones en LO con administración de vehículo, (B) ratones en LO con administración de L-DOPA, (C) ratones en LL con administración de vehículo y (D) ratones en LL con administración de L-DOPA. La línea punteada corresponde al intervalo *target*, 24 segundos. Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

Al no ser posible el ajuste de los datos a una curva de tipo Gaussiana para ninguno de los dos grupos de ratones en condición de luz constante, se utilizaron los índices S1 y S2 como parámetros de adquisición de la respuesta.

El parámetro S1 (adquisición del comienzo de la respuesta), no mostró diferencias significativas entre los grupos o tratamientos (figura 2.4 A, LO: $p < 0.001$ para sesiones, $p = 0.16$ para tratamiento, LL: $p > 0.05$ para sesiones, $p > 0.05$ para tratamiento, ANOVA a dos vías de medidas repetidas, $n = 5/\text{grupo}$).

Ambos grupos de ratones bajo un ciclo LO tratados con L-DOPA o vehículo, mostraron pendientes similares en las curvas de índice S2 a lo largo de las sesiones, es decir, adquirieron el aprendizaje de detención de su respuesta con la misma rapidez a lo largo de las sesiones (Figura 2.4 B, círculos blancos y negros; $p < 0.0001$ para sesiones, $p = 0.10$ para tratamiento, ANOVA a dos vías de medidas repetidas; $n = 5/\text{grupo}$). Sin embargo, pudo verse que los ratones en LL tratados con vehículo mostraron valores bajos del índice S2 a lo largo de las sesiones, denotando un pobre aprendizaje de finalización de la respuesta (Figura 2.4 B, triángulos blancos). Contrariamente, el

grupo de ratones bajo la misma condición de luz pero tratados con L-DOPA, mostró una curva con pendiente positiva para el índice a lo largo de las sesiones, lo cual indica un aprendizaje en el cese de la respuesta luego del intervalo dado (Figura 2.4 B, triángulos negros; $p=0.0128$ para sesiones, $p=0.0381$ para tratamiento, ANOVA a dos vías de medidas repetidas).

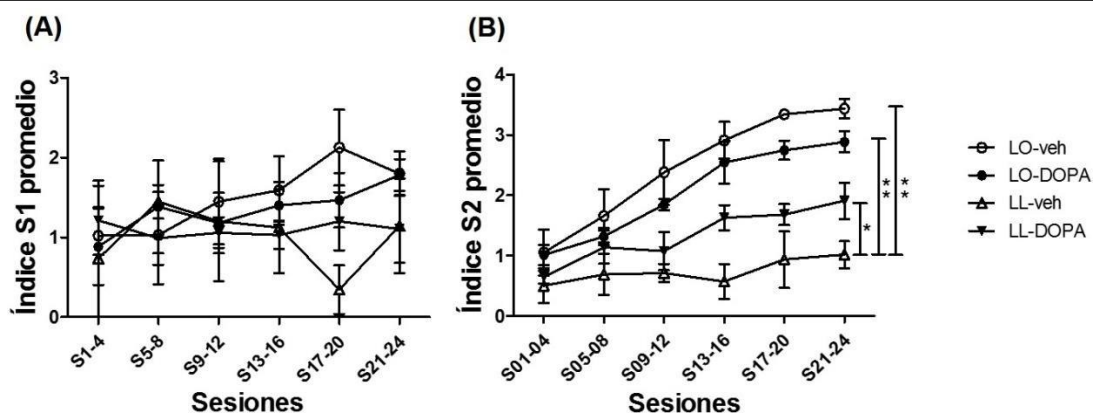


Figura 2.4. Efecto de la administración de L-DOPA sobre los índices S1 y S2. (A) Promedio del índice S1 y (B) S2 a lo largo de las sesiones para los grupos: LO+vehículo (círculos blancos), LO+L-DOPA (círculos negros), LL+vehículo (triángulos blancos) y LL+L-DOPA (triángulos negros). S1 LO: $p < 0.001$ para sesiones, $p = 0.16$ para tratamiento; LL: $p > 0.05$ para sesiones, $p > 0.05$ para tratamiento, ANOVA a dos vías de medidas repetidas, $n = 5$ /grupo. S2 LO: $p < 0.0001$ para sesiones, $p = 0.10$ para tratamiento; LL: $p = 0.0128$ para sesiones, $p = 0.0381$ para tratamiento, ANOVA a dos vías de medidas repetidas, $n = 5$ /grupo.

Por medio del análisis *trial por trial* de las últimas cuatro sesiones de los ensayos de prueba de fase IV (sesiones 21-24) para cada individuo de cada grupo, se obtuvieron los valores de tiempo, expresados en segundos, correspondientes a los siguientes parámetros: el comienzo de la respuesta, el final de la respuesta, y la posición de pico. En este caso, no se observaron diferencias significativas para los parámetros analizados entre los grupos luz/oscuridad con L-DOPA, luz/oscuridad con vehículo y luz constante con L-DOPA (Figura 2.5; $p = 0.83$ para el parámetro “comienzo”, $p = 0.10$ para el parámetro “final” y $p = 0.35$ para la ubicación del pico, ANOVA de una vía, $n = 5$ /grupo). No fue posible realizar este análisis para el grupo en luz constante tratado con vehículo por no poseer datos que se ajustaran a la transición alta-baja-alta en la respuesta, como se explica en los métodos del capítulo anterior (página 60).

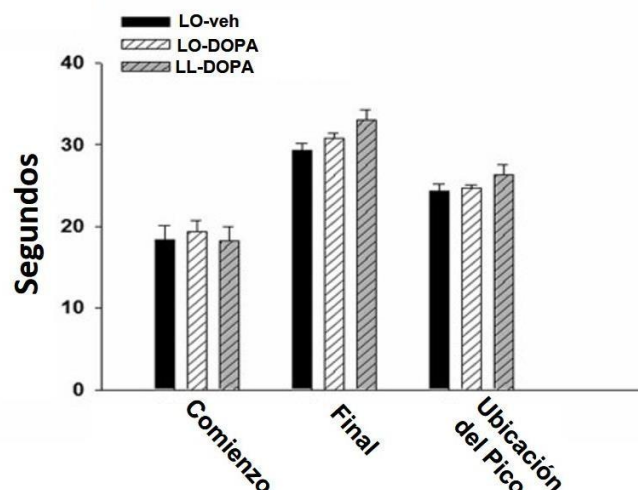


Figura 2.6. Efecto de la administración de L-DOPA en análisis *trial por trial*. Parámetros “comienzo”, “final” y “ubicación del pico” extraídos del análisis *trial por trial* del bloque de sesiones 21-24 para los grupos: LO+vehículo (barras negras), LO+L-DOPA (barras gris claro) y LL+L-DOPA (barras gris oscuro). Los mismos no mostraron diferencias significativas en los parámetros analizados. $p=0.83$ para el parámetro “comienzo”, $p=0.10$ para el parámetro “final” y $p=0.35$ para la ubicación del pico, ANOVA de una vía, $n=5$ /grupo.

Ritmo diario en los niveles de dopamina estriatal

Con el objetivo de corroborar si la diferencia en la estimación temporal encontrada entre los grupos de ratones sometidos a distintos esquemas de luz se correspondía con una diferencia en los niveles de DA en el estriado, se midió el contenido del neurotransmisor a lo largo del día en muestras de estriado dorsal provenientes de ratones bajo un ciclo luz/oscuridad y ratones en condiciones de luz constante.

Los ratones bajo un ciclo normal LO 12:12 mostraron una oscilación diaria del contenido de DA estriatal (Figura 2.7 A; $p=0.0003$, ANOVA de una vía seguido de test de Tukey, $n=6$ /punto horario). Los valores máximos se registraron durante la noche, mientras que durante el día se alcanzaron los valores mínimos de la oscilación. Este resultado correlaciona con la diferencia diaria en la estimación de intervalos cortos de tiempo mostrados en el Capítulo I, donde la tarea fue más precisa durante la noche, cuando los niveles de dopamina alcanzan su máximo.

Por el contrario, en los ratones en condiciones de luz constante no se encontró un ritmo en los niveles de dopamina a lo largo del día (Figura 2.7 B; $p=0.33$, ANOVA de una vía, $n=6$ /punto horario). Este resultado, junto con los resultados comportamentales observados en el Capítulo I, sugieren que la falta de control temporal observada en los animales con arritmicidad circadiana producida por luz constante, podría ser producto de la pérdida del ritmo de dopamina

estriatal. Este ritmo sería fundamental para la correcta estimación temporal en el modelo animal estudiado. Además, los resultados indicarían que durante el momento del día en que los niveles de DA son mayores, la *performance* en la tarea de estimación del tiempo es superior a aquella en momentos donde se registran niveles más bajos del neurotransmisor.

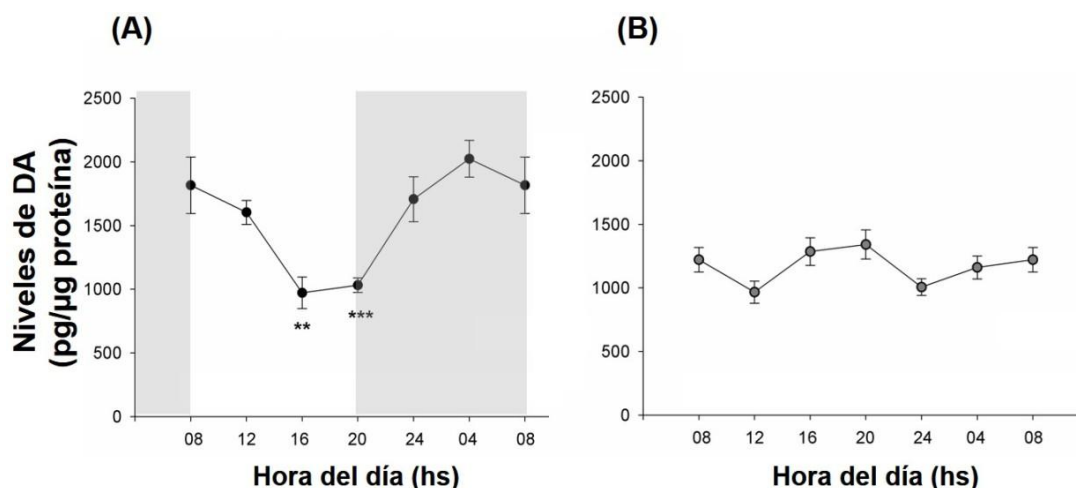


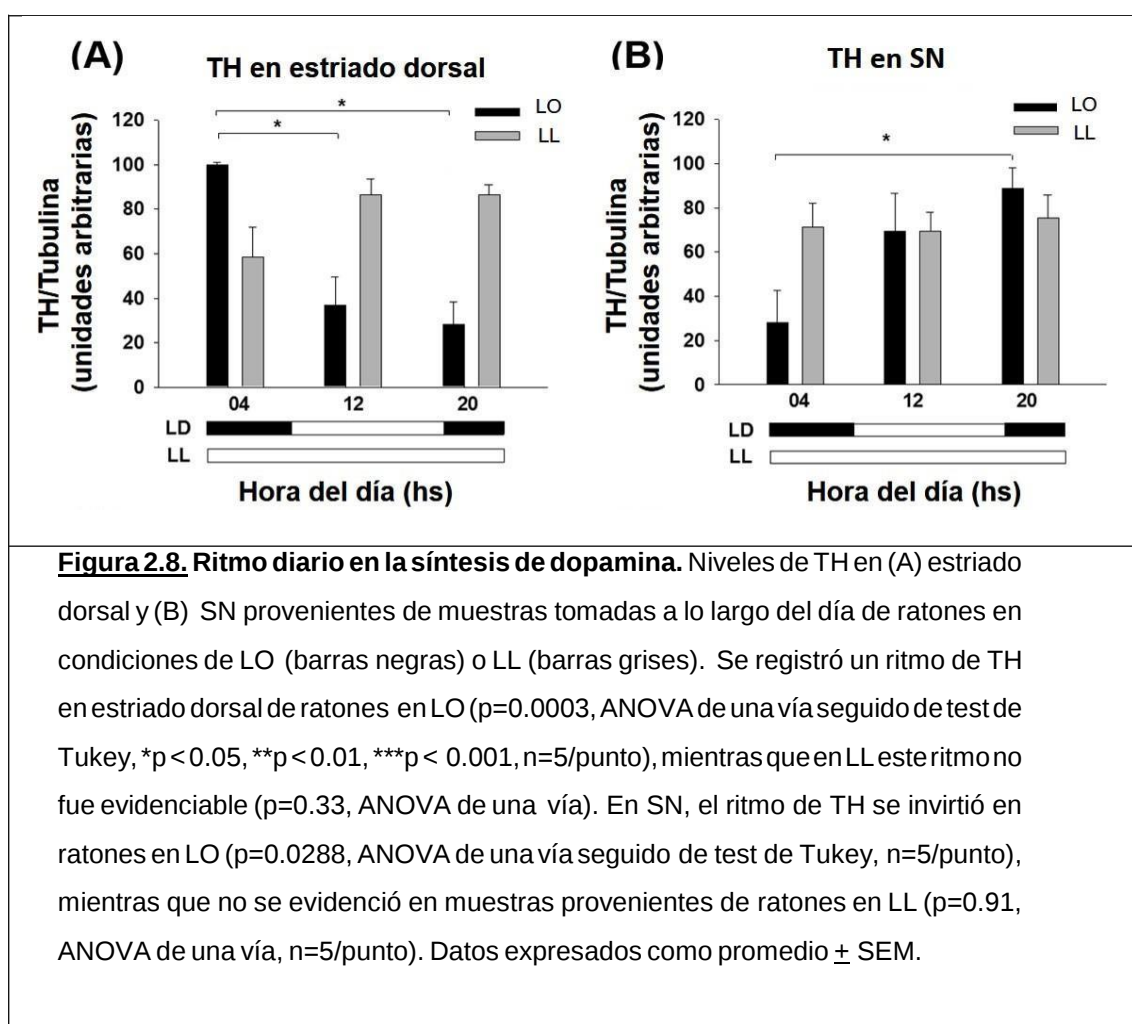
Figura 2.7. Niveles de DA estriatal en condiciones LO y LL. El gráfico representa los niveles de dopamina estriatal proveniente de muestras de ratones en condiciones LO (A) y LL (B). Los ratones en LO presentan un ritmo diario en los niveles de DA ($p=0.0003$, ANOVA de una vía seguido de test de Tukey, $**p<0.01$ y $***p<0.001$), mientras que en los ratones en condiciones de LL este ritmo no se evidencia ($p=0.33$, ANOVA de una vía). Datos expresados como promedio $\pm$ SEM. $N=6$ /punto horario.

Ritmos diarios en la síntesis y degradación de dopamina estriatal

La Tirosina Hidroxilasa (TH) es la enzima limitante en el proceso de síntesis de DA (Daubner et al., 2011). Por esta razón, los niveles de TH son utilizados como una medida indirecta de la síntesis del neurotransmisor en un momento dado. Con el objeto de determinar si la síntesis de DA poseía un ritmo diario, los niveles de esta enzima fueron medidos utilizando la técnica de Western Blot. Las mediciones se realizaron a partir de muestras de estriado dorsal (ED) y sustancia nigra (SN) provenientes de ratones bajo un ciclo de LO 12:12 y ratones en LL. Se tomaron tres puntos: uno a mitad del día (12hs), uno en la transición entre el día y la noche (20hs) y otro en la mitad de la noche (4hs). Las muestras provenientes de ratones en LL se tomaron a la misma hora reloj en que se tomaron las de los ratones en LO.

En el estriado dorsal los niveles de TH presentaron un ritmo diario, con niveles mayores durante la noche tardía (Figura 2.8 A, barras negras; $p=0.0003$, ANOVA de una vía seguido de test de Tukey, $n=5$ /punto). Sin embargo, este ritmo no fue evidenciable en muestras provenientes de

ratones en luz constante, lo que sugiere que esta condición de luz actúa aboliendo el ritmo de la enzima en esta estructura, repercutiendo en la síntesis del neurotransmisor (Figura 2.8A, barras grises, $p=0.33$, ANOVA de una vía, $n=5$ /punto). Por otro lado, en SN también se registró un ritmo en los niveles de la enzima, pero en fase contraria a los hallados en el estriado dorsal, es decir, con niveles altos durante el día y noche temprana (Figura 2.8B, barras negras, $p=0.0288$, ANOVA de una vía seguido de test de Tukey, $n=5$ /punto). En esta región cerebral, la luz constante causó el mismo efecto disruptivo sobre el ritmo de TH que en estriado dorsal (Figura 2.8B, barras grises, $p=0.91$, ANOVA de una vía, $n=5$ /punto).



Para evaluar si existía un ritmo diario en la degradación del neurotransmisor estudiado, se realizó la cuantificación del producto de metabolización del mismo por acción de la enzima Monoamina Oxidasa (MAO). La degradación o *turnover* se cuantificó a través de la relación entre dopamina (DA) y su producto de metabolización (ácido 3,4- Dihidroxifenilacetico o DOPAC).

Se encontró que las muestras provenientes de ratones bajo un ciclo normal LO 12:12

poseían un ritmo en la degradación de dopamina (Figura 2.9 A; $p=0.029$, ANOVA de una vía seguido de test de Tukey, $n=6$ /punto). El ritmo presenta un máximo en el momento de transición entre las fases de luz y oscuridad. Por el contrario, en muestras provenientes de ratones en LL no se apreció un ritmo en la degradación del neurotransmisor (Figura 2.9 B; $p=0.36$, ANOVA de una vía, $n=6$ /punto).

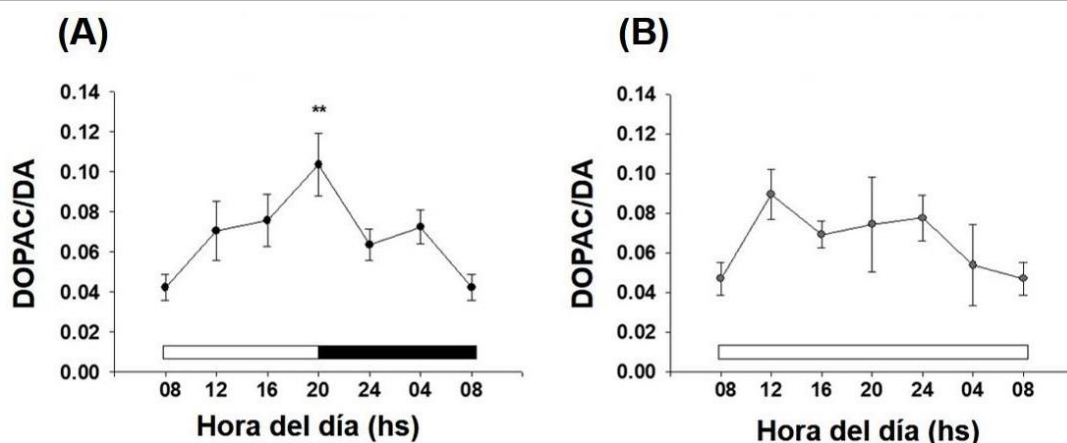


Figura 2.9. Ritmo diario en la degradación de DA estriatal. Degradación de dopamina en el estriado (expresada como DOPAC/DA) en muestras provenientes de ratones en (A) LO y (B) LL. En LO se encontró un ritmo significativo en la degradación ($p=0.029$, ANOVA de una vía seguido de test de Tukey, $**p<0.01$, $n=6$ /punto), mientras que este ritmo no se evidenció en muestras de ratones en LL ($p=0.36$, ANOVA de una vía seguido de test de Tukey, $n=6$ /punto). Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

En conjunto, los datos obtenidos denotan que en condiciones de arritmicidad circadiana generadas por exposición a luz constante, no existen ritmos en la síntesis ni en la degradación del neurotransmisor en estudio. Esto explicaría la falta de ritmo diario de DA en los ratones bajo estas condiciones.

Expresión de Per2 en estriado y sustancia nigra

En un trabajo realizado por Hampp y colaboradores en 2008 se pudo ver que la proteína reloj PER2 está asociada a la regulación de elementos que participan en la transmisión dopaminérgica, como por ejemplo la enzima MAO. Por otro lado, se sabe que la activación diaria de los receptores de DA de tipo D2 mediante agonistas dopaminérgicos restablece el ritmo de expresión de PER2 en ratas que no poseen dopamina (Hood et al., 2010). Con el objeto de verificar si el mRNA de *per2* y su producto proteico presentaban patrones de expresión rítmicos

en estructuras relacionadas con la estimación de intervalos cortos de tiempo, se utilizaron las técnicas de RT-PCR semicuantitativa y Western Blot. Al igual que para la medición de TH, las muestras fueron tomadas en tres puntos: mitad del día (12 hs), transición día-noche (20 hs) y mitad de la noche (4 hs).

Se encontró que la expresión del mRNA de *per2* posee una expresión rítmica en estriado dorsal de ratones en LO. Esta oscilación diaria presentó niveles mayores de *per2* durante el día (Figura 2.10 A, barras negras. $p = 0.0124$ ANOVA de una vía seguido de test de Tukey, $n=5$ /punto horario). Sin embargo, este ritmo diario no se pudo percibir en las muestras provenientes de ratones en LL (Figuras 2.10 B, barras grises. $p=0.22$, ANOVA de una vía, $n=5$ /punto horario). Por otro lado, el mRNA también presentó un ritmo diario en SN en ratones en LO, pero la máxima expresión se dio durante la noche, con fase contraria al estriado dorsal (Figura 2.10 B, barras negras. $p<0.0001$, ANOVA de una vía seguido por test de Tukey, $n=5$ /punto horario). Al igual que en estriado dorsal, el ritmo de mRNA de *per2* en SN no fue evidenciable en las muestras provenientes de ratones en LL (Figura 2.10 B, barras grises. $p=0.41$ ANOVA de una vía seguido de test de Tukey, $n=5$ /punto horario).

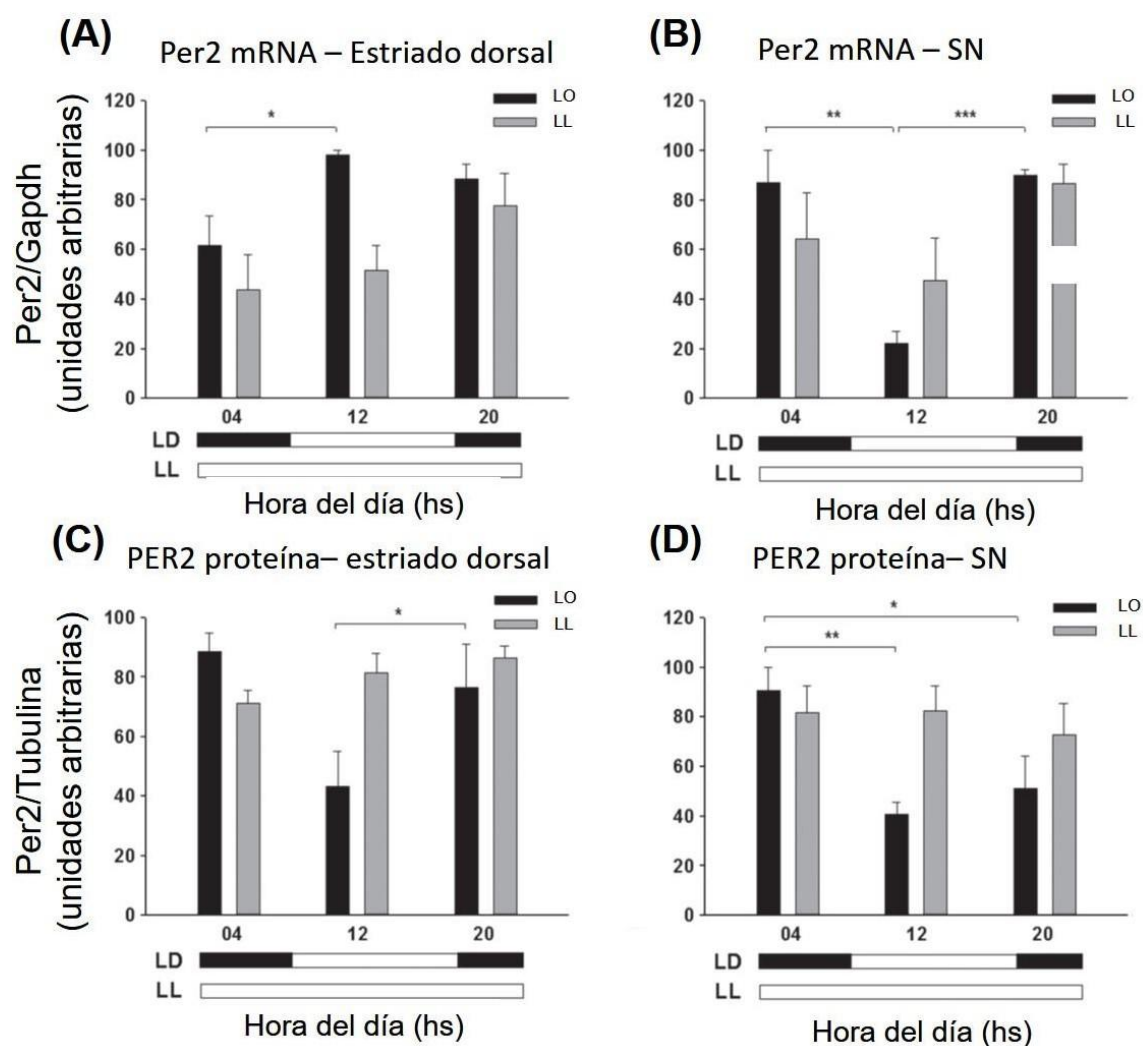


Figura 2.10. Expresión de Per2 en estriado y sustancia nigra. El grafico muestra la expresión de mRNA de Per2 en (A) estriado dorsal y (B) SN, y la expresión de la proteína PER2 en (C) estriado dorsal y (D) en SN en ratones en LO (barras negras) y LL (barras grises). Se observaron ritmos diarios en la expresión del mRNA de per2 en ambas estructuras en ratones en LO ($p=0.0124$ para estriado dorsal y $p<0.0001$ para SN, ANOVA de una vía seguido de test de Tukey), pero no se encontró un patrón rítmico en las muestras provenientes de ratones en LL ($p=0.22$ para estriado dorsal y $p=0.41$ para SN, ANOVA de una vía). (C) y (D) muestran la expresión de la proteína PER2 en estriado dorsal y SN respectivamente, en ratones en LO (barras negras) y LL (barras grises). La expresión de PER2 es rítmica en ambas estructuras en ratones en LO ($p=0.034$ para estriado dorsal y $p=0.0084$ para SN, ANOVA de una vía seguido de test de Tukey), pero en ratones LL el ritmo no fue evidenciable ($p=0.14$ para estriado dorsal y $p=0.41$ para SN, ANOVA de una vía). Datos expresados como promedio $\pm$ SEM. $n=5$ /punto horario/grupo. * $p<0.05$, ** $p<0.01$ y *** $p<0.001$. GAPDH, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa.

En el caso de la proteína PER2 también se hallaron oscilaciones diarias en estriado dorsal y SN en muestras de ratones en LO. En este caso, se observó que los niveles de la proteína PER2 en estriado dorsal comienzan a aumentar en la transición del día y la noche y se mantienen altos durante la noche (Figura 2.10 C, barras negras. $p=0.034$ ANOVA de una vía seguido de test de Tukey, $n=5$ /punto horario). Sin embargo, en SN se observa un máximo de expresión más agudo, localizado en el punto de la noche (Figura 2.10 D, barras negras. $p=0.0084$ ANOVA de una vía seguido de test de Tukey, $n=5$ /punto horario). Por otra parte, en ambas estructuras se pudo evidenciar la pérdida del ritmo diario de expresión de la proteína PER2 en muestras provenientes de ratones en LL (Figuras 2.10 C y D respectivamente, barras grises. $p=0.14$ para estriado dorsal y $p=0.41$ para SN, ANOVA de una vía, $n=5$ /punto horario).

Estos resultados demostraron que en ambas estructuras tanto el mRNA de *per2* como su producto proteico son rítmicos en regiones del cerebro importantes en el proceso de estimación de intervalos cortos de tiempo. A su vez, que los ritmos encontrados en cada una de estas estructuras presentan distintas fases, es decir, no se expresan al mismo tiempo sino que se expresan desfasados. Además, se comprobó que las condiciones de luz constante abolieron la ritmicidad del mRNA y de la proteína PER2 en estas estructuras.

Caracterización de la expresión del receptor de dopamina D2 en estriado dorsal.

Con el objetivo de dilucidar si la expresión del receptor de dopamina D2 está sujeto a control circadiano, se comenzó con el análisis de la secuencia del promotor del gen *drd2* murino. En la secuencia del mismo se encontró un sitio RORE canónico en una ubicación idéntica al encontrado en el promotor del receptor D3 por Ikeda et al. (2013). En ese trabajo se demostró que el sitio RORE hallado era funcional, y que la transcripción del gen *drd3* murino, que codifica el receptor de DA D3 (integrante de la familia D2 de receptores) estaba sujeta al control dual de las proteínas RoRα y rev-erba.

Luego, con el fin de conocer si la expresión del receptor D2 podría estar sujeta a un control circadiano, se midió la expresión de mRNA de D2 mediante PCR en tiempo real y la expresión de su producto proteico mediante inmunohistoquímica.

Expresión del mRNA de D2 mediante PCR en tiempo real

Para realizar la PCR en tiempo real se tomaron muestras de estriado dorsal de ratones en LO 12:12 y LL a lo largo del día en los horarios: 0 hs, 4 hs, 8 hs, 12 hs, 16 hs y 20 hs. Los ratones en LO mostraron un ritmo en el contenido de mRNA del receptor D2, con un máximo de expresión durante la transición de las fases de luz y oscuridad, la cual coincide con el horario de las 20 hs (Figura 2.11 A, $p=0.0008$ ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni, $n=4$ /punto horario). Sin embargo, los ratones en LL presentaron niveles constantes de

expresión de mRNA del receptor a lo largo del día (Figura 2.11 B, $p=0,2499$, ANOVA de una vía, $n=4$ /punto).

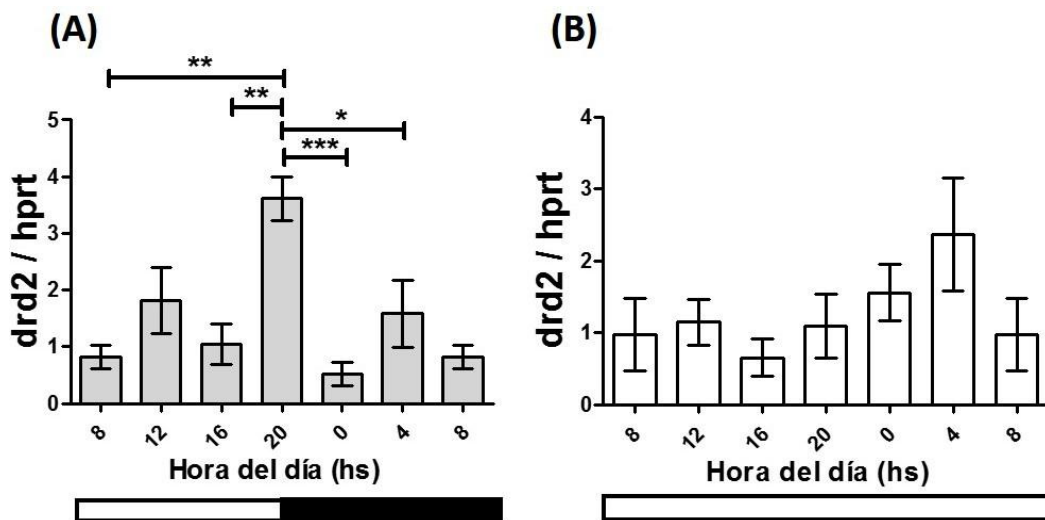


Figura 2.11. Patrón de expresión del mRNA del receptor de dopamina D2. Las muestras corresponden a estriado dorsal proveniente de (A) ratones bajo un ciclo de luz/oscuridad y (B) ratones en condiciones de luz constante. En las muestras de ratones en LO se observa un ritmo con un pico pronunciado a las 20 hs ($p=0,0003$ ANOVA de una vía seguido de test de Bonferroni, $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $n=4$ /punto horario). Las muestras provenientes de ratones en LL no presentaron un ritmo significativo ($p=0,3070$, ANOVA de una vía, $n=4$ /punto horario). Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

Expresión de la proteína D2 mediante Inmunohistoquímica

Luego de hallar un ritmo diario de expresión de mRNA del receptor de dopamina D2, se procedió a determinar si el mismo presentaba una expresión rítmica en su forma proteica. Para ello se utilizó la técnica de inmunofluorescencia según se detalla en los Métodos de esta sección (página 115).

Se encontró que la expresión del receptor D2 presenta un patrón rítmico a lo largo del día, alcanzando su valor máximo en la mitad de la fase de luz, coincidente con las 12 hs. A su vez, se registró un mínimo en el momento de transición entre las fases de luz y

oscuridad, a las 20 hs (Figura 2.12; $p=0,0103$ ANOVA de una vía seguido de test de Tukey).

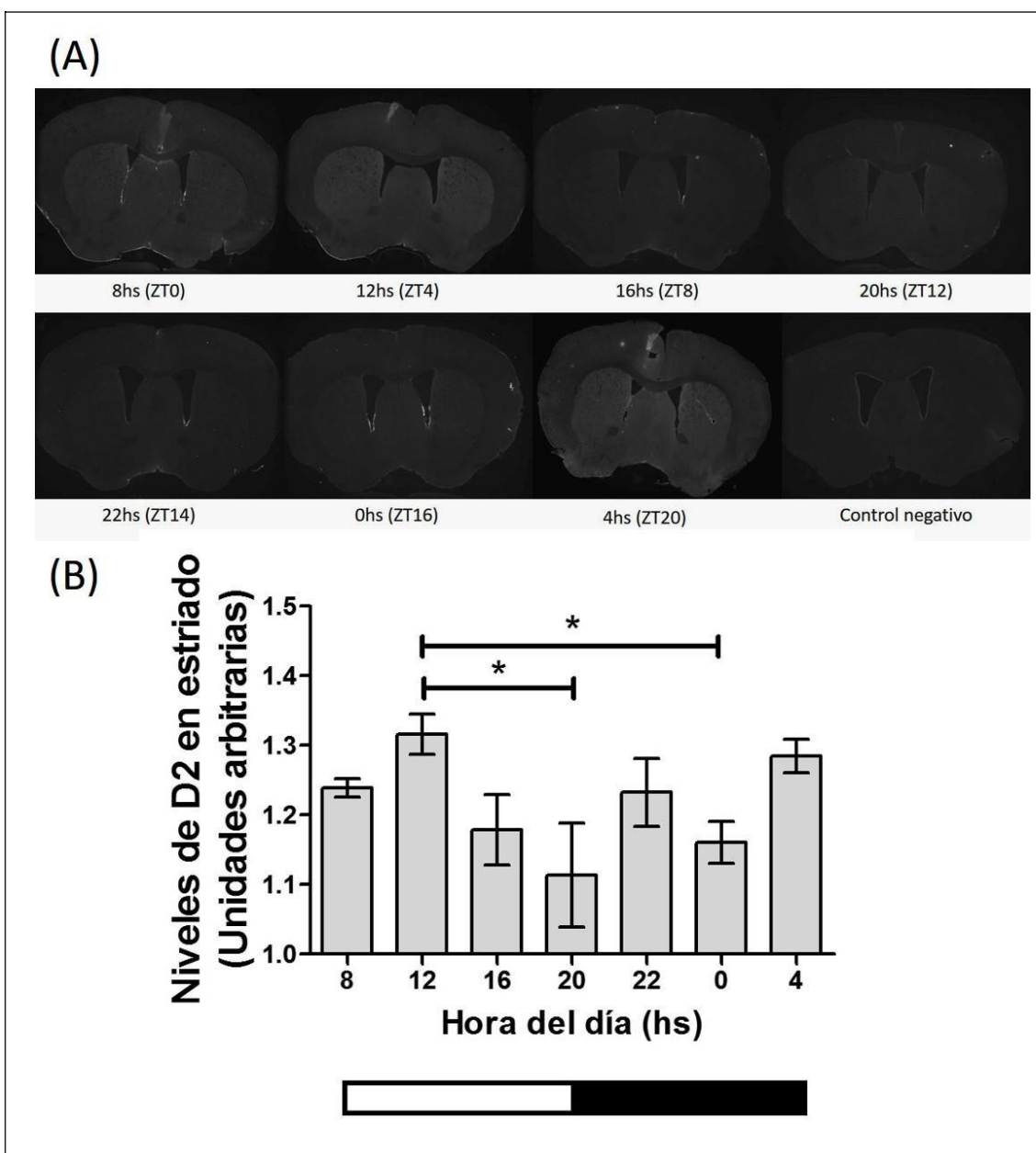


Figura 2.12. Expresión del receptor de dopamina D2 medido mediante inmunofluorescencia en estriado dorsal de ratones bajo un ciclo LO. (A) Corte coronal representativo de cada punto horario evaluado. (B) Cuantificación de la expresión del receptor D2 en estriado. La misma muestra un ritmo diario significativo, alcanzando su valor máximo durante la fase de luz ($p=0,0103$, ANOVA de una vía seguido de test de Tukey $*p<0.05$, $n=$ entre 3 y 6/punto horario). Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

Ensayo de Motivación hacia una recompensa

Con objeto de probar si el mal desempeño en la tarea de estimación de tiempo que presentaron los animales en condiciones de luz constante se debía a una diferencia en el estado motivacional de los mismos, se llevó a cabo un ensayo de motivación hacia una recompensa utilizando el paradigma de tasa progresiva o *progressive ratio* [PR, Richardson y Roberts (1996)]. El mismo está basado en una tarea de condicionamiento operante simple, pero utiliza un algoritmo que modifica la cantidad de presiones de palanca necesarias para recibir una recompensa a medida que progresa la sesión (para más detalles ver los Métodos del presente Capítulo).

En la etapa de condicionamiento operante, los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre los grupos, ya que todos alcanzaron el umbral de presiones requeridas para promover a la etapa de tasa progresiva (60 recompensas en una sesión de un hora de duración). Luego, mediante el ensayo de tasa progresiva (PR), pudieron observarse diferencias significativas en el desempeño presentado por los distintos grupos. Los ratones testeados durante la noche obtuvieron mayor número de presiones que los testeados durante el día. Sin embargo, los ratones en condiciones de luz constante presentaron un fenotipo intermedio en el comportamiento respecto a los dos grupos anteriores (Figura 2.13 A; $p < 0.0001$, ANOVA de una vía seguido de test de Tukey). La misma tendencia se observó en las recompensas obtenidas, ya que es un parámetro dependiente de la cantidad de presiones de palanca realizadas (Figura 2.13 B, $p < 0.0001$, ANOVA de una vía seguido de test de Tukey). El “punto de quiebre” entre los grupos mostró diferencias significativas, sugiriendo que el grupo testado durante la noche posee más vigor por obtener una recompensa y son capaces de presionar muchas más veces por obtenerla. (Figura 2.13 C; $p = 0,0001$ en test de Matel-Cox; $p = 0,0409$ test de tendencia).

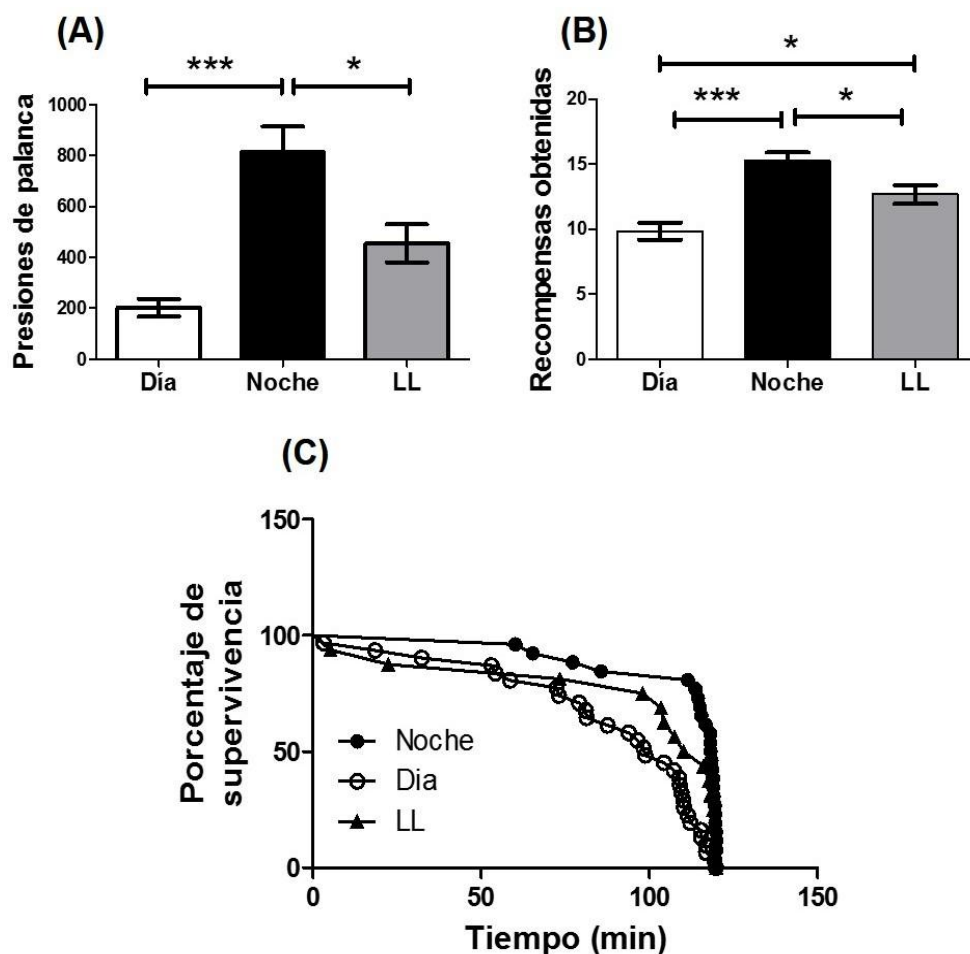
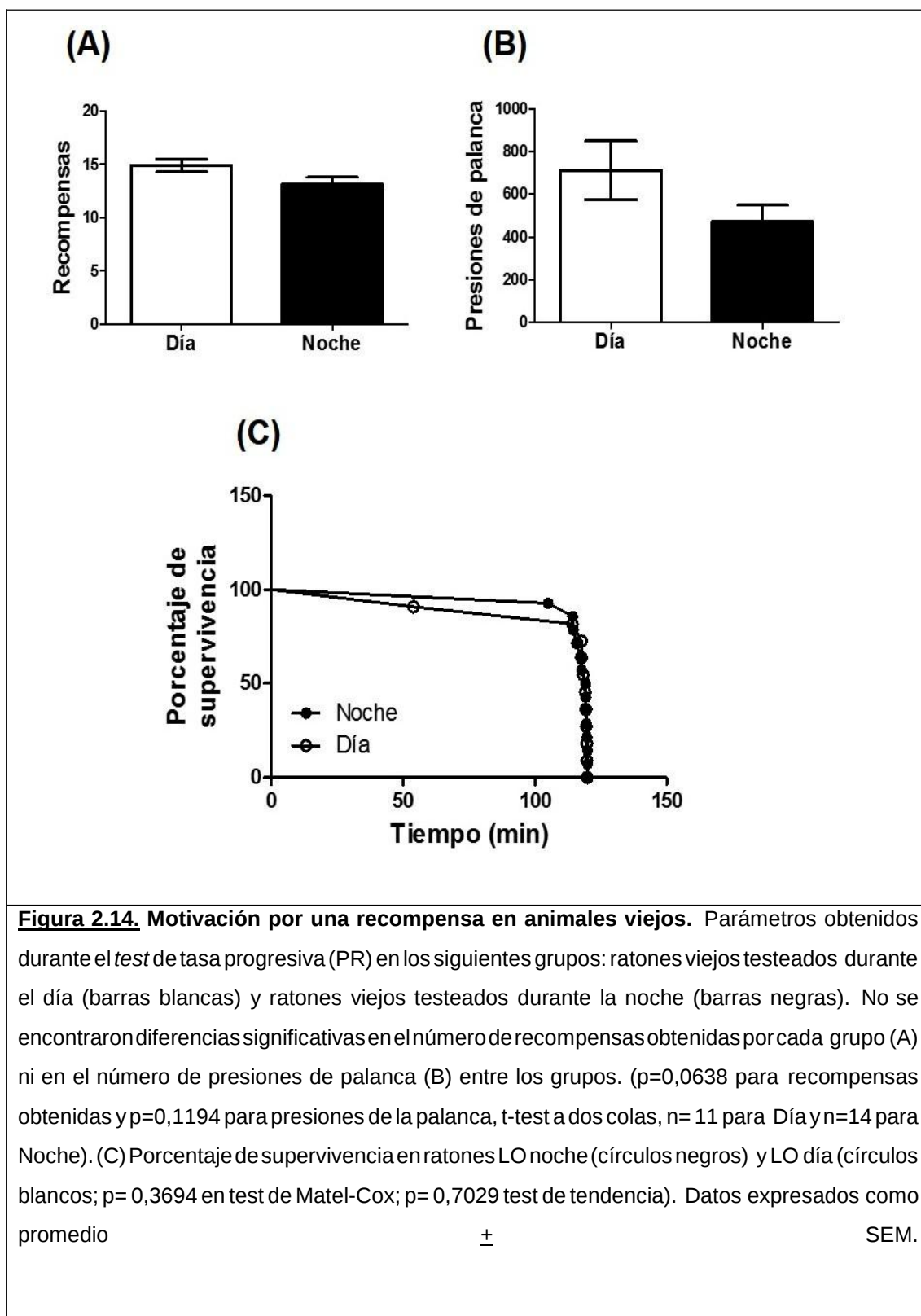


Figura 2.13. Motivación por una recompensa. Parámetros obtenidos durante el test de tasa progresiva (PR) en los siguientes grupos: ratones en LO 12:12 testeados durante el día (barras blancas), ratones en LO testeados durante la noche (barras negras) y ratones en LL (barras grises). (A) Se encontraron diferencias significativas en el número de recompensas obtenidas por cada grupo ($p < 0.0001$, ANOVA de una vía seguido de test de Tukey). (B) El número de presiones de palanca sigue la misma tendencia que las recompensas en los grupos ($p < 0.0001$, ANOVA de una vía seguido de Tukey). (C) Porcentaje de supervivencia en ratones LO noche (círculos negros), LO día (círculos blancos) y LL (triángulos negros, $p = 0.0001$ en test de Matel-Cox; $p = 0.0409$ test de tendencia). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ $n = 16$ para LL, $n = 20$ para Día y $n = 26$ para Noche. Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

Luego, con el objetivo de probar si las diferencias encontradas en el estado motivacional de los animales jóvenes testeados a distintos momentos del día se mantenía en ratones viejos, los cuales poseen un decaimiento de la actividad del sistema dopaminérgico (Backman et al., 2006), se llevó a cabo el ensayo de motivación en animales de más de un año de edad en LO 12:12 durante el día y durante la noche. Los resultados obtenidos a partir del *test* de tasa progresiva mostraron que no hubo diferencias significativas en las recompensas obtenidas ni en la tasa de presiones en los animales testeados durante el día y durante la noche (Figura 2.14 A; $p=0,0638$ para recompensas obtenidas y Figura

B; $p=0,1194$ para presiones de la palanca, *t*-test a dos colas). Los “puntos de quiebre” obtenidos para los grupos no mostraron diferencias (Figura 2.14 C; $p=0,3694$ en test de Matel-Cox; $p=0,7029$ test de tendencia)



Discusión

En este segundo capítulo el principal objetivo fue dilucidar el rol de la señalización dopaminérgica como posible eslabón de la relación entre el sistema circadiano y la estimación de intervalos cortos de tiempo. Con este fin, haciendo hincapié en uno de los resultados del Capítulo I, donde se demostró que los animales que presentaban una arritmicidad circadiana inducida por exposición a condiciones de luz constante no podían estimar el tiempo correctamente, se buscó profundizar sobre las bases neurofisiológicas de este trastorno en el comportamiento.

En primer lugar, respondiendo a la hipótesis de que los ratones en LL podían tener actividad dopaminérgica reducida, se buscó mejorar su estimación causando un aumento transitorio en la disponibilidad de DA, el neurotransmisor más importante involucrado en la estimación de intervalos cortos de tiempo. De esta manera, mediante inyecciones diarias de L-DOPA previo al entrenamiento, se logró una mejora en la *performance* de los animales arrítmicos en la tarea de estimación temporal, los cuales mostraron un incremento de la tasa de respuesta cercana al intervalo *target* (Figuras 2.4 y 2.6). Sin embargo, la administración del fármaco no proporcionó una mejora en los ratones en LO. Estos resultados se relacionan directamente con el modelo propuesto en Meck (2006) sobre la relación de la cantidad de dopamina y estimación de intervalos cortos de tiempo (Figura 2.15). Esta relación está descrita por una letra U invertida entre los niveles de dopamina y la velocidad del reloj (los osciladores de corteza). Este modelo propone la existencia de un rango óptimo de DA para una buena *performance* de estimación. Además, indica que los extremos de la U invertida, es decir, tanto sistemas hiperdopaminérgicos (generados por administración de cocaína, anfetaminas o los ratones DAT^{-/-} y DAT^{+/-}) como hipodopaminérgicos (modelos de lesiones con 6-OH-DA en estriado y SNPC) no poseen buen desempeño en la tarea de estimación de tiempo. Esto es debido a que los niveles muy bajos o muy altos del neurotransmisor son disruptivos para esta tarea cognitiva.

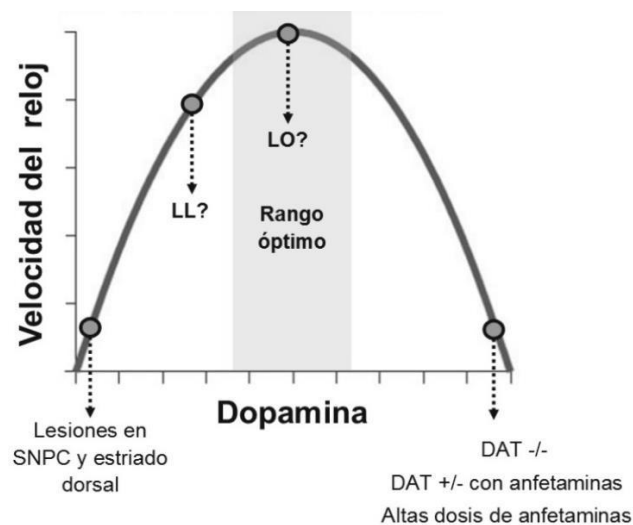


Figura 2.15. Modelo de U invertida propuesto para explicar los niveles óptimos de DA en la estimación de tiempo. El gráfico muestra la relación entre los niveles de DA y la velocidad del reloj en *interval timing*. En los extremos izquierdo y derecho se encuentran casos de hipo e hiperdopaminérgia, respectivamente, los cuales no pueden estimar correctamente el paso del tiempo en el rango de segundos a minutos. En el centro de la curva puede verse el denominado rango óptimo de DA, necesario para lograr un buen desempeño en la tarea estimación del tiempo. En el gráfico se ubican tentativamente los grupos de ratones evaluados en condiciones de LO y LL.

Entonces, volviendo a los resultados del presente Capítulo, podría hipotetizarse que los niveles de dopamina en el grupo LL no estuviesen dentro de ese rango óptimo para la estimación correcta, y que la administración de L-DOPA logra que este grupo avance por la curva de U invertida hacia la derecha y comience a tener niveles más cercanos a los óptimos (y por eso su estimación temporal mejore). Por otra parte, los ratones en LO sí se encontrarían dentro del rango óptimo de dopamina. En este caso, la administración de L-DOPA en concentraciones bajas, corre a este grupo hacia la derecha en la curva pero sin desplazarlo del rango óptimo de estimación, por lo cual su desempeño en la tarea no se ve afectado.

Por otro lado, en este capítulo se determinaron los niveles de dopamina estriatal que presentaron los grupos de ratones en condiciones de LO y LL a lo largo del día. Se encontró que, mientras el grupo de ratones mantenidos en LO 12:12 presenta un ritmo diario en los niveles de DA estriatal, los ratones mantenidos en LL no lo poseen (Figura

2.7). El ritmo hallado en los ratones en LO presentó valores mínimos durante el día y en la transición día/noche, mientras que registró niveles máximos durante la noche. Si bien este resultado es opuesto al hallado por Khaldy et al. (2002), donde muestran que la dopamina estriatal tiene un ritmo que registra niveles más altos durante el día, el ritmo encontrado concuerda con el resultado comportamental mostrado en el Capítulo I, donde se demostró que la estimación de intervalos cortos de tiempo es más precisa durante la noche que durante el día. Es decir que la estimación de tiempo es más precisa durante la noche, cuando los niveles de dopamina estriatal se encuentran altos, y menos precisa durante el día, cuando los niveles del neurotransmisor se encuentran bajos. Además, este resultado concuerda con el modelo de U invertida, donde los animales testeados durante el día se encontrarían a la izquierda de la curva respecto a los testeados durante la noche, ya que poseen menos DA. A su vez, los niveles bajos y constantes a lo largo del día hallado en los ratones en LL validan en parte la hipótesis hipodopaminérgica de los mismos. Sin embargo, queda abierta la pregunta de si el efecto sobre la estimación de tiempo de las condiciones de LL está dado por los bajos niveles del neurotransmisor o por la falta del ritmo del mismo.

Por otro lado, se realizó un estudio sobre la síntesis de DA en estriado y SN, en la búsqueda de explicar de dónde provenía el ritmo diario hallado del neurotransmisor. Esto último se realizó por medio de la cuantificación de los niveles de proteína de TH, la enzima limitante en la reacción de la síntesis de DA (Daubner et al., 2011, Chung et al., 2014). Se encontró que existe un ritmo diario en los niveles de TH en ambas estructuras en muestras provenientes de ratones en LO (Figura 2.8). En estriado dorsal los niveles de TH fueron más altos durante la noche, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en rata por Sleipness et al. (2007). A su vez, en SN los niveles de TH encontrados fueron más altos durante el día. Este resultado no concuerda con el ritmo encontrado por Chung et al. (2014), donde la expresión de TH medida por western blot es mayor durante el día que en la transición día/noche en ratones. Sin embargo, el hecho de utilizar una baja frecuencia de muestreo [cada 8 horas en el caso de esta tesis, y solo dos puntos en el caso de Chung et al. (2014)] hace que la determinación del pico de la proteína sea variable, ya que posiblemente la frecuencia de muestreo esté ocultando la verdadera forma de la oscilación. Por otro lado, en ambas estructuras cerebrales se evidenció la pérdida de ritmicidad en los niveles de TH en condiciones de LL. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Sleipness et al 2007, donde por medio de la lesión de los NSQ en ratas, se eliminaron los ritmos de expresión de TH tanto en estriado dorsal como en sustancia nigra. Estos resultados refuerzan la idea de que la arritmicidad circadiana, ya sea causada por lesiones de los NSQ o por condiciones de luz constante, abole el ritmo de TH en estructuras necesarias para la estimación de intervalos cortos de tiempo.

Complementariamente, se determinó la degradación de DA a lo largo del día

mediada por MAO. Esto se llevó a cabo mediante la cuantificación de DOPAC, el metabolito principal de la DA (Khaldy et al., 2002, Meiser et al., 2013). Se encontró que existe un ritmo diario en la degradación del neurotransmisor, el cual se abole en condiciones de luz constante (Figura 2.9).

Tomados en conjunto, estos resultados logran explicar el porqué de los niveles constantes de DA estriatal en ratones en condiciones de LL. Al no existir un ritmo en la síntesis y la degradación del neurotransmisor, los niveles del mismo tampoco varían.

Por otro lado, en este Capítulo, que se basa en la búsqueda de la conexión entre el sistema circadiano y el de *interval timing*, se demostró la presencia de la proteína PER2 en estructuras relacionadas con la estimación de intervalos cortos de tiempo. Se demostró, además, que Per2 presenta un ritmo diario de expresión tanto de mRNA como de proteína en estriado dorsal y SN (Figura 2.10). Sin embargo, el ritmo de expresión en estas estructuras, al igual que el de TH se encuentra en fase opuesta. Además, se observó que en condiciones de luz constante los ritmos hallados en ambas estructuras no son evidenciables.

Otra arista de este segundo Capítulo es la caracterización circadiana de la expresión del receptor de dopamina D2, estrechamente involucrado en la estimación de intervalos cortos de tiempo (Drew et al., 2007). Se encontró, en primer lugar, que el promotor de D2 posee secuencias que le permitirían estar sujeto a control circadiano. Específicamente, posee un sitio RORE canónico y sitios *e-box* no canónicos, similares a los encontrados en el promotor del receptor D3 por Ikeda et al. (2013). Por otro lado, se encontró que el mRNA del receptor D2 presenta un ritmo diario de expresión en estriado dorsal, el cual es abolido por condiciones de luz constante (Figura 2.11). Esta expresión rítmica de mRNA presenta un pico agudo en la transición día/noche (ZT12), en coincidencia con los datos encontrados por Weber et al. (2004) en ratas. Pudo observarse, asimismo, que en condiciones de LL este ritmo en el mRNA del receptor se pierde.

Además, se demostró que el receptor D2 en su forma proteica presenta un ritmo diario en el estriado dorsal, mostrando mayores niveles del receptor durante el día (Figura 2.12). Cabe aclarar que la cuantificación del mismo se hizo sobre el estriado dorsal y que eso involucró la cuantificación indiferenciada de receptores postsinápticos y autorreceptores presinápticos. Es por ello que la interpretación del resultado se dificulta un poco, ya que si en proporción el receptor heterólogo (receptor postsináptico) es más abundante significaría que los niveles del receptor poseen un ritmo inverso a los niveles de dopamina. En cambio, si lo que prevaleciera fuese la especie del autorreceptor (presináptico), la mayor expresión durante el día explicaría los bajos niveles de DA durante ese momento del día, ya que el autorreceptor estaría regulando la síntesis y liberación del neurotransmisor (Surmeier et al., 2007). Queda pendiente no sólo la diferenciación de los distintos tipos de receptores (para observar si ambos tienen un ritmo diario) sino además

estudiar qué sucede con los niveles del receptor en ratones en condiciones de LL. Este receptor está tan ligado al comportamiento que probablemente el estudio de la expresión del mismo en su forma funcional en ratones en LL podría dar algunas pistas para explicar la disfunción que éstos presentan frente a una tarea de estimación temporal.

A través de los resultados moleculares encontrados en este capítulo, y de algunos datos bibliográficos, se propone un modelo molecular de interacción entre los sistemas circadiano y de estimación de intervalos cortos de tiempo (Figura 2.16). En SN se ha demostrado la expresión de diversos genes reloj (Li et al., 2009, Natsubori et al., 2014); además, en esta tesis se demostró que *Per2* oscila diariamente en esa estructura. Las proteínas reloj actúan como factores de transcripción uniéndose a sitios específicos del DNA como lo son los sitios RORE y las secuencias *e-box*. Se han encontrado este tipo de secuencias en múltiples elementos que participan de la señalización dopaminérgica, tales como: DAT, TH, MAO y D3 (Yoon y Chikaraishi, 1992, Kawarai et al., 1997, Hampp et al., 2008, Ikeda et al., 2013). Además, en esta tesis se encontraron sitios de regulación circadiana en el promotor del receptor D2 murino. Varios de estos componentes de la señalización dopaminérgica presentan oscilaciones diarias en su actividad, como MAO (Hampp et al., 2008) y expresión, como DAT, TH y D3 (Sleipness et al., 2007, Ikeda et al., 2013). Además, en esta tesis se han encontrado patrones rítmicos en la expresión del mRNA de D2 y en sus niveles de proteína. Por otro lado, también se encontró un ritmo de degradación de dopamina mediante MAO, por medio de la determinación de DOPAC. Todas estas evidencias sugieren que en la presinapsis, como puede darse en una neurona de SNPC, las proteínas reloj modulan la actividad dopaminérgica, actuando sobre distintos pasos como la síntesis, la recaptación y la degradación del neurotransmisor y el control de la liberación mediante autorreceptores D2. Por otro lado, la postsinapsis, como puede ser una NEM del estriado, también está sujeta a regulación circadiana. En esta tesis se demostró que los niveles de DA estriatal y la expresión del receptor D2 poseen un ritmo diario controlado por el reloj circadiano. Además, hay evidencias que demuestran que el bloqueo de los receptores D2 abole el ritmo de expresión de *Per2* (Hood et al., 2010). Recíprocamente, un estudio en humanos mostró que distintos polimorfismos de *Per2* correlacionan con la cantidad de receptores D2 en el estriado (Shumay et al., 2012). Esta regulación circadiana, que se evidencia tanto en la disponibilidad de receptores D2 como de su ligando activador endógeno DA, impactan sobre la estimación de intervalos cortos de tiempo. DA, como se ha visto, es el neurotransmisor más importante en este comportamiento, y se ha determinado en trabajos previos que la modulación que el mismo tiene sobre la estimación temporal es ejercida mediante la activación de D2 (Drew et al., 2007).

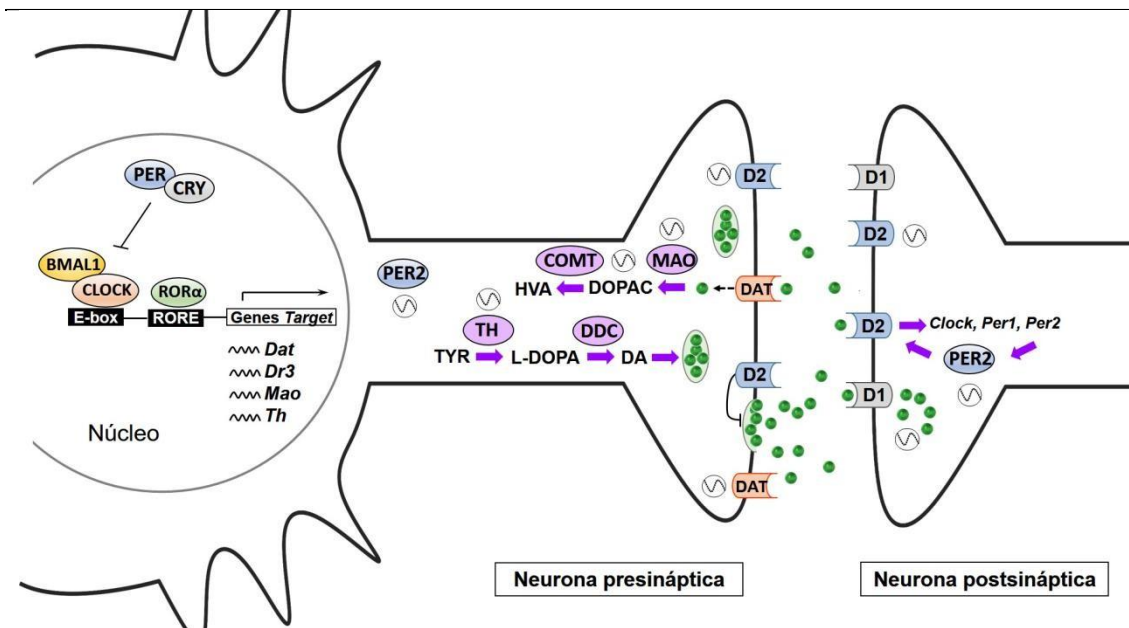


Figura 2.16. Modelo de interacción de los sistemas circadiano-interval timing. El sistema circadiano regula la actividad dopaminérgica en la pre y postsinapsis. En la presinapsis (como por ejemplo, una neurona de SNPC) las proteínas circadianas controlan la expresión de elementos de la señalización dopaminérgica uniéndose a sitios tales como RORE y secuencias *e-box* en los promotores de estos elementos. Por otro lado, en la postsinapsis (como una NEM del estriado), *Per2* regula indirectamente la disponibilidad de receptores *D2* y a su vez, a modo de retroalimentación, la activación de estos receptores modula la expresión de algunos genes reloj en el estriado.

En este Capítulo también se ahondó en el estudio de un comportamiento relacionado estrechamente con la función dopaminérgica, como lo es la motivación por una recompensa (Trifilieff et al., 2013). Se pudo ver que los ratones en LO testeados durante la noche poseen mucha más motivación a trabajar por una recompensa que los testeados durante el día, coincidiendo con los niveles de dopamina altos encontrados para ese momento del día (Figura 2.13). Por otro lado, se encontró que los ratones en LL poseen un fenotipo intermedio entre los LO entrenados durante la noche y durante el día. Este resultado en los ratones en LL demuestra que los problemas de estimación de tiempo observados en estos animales no se deben a la falta de motivación por aprender o realizar adecuadamente la tarea dada. El estudio del estado motivacional de los animales surgió del conocimiento de la relación que la motivación tendría con la estimación de intervalos cortos de tiempo, sobre todo en protocolos de obtención de una recompensa (como el

utilizado en esta tesis). Según Balci (2014) la dopamina es influyente en este comportamiento porque regula el estado motivacional del animal, lo cual compromete la respuesta del mismo. Esto no es opuesto a la teoría de la U invertida planteada por Meck (2006) y discutida anteriormente, pero difiere en la naturaleza del efecto de la DA en la respuesta de un animal que es evaluado en un protocolo de estimación temporal. La teoría motivacional de la DA ya no habla de la velocidad de un reloj, sino que se centra en el estado motivacional del animal y la espera de la recompensa. Un animal con la actividad dopaminérgica aumentada estará más motivado por la recompensa al final del *trial*, e iniciará su respuesta mucho antes que un animal con un nivel menor de motivación. Basándonos en esto, el resultado del *test* motivacional podría entonces ayudar a entender las diferencias en la estimación de tiempo entre ratones entrenados durante el día y aquellos entrenados durante la noche. Estos últimos estarían más motivados y por esa razón estarían realizando con mayor efectividad la tarea de *timing*, la cual requiere de atención y de una cierta motivación por obtener la recompensa. Además, esto también correlaciona con los niveles de dopamina encontrados en estos animales. Estos resultados juntos nos dicen que un animal durante la noche tiene más dopamina, por eso tiene un estado motivacional más alto que durante el día; así puede realizar la tarea de estimación temporal de manera más efectiva. Sin embargo, no logra explicar el resultado obtenido para los ratones en condiciones de LL, los cuales poseen un estado motivacional intermedio y aun así no logran realizar la tarea de estimación de manera eficiente.

Además, se ensayó este comportamiento en ratones viejos para estudiar si el proceso de envejecimiento repercutía en el nivel motivacional de los mismos. Sin embargo, la diferencia encontrada en el estado motivacional entre el día y la noche en ratones jóvenes no fue evidenciable en este grupo. Curiosamente, si bien no hay diferencias significativas en el estado motivacional registrado en los distintos momentos del día en este grupo, se observa que los ratones viejos testeados de día toman valores altos, equiparándose al grupo evaluado de noche (Figura 2.14). Es decir, que en ratones viejos la motivación durante el día está aumentada y alcanza los valores motivacionales de la noche. Este resultado resulta sorprendente, ya que se conoce que el envejecimiento trae aparejada una disminución de la función dopaminérgica (medida a nivel de elementos dopaminérgicos tales como los receptores D1 y D2 y el transportador DAT) que correlaciona con una declinación cognitiva [Revisado en Backman et al. (2006)]. Sin embargo, en el ensayo de motivación realizado se vio que si bien los ratones viejos no presentan una variación día-noche en el estado motivacional, el grupo testado durante el día demuestra mayor persistencia en su comportamiento comparado con los jóvenes en el mismo horario. Este resultado, si bien sorprendente en principio, estaría de acuerdo con trabajos que indican que el comportamiento de respuesta hacia una recompensa alimenticia no declina en ratones envejecidos (Harb et al., 2014).

Capítulo 3. Rol de la hormona melatonina en la modulación circadiana de la estimación de intervalos cortos de tiempo en ratas.

Introducción

Melatonina, aspectos generales.

La melatonina (MT) es una hormona sintetizada a partir del aminoácido triptófano en la glándula pineal de la mayoría de los vertebrados. La misma, entre otras funciones, actúa como un mensajero del sistema circadiano (Pevet y Challet, 2011). En mamíferos, esta hormona es sintetizada y secretada por los pinealocitos de manera cíclica, con altos niveles durante la fase de oscuridad (o noche subjetiva en condiciones de oscuridad constante), y bajas concentraciones durante la fase de luz tanto en animales diurnos como nocturnos (Pevet, 2003). Si bien existen otras fuentes productoras de MT (como por ejemplo la retina), estas suelen producirla en bajas cantidades (Huether, 1993). Solo se considera significativo el aporte del tracto gastrointestinal, el cual libera grandes cantidades de MT en el torrente sanguíneo bajo influencia de determinados factores nutricionales (Konturek et al., 2007). Si bien la MT liberada por el intestino en la sangre excede las cantidades liberadas por la glándula pineal, se cree que su función es mayormente endócrina influyendo en la regeneración del epitelio y aumentando la respuesta inmune intestinal (Bubenik, 2002). Se desconoce aún si este tipo de MT puede actuar sobre el sistema nervioso central (SNC), y no se tiene certeza de sus efectos cronobiológicos debido al patrón indefinido de liberación que presenta y la relación con la sensibilidad que posee el SNC a esta hormona en distintos momentos del día (Hardeland y Pandi-Perumal, 2005).

El ritmo circadiano de liberación de la MT pineal es regulado por los NSQ del hipotálamo y el tracto retinohipotalámico (Klein y Moore, 1979). El comienzo de la noche dispara la secreción de norepinefrina (NE) de las fibras simpáticas vía el tracto retinohipotalámico y el ganglio cervical superior. Luego, la NE actúa sobre los pinealocitos estimulando la producción y secreción de la MT. El blanco de la NE y de su cascada de señalización es el control de la expresión de la enzima arilalquilamina N-acetiltransferasa (AA-NAT), la cual es la enzima limitante de la síntesis de la hormona (Chattoraj et al., 2009). Por otro lado, la metabolización de la MT se da por múltiples mecanismos hepáticos y renales, los cuales producen la 6-sulfatoximelatonina entre otros productos de metabolización minoritarios (Hardeland, 2010).

El principal estímulo ambiental que rige la liberación de MT es la luz, no solo mediante sincronización a un ciclo de 24 hs de luz/oscuridad, sino que pulsos discretos de luz durante la fase de oscuridad pueden rápidamente inhibir la síntesis y secreción nocturna de la hormona (Schwartz et al., 2009, Kozaki et al., 2016). El poder que la luz ejerce sobre la secreción de MT es muy estricto, por ello tanto la hormona como su metabolito en orina mantienen una rigurosa relación de fase con este sincronizador. De hecho, son usados comúnmente como marcadores

para evidenciar la adaptación que presenta un organismo ante un evento forzado de resincronización ante un cambio de esquema de luz (Arendt y Broadway, 1987, Claustrat et al., 1995). Los efectos fisiológicos de esta hormona son el resultado de la activación de los receptores específicos de la misma, MT1 y MT2, los cuales pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G (Dubocovich, 1995). Los receptores MT1 y MT2 se encuentran expresados tanto en el sistema nervioso central como en órganos periféricos (Dubocovich et al., 2003). Debido a la lipofilicidad de la MT, ésta puede llegar a los receptores contenidos en tejidos cruzando fácilmente membranas celulares, alcanzando el torrente sanguíneo y fluido cerebrospinal. Se ha propuesto que, entre otras funciones, el receptor MT1 modula la frecuencia de disparo neuronal, la vasoconstricción arterial, la proliferación de células cancerosas y funciones reproductivas y metabólicas. A su vez, MT2 modula los cambios de fase de los ritmos de disparo neuronal en los NSQ, inhibe la liberación de dopamina en retina, induce vasodilatación en arterias y aumenta la respuesta inmune [Revisado en Dubocovich y Markowska (2005)]. Existe además un tercer subtipo de receptor de melatonina, MT3, el cual es un receptor de membrana que posee una baja afinidad por la MT (en el orden de los nanomoles) y que no pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G (Dubocovich et al., 2003). Algunos trabajos sugieren que este sitio de unión de MT funciona como un activador de la enzima citosólica quinona reductasa 2, aunque la cascada de señalización producto de su activación tanto como sus blancos de acción son aún desconocidos (Tan et al., 2007), y no se han descubierto hasta el momento este tipo de receptores en humanos.

La MT presenta receptores en los NSQ también, lo que la propone como un *Zeitgeber* interno. De esta forma, su señal lleva información lumínica y del oscilador central al resto del cuerpo y a su vez puede actuar sobre el reloj, cerrando un ciclo de retroalimentación regulatorio (Macchi y Bruce, 2004). Entonces, si la MT actuara como sincronizador interno, la ausencia de la misma debería causar un desacoplamiento de los ritmos endógenos. Sin embargo, las lesiones de la glándula pineal o su remoción quirúrgica solo causa efectos leves en comportamientos circadianos. Por ejemplo, no afectan los ritmos de actividad locomotora en condiciones de luz/oscuridad y oscuridad constante ni la tasa de resincronización luego de un cambio en el esquema de luz [revisado en Golombek et al. (1996)]. No obstante, la MT cumple un rol importante cuando la comunicación de los NSQ está afectada, y la ausencia de la hormona torna a algunos animales más sensibles al efecto de la luz constante (Aguilar-Roblero y Vega-Gonzalez, 1993).

La melatonina es administrada como cronobiótico de múltiples formas: inyecciones subcutáneas, infusión o vía agua de bebida. De todas estas formas, la MT deja ver su efecto sincronizando la actividad locomotora en ratas que se encuentran en libre curso (Redman et al., 1983, Slotten et al., 1999). Sin embargo, la melatonina exógena solo es efectiva cuando la hormona endógena no se está produciendo o no está presente en la circulación general. Es decir, en un animal que posee la hormona endógena, la MT exógena sólo tiene efecto si se la

administrar fuera de la ventana de acción de la hormona endógena (Pevet y Challet, 2011).

Relación melatonina-dopamina

La MT ha sido relacionada con la liberación de varios neurotransmisores (Zisapel, 2001, Monnet, 2002, Meng et al., 2015). En particular, se ha demostrado que la MT inhibe la liberación de DA en el hipotálamo, hipocampo y retina (Zisapel, 2001, Doyle et al., 2002). Por otro lado, un trabajo realizado por Khaldy et al. (2002) demostró que el ritmo de liberación de DA está regulado por MT. Tal es así, que en ratones a los cuales se les sustrajo la glándula pineal quirúrgicamente y no poseían MT, el ritmo de liberación de DA desapareció. A su vez, inyecciones diarias de la hormona lograron restablecer el ritmo diario del neurotransmisor.

Otras evidencias afirman que el tratamiento con MT logró bloquear los efectos de los antagonistas D2 flufenazina y apomorfina en un 80% y en un 40% respectivamente, actuando de manera tiempo-específica sobre los síntomas causados de cada antagonista (Sumaya et al., 2004). A su vez, en un trabajo realizado por Abilio et al. (2003), se demostró que un tratamiento con MT puede revertir la supersensibilidad dopaminérgica causada por haloperidol.

Caracterización de los ritmos circadianos de la rata.

Las ratas (*Rattus norvegicus*) son roedores nocturnos, es decir, concentran su actividad en la fase de oscuridad. Estos animales están bien caracterizados circadianamente y por esa razón son un modelo muy utilizado en el campo de la Cronobiología.

Las ratas pueden sincronizar perfectamente sus ritmos comportamentales y moleculares a un ciclo LO 12:12 (es decir, 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad). En la Figura 3.1 se puede ver su actividad locomotora graficada en un actograma doble. La actividad locomotora en rueda del animal comienza todos los días a la misma hora, es decir, se encuentra sincronizada al ciclo de LO, y tiene un periodo de 24 horas. En condiciones de oscuridad constante (OO) las ratas expresan su ritmo endógeno de actividad locomotora, cuyo periodo es de aproximadamente 24,3 horas (Verwey et al., 2013).

Al igual que los ratones, las ratas pueden adaptarse sin dificultad a un cambio abrupto en el esquema de iluminación, sin embargo, responden de manera diferencial a los adelantos y a los retrasos. En particular, el transiente previo a la resincronización al nuevo ciclo luego de un *jet-lag* por adelanto de 6 horas es de entre 8 y 10 días [Figura 3.2; Carneiro y Araujo (2011) y Felipo et al. (2015)].

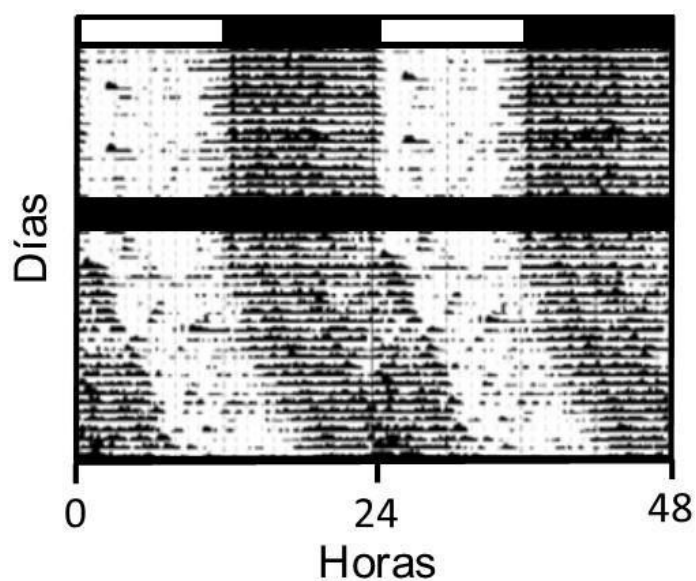


Figura 3.1. Actograma doble de la actividad locomotora en rueda de una rata Wistar en luz/oscuridad (LO) y oscuridad constante (OO). Las barras superiores blancas y negras indican las condiciones de LO 12:12. La barra negra ubicada en la mitad del gráfico indica que desde ese momento la condición es de OO. En LO la rata comienza su actividad todos los días a la misma hora coincidiendo con el comienzo de la fase de oscuridad. En OO la rata comienza su actividad cada vez más tarde en los días sucesivos, dando como resultado un periodo mayor a 24 hs. Modificado de Carneiro y Araujo (2011).

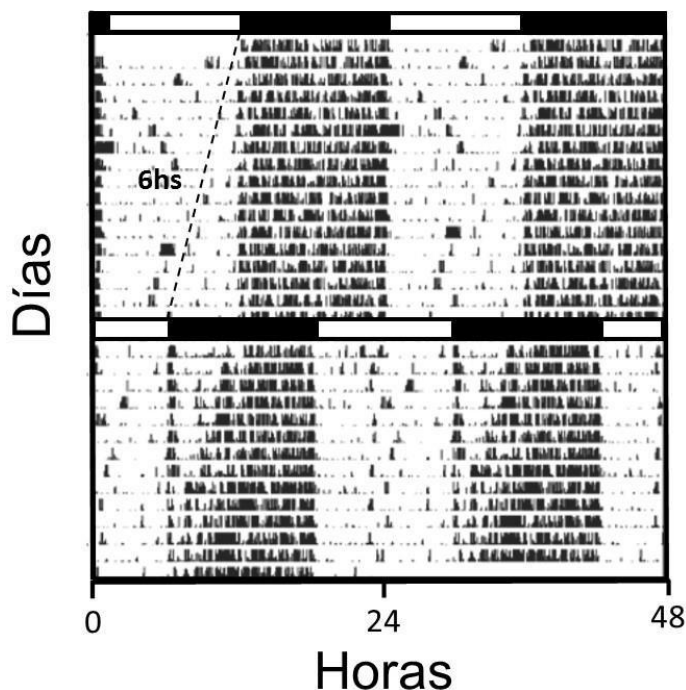


Figura 3.2. Actograma doble de la actividad locomotora en rueda de una rata Wistar frente a un adelanto de 6 horas en el ciclo LO. Las barras superiores blancas y negras indican las condiciones de LO 12:12. La barra ubicada en el centro del gráfico indica el nuevo ciclo de LO 12:12 luego de un adelanto de 6hs del esquema de luz. En LO la rata comienza su actividad todos los días a la misma hora, coincidiendo con el comienzo de la fase de oscuridad. Luego del adelanto de fase, el animal comienza su actividad cada vez más temprano en los días sucesivos hasta sincronizarse con el nuevo ciclo. Se observa en este caso un transiente de ocho días. Modificado de Carneiro y Araujo (2011).

En este Capítulo, la rata fue elegida como modelo por sus bien caracterizados ritmos circadianos, además de su conocido perfil de expresión de MT y relativa facilidad para el procedimiento quirúrgico de pinealectomía. En la Figura 3.3 se puede ver el perfil de liberación de MT en ratas Wistar medido por microdiálisis en la glándula pineal. Se puede observar que en ratas bajo un esquema de LO 12:12, la liberación de MT ocurre durante la fase de oscuridad, comenzando aproximadamente 2 horas después del apagado de las luces, y culmina en la transición de la fase de oscuridad a la de luz (Zhang, 2011, Borjigin et al., 2012).

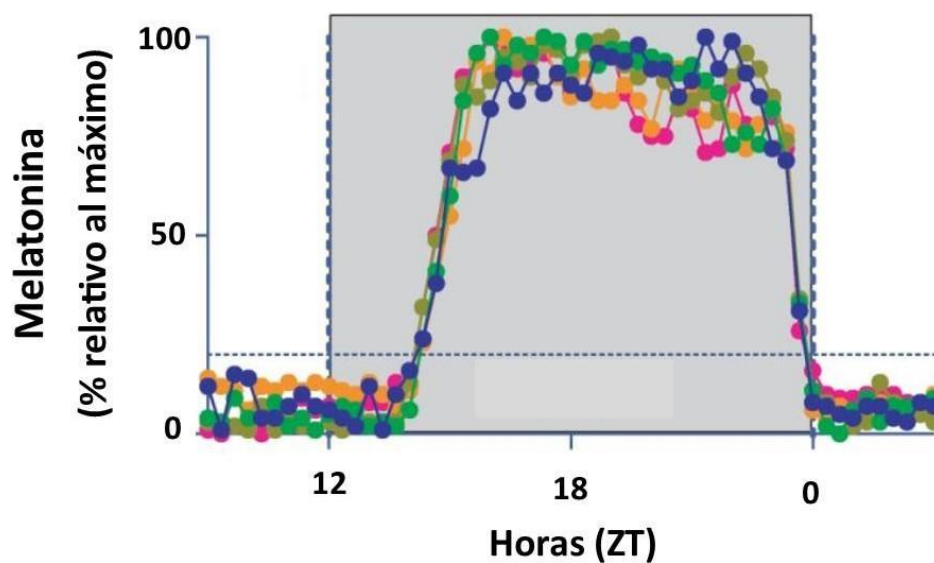


Figura 3.3. Perfil de liberación de la hormona MT en ratas Wistar. La MT fue medida mediante microdiálisis en la glándula pineal en Ratas Wistar macho (N=5) bajo un esquema de LO 12:12. La concentración de MT se expresa como porcentaje del máximo. El sombreado en el gráfico corresponde a la fase de oscuridad del ciclo, y las horas se nombran como horas del *Zeitgeber* (ZT), donde ZT12 indica el comienzo de la fase de oscuridad y ZT0 el comienzo de la fase de luz. Modificado de Zhang (2011).

Objetivos

Objetivo General

Estudiar la función de la hormona melatonina (MT) como mensajero circadiano en la modulación de la estimación de intervalos cortos de tiempo.

Objetivos Específicos

- Determinar si la falta de melatonina perjudica el desempeño en un protocolo de estimación de intervalos cortos de tiempo en ratas Wistar sometidas a la remoción quirúrgica de la glándula pineal.
- Evaluar si la administración de melatonina en agua de bebida puede mejorar la estimación temporal de ratas desprovista de la hormona endógena.
- Estudiar el efecto de un *jet-lag* simulado sobre la estimación de intervalos cortos de tiempo en ratas desprovistas de melatonina endógena.
- Determinar el efecto de la falta de melatonina sobre los niveles de dopamina estriatal.

Materiales y Métodos

Animales

Se utilizaron ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) machos adultos de entre 3 y 4 meses provenientes del Bioterio Central de la Universidad Nacional de La Plata. Los animales fueron mantenidos bajo un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (LO 12:12), con el encendido de las luces a las 8 PM (ciclo de luz invertida, salvo que se indique lo contrario). Las condiciones de temperatura fueron constantes ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) y los animales tenían libre acceso a agua y comida (alimento balanceado), salvo durante algunos protocolos comportamentales donde el acceso a comida fue restringido con el fin de mantenerlos al 85-90% de su peso original (especificado en cada protocolo)

Cirugía estereotáxica: Pinealectomía

Las ratas fueron anestesiadas con isoflurano mediante el vaporizador para anestesia gaseosa (Surgivet, Smiths Medical ASD, St. Paul, USA) y colocadas en un marco estereotáxico (Stoelting, Alemania). La pinealectomía fue realizada de acuerdo al método descrito en Hoffman y Reiter (1965). Brevemente, se realizó un corte circular en el cráneo utilizando un taladro a la altura de lambda, se cortaron las meninges y el seno sagital fue corrido hasta visualizar la glándula pineal. En las ratas pinealectomizadas (PnX), la glándula pineal se sustrajo utilizando una pinza pequeña. En las ratas Sham, se procedió de la misma forma, pero introduciendo la pinza sin sacar ni lesionar la glándula. Luego de la cirugía, las ratas fueron alojadas en jaulas individuales con los cuidados post-quirúrgicos necesarios para su recuperación.

Protocolo de estimación de intervalos cortos de tiempo.

Se utilizó el mismo protocolo que fue usado para ratones en los capítulos anteriores. Para detalles del mismo, ver Materiales y Métodos del Capítulo I (página 51).

Grupos experimentales utilizados en el protocolo de estimación de intervalos cortos de tiempo.

Estimación de tiempo en ratas PnX vs. Sham durante la noche

Las ratas fueron divididas en dos grupos ($n=8/\text{grupo}$). Al primer grupo (PnX) se les sustrajo la glándula pineal quirúrgicamente, tal como se describió anteriormente. Al segundo grupo (Sham) se les practicó la misma maniobra quirúrgica sin sustraer ni lesionar la glándula.

Se mantuvo a los grupos bajo un ciclo de LO 12:12, con el encendido de la luz a las 8 PM (ciclo de luz invertida). Ambos grupos fueron entrenados y testeados durante la fase nocturna en el rango horario ZT 15-17. Además, el rango horario utilizado abarcó el momento en que ocurre la máxima liberación de MT endógena (Meng et al., 2015).

El protocolo de estimación de tiempo comenzó a realizarse cuatro semanas luego de la cirugía, de modo que los animales se hubieran recuperado completamente de la misma. Una semana antes del comienzo del protocolo, las ratas fueron pesadas diariamente y puestas en restricción de alimento hasta llevarlas al 85-90% de su peso inicial. Se comenzó este protocolo con las fases de condicionamiento operante (fases I y II, al menos 5 sesiones cada una), seguidas de la fase de intervalo fijo o FI (fase III, 24 sesiones) y finalmente la fase IV de entrenamiento y testeo (50% ensayos FI y 50% ensayos PI) durante 32 sesiones (sesiones 1 a 32 de la fase IV).

Estimación de tiempo en ratas PnX vs. Sham con administración de melatonina

A partir de dos grupos de ratas PnX y Sham (n=8/grupo) se realizó una subdivisión en cuatro grupos. A dos de estos grupos se les administró melatonina (MT, Sigma-Aldrich, St Louis, MO; 1 mg/kg/día) en una solución acuosa de etanol 0.1% (vehículo) vía agua de bebida. Se disolvió la cantidad adecuada de MT en cada caso para llegar a la dosis propuesta teniendo en cuenta el volumen diario de líquido ingerido por cada rata. Por otro lado, a las ratas pertenecientes a los grupos controles se les administró solo el vehículo en el agua de bebida. Las botellas estuvieron disponibles durante las 24 hs, pero aproximadamente el 95% del agua es ingerida por las ratas durante la fase de oscuridad (Stephan y Zucker, 1972). Se realizó este protocolo durante 16 sesiones más de fase IV (sesiones 33 a 49).

Estimación de tiempo en ratas PnX vs. Sham luego de una simulación de *jet-lag* y entrenamiento y testeo durante el día

Luego de finalizado el experimento con administración de MT, los grupos Sham y PnX fueron sometidos a un *jet-lag* simulado por adelanto de fase de 11 horas del ciclo LO (ver figura 3.4). Los grupos continuaron siendo entrenados y testeados durante su sincronización al nuevo ciclo de LO manteniendo la hora reloj de entrenamiento previa al *jet-lag*, siendo ahora durante la fase de luz de los animales (ZT 5-9). Se realizó este protocolo durante 12 sesiones (sesiones 50 a 62 de fase IV).

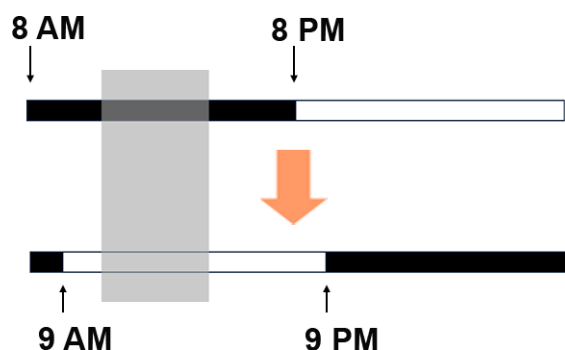


Figura 3.4. Esquema de luz/oscuridad previo y posterior al *jet-lag* por avance de 11 horas. La flecha indica el cambio de esquema de luz. La barra gris indica el momento del día en que se efectuó el entrenamiento, el cual se mantuvo luego del *jet-lag*. Por consiguiente, luego del adelanto del ciclo LO los animales continuaron siendo entrenados y testeados, pero ahora en su fase diurna.

Estimación de tiempo en ratas PnX vs. Sham con administración de melatonina exógena durante el día

Una vez que las ratas se sincronizaron al nuevo ciclo de LO, se comenzó a administrar nuevamente MT en agua de bebida (a partir de la sesión 62 de fase IV), en las mismas condiciones en las que se había administrado anteriormente. Esto se realizó con el objeto de probar si MT podía ejercer algún efecto sobre la estimación del tiempo, cuando este comportamiento era evaluado durante el día. Se realizó este protocolo durante 16 sesiones (sesiones 62 a 78 de la fase IV del protocolo).

Test de preferencia entre dos botellas

Con el fin de evaluar si las ratas PnX y Sham tenían igual preferencia por el agua azucarada (5% sacarosa en agua) que se utilizó como recompensa en el protocolo de estimación de intervalos cortos de tiempo, se llevó a cabo un ensayo de preferencia. El mismo estuvo basado en la elección entre dos botellas, una con agua y la otra con 5% de sacarosa en agua. Se colocó en las botellas el mismo volumen de líquido y se las ubicó en las jaulas de las ratas durante una hora. Luego, se midió el volumen final de cada botella y se calculó el volumen bebido restando los volúmenes (volumen inicial-volumen remanente). Las cantidades bebidas se relativizaron a la cantidad de líquido total ingerido (Nenchovska et al., 2014). El experimento se realizó en dos días consecutivos donde se procedió de igual manera pero rotando la posición de las botellas para eliminar

el sesgo por preferencia de lugar de ubicación de las botellas. El ensayo se realizó durante la fase de oscuridad de las ratas, momento en el cual ingieren el 95% del líquido total que consumen en 24 hs (Carpentieri et al., 2006).

Medición de Dopamina y DOPAC por HPLC-ED

Se adquirieron 16 ratas Wistar machos a las cuales se les realizó la remoción quirúrgica de la glándula pineal según el protocolo previamente descrito (10 ratas PnX y 10 ratas Sham). Posteriormente, se les administró MT o vehículo en agua de bebida durante dos semanas, formando los siguientes grupos: PnX+MT, PnX+vehículo, Sham+MT, y Sham+vehículo (n=5/grupo). Luego del tratamiento, los animales fueron sacrificados por decapitación a ZT 18 (fase nocturna) y sus cerebros fueron removidos y conservados a - 80°C. A partir de los mismos fueron tomadas muestras de estriado dorsal y homogeneizadas en 1 ml de ácido perclórico 0.3M. Las muestras fueron centrifugadas por 15 minutos a 3000 g a 4°C y luego conservadas a - 80°C hasta su uso. Tal como se describió en los Métodos del Capítulo 2, los niveles de DA y de DOPAC fueron medidos usando una columna 4.6 x 250-mm Hypersil Gold C18 (Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA). La cuantificación se realizó exponiendo el efluente de la columna a potenciales oxidantes y reductores en serie, usando un sistema de triple electrodo (Coulchem II; ESA, Bedford, MA, USA; Eisenhofer et al., 1986). La concentración de cada muestra fue corregida usando controles internos de DA y DOPAC y fue referida a la contenido de proteínas totales de cada muestra cuantificadas con el fluorómetro Qubit (Invitrogen) y utilizando el kit *Quant-iT Protein Assay Kit* (Invitrogen).

Estadística

Los resultados de estimación de tiempo se analizaron como se describió previamente (página 56). En todos los casos se chequeó la normalidad de los datos con el *test* de Shapiro-Wilk. En caso en que los datos fueron normales se procedió a utilizar *tests* estadísticos paramétricos. Su utilizaron pruebas de ANOVA de dos vías con medidas repetidas para analizar los índices S1 y S2 a través de las sesiones, así como el progreso de las presiones a través de las sesiones en fase I y II de condicionamiento operante. Se utilizó la prueba de ANOVA de una vía para el análisis de los parámetros derivados del ajuste de los datos a curvas de tipo Gaussiana (en los casos donde se analizaron más de dos grupos). En el caso de la comparación de una variable entre dos grupos, se utilizó el *test* de Student (t-test) a dos colas.

En los casos en los que los datos no fueron normales, se utilizaron las variantes no paramétricas de las pruebas de ANOVA de una vía y dos vías: el *test* de Kruskal-Wallis y el ANOVA de dos vías de Friedman, respectivamente, o bien la variante de t-test no paramétrico (Mann-Whitney U test a dos colas).

Todas las pruebas estadísticas se realizaron con el programa GraphPad Prism 5

(GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Resultados

Consumo de sacarosa.

Con el objetivo de probar si la remoción de la glándula pineal y la consecuente depleción de los niveles de melatonina en sangre podían afectar la preferencia por la recompensa utilizada en el protocolo de estimación de intervalos cortos de tiempo, se realizó el ensayo de preferencia entre dos botellas en ratas PnX y Sham. Los resultados obtenidos, expresados como consumo de agua con sacarosa sobre el consumo total de líquido, no mostraron diferencias significativas entre los grupos (Figura 3.5; $p=0,2833$, t-test a dos colas, $n=4$ /grupo). Este resultado comprobó que ambos grupos prefieren de igual forma el agua azucarada.

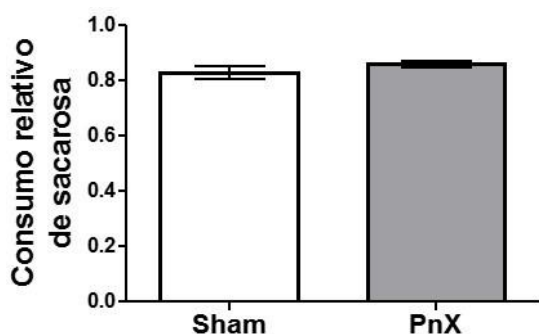


Figura 3.5. Consumo de sacarosa en ratas PnX vs. Sham. El gráfico muestra el consumo de sacarosa relativizado al consumo de líquido total. El parámetro analizado no mostró diferencias entre los grupos Sham y PnX ($p=0,2833$, t-test a dos colas, $n=4$ /grupo). Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

Efecto de la falta de melatonina en la estimación de intervalos cortos de tiempo.

Como se pudo demostrar en los capítulos anteriores de esta tesis, la estimación de intervalos cortos de tiempo está sujeta a modulación por parte del sistema circadiano. Por lo tanto, este proceso cognitivo es sensible a la hora del día en la cual se realice. Con el objeto de elucidar si la hormona melatonina podría actuar como un mensajero circadiano, ejerciendo efecto sobre el cuerpo estriado y afectando así la estimación de intervalos cortos de tiempo, se evaluó el protocolo de intervalos cortos de tiempo en ratas que no poseían esta hormona en circulación. Esto mismo se logró practicándoles una pinealectomía. Debido a los resultados previos en ratones de un mejor desempeño en el protocolo de estimación de tiempo durante la noche, se utilizó este horario para la evaluación del protocolo en ratas.

Durante las fases I y II, en las cuales las ratas aprendieron a relacionar la presión de la palanca con la obtención de la recompensa (sacarosa 5% en agua), no se observaron diferencias significativas en el número de presiones (Figuras 3.6 A y C, $p=0.84$ para Fase I, $p=0.32$ para Fase II, t-test a dos colas, $n=8$ /grupo), ni en la velocidad de adquisición de la asociación por parte de los grupos (Figuras 3.6 B y D, fase I $p=0,9438$, fase II $p=0,3680$ para el factor grupos; y fase I $p=0,0310$, fase II $p=0,0052$ para el factor sesiones, ANOVA de dos vías de medidas repetidas a lo largo de las cinco sesiones de cada fase).

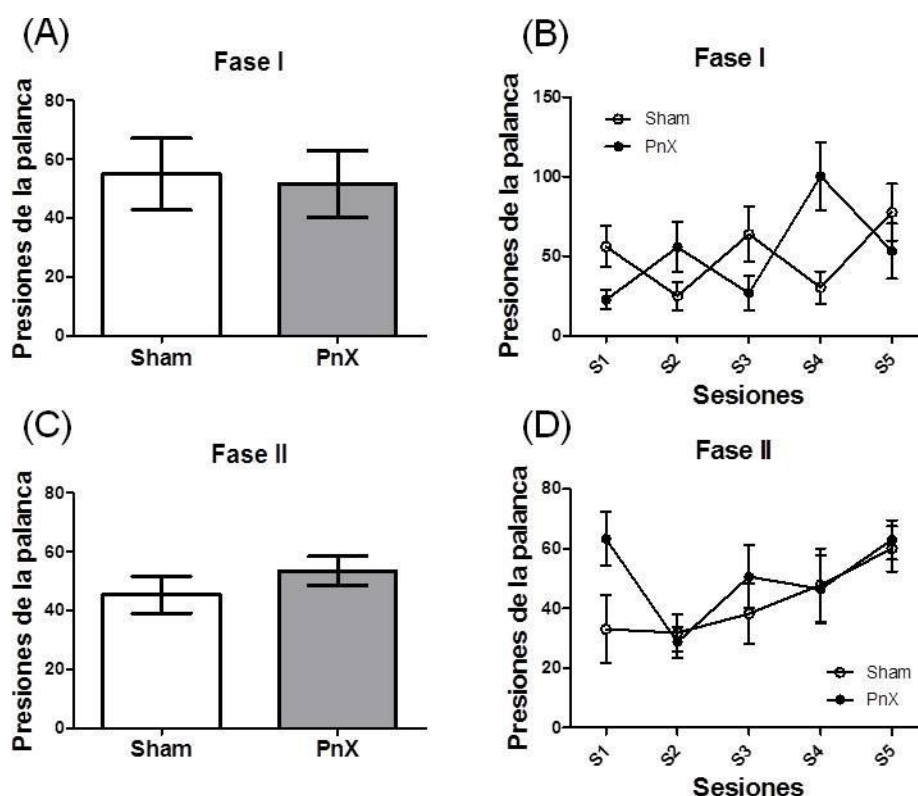


Figura 3.6. Efecto de la pinealectomía sobre el condicionamiento operante Promedio de las presiones totales realizadas durante las cinco sesiones de fase I (A) y de fase II (C) para los grupos Sham (barra blanca) y PnX (barra gris). Fase I: $p=0.84$; fase II: $p=0.32$, t-test a dos colas, $n=8$ /grupo. (B) y (D) muestran la evolución del promedio de presiones a través de las cinco sesiones de fase I (B) y de fase II (D) para los grupos Sham (círculos blancos) y PnX (círculos negros). Fase I: $p=0.9438$ para el factor grupos, $p=0.0310$ para el factor sesiones; fase II: $p=0.3680$ para el factor grupos, $p=0.0052$ para el factor sesiones, ANOVA de dos vías de medidas repetidas, $n=8$ /grupo). Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

En la fase III, en la que fue introducido el criterio temporal de 24 segundos, la *performance* de ambos grupos mostró diferencias significativas. Se analizó el índice S1 de adquisición del comienzo de la respuesta. En esta fase, ambos grupos lograron aprender a inhibir la respuesta en momentos previos al intervalo *target* y aumentar la tasa de respuesta en un tiempo cercano al mismo. Sin embargo, el grupo Sham lo realizó de manera más eficiente que el grupo PnX, logrando valores más altos para este índice a través de las sesiones (Figura 3.7; $p=0.0086$ para el factor grupos, $p<0.0001$ para el factor sesiones; ANOVA de dos vías de medidas repetidas, $n=8$ /grupo).

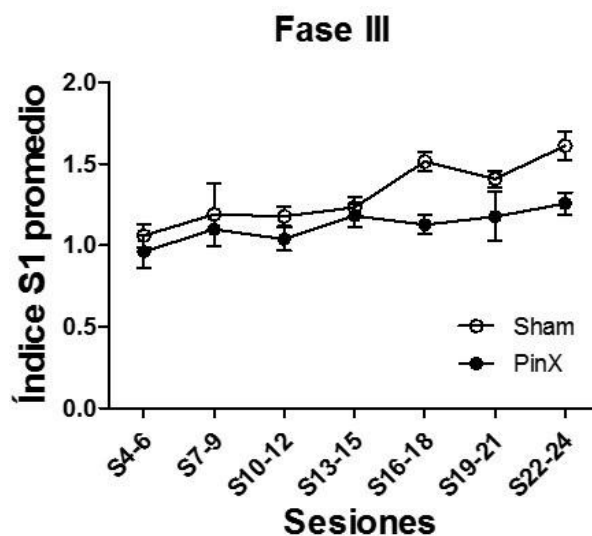


Figura 3.7. Efecto de la pinealectomía sobre el índice S1 en la fase de intervalo fijo (FI).

Evolución de los promedios del índice S1 a través de las sesiones de la fase III de entrenamiento (FI) para los distintos grupos: ratas Sham (círculos blancos) y ratas PnX (círculos grises). $p < 0.0001$ para el factor sesiones, $p = 0,0086$ para el factor grupos, ANOVA a dos vías de medidas repetidas, $n = 8/\text{grupo}$. Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

En la fase IV del protocolo (entrenamiento y testeo), las tasas de respuesta normalizadas para las últimas cuatro sesiones de cada grupo fueron ajustadas a una curva de tipo Gaussiana. Ambos grupos lograron obtener una respuesta ajustable a una curva de este tipo, con un máximo centrado en el intervalo *target* (24 segundos, Figuras 3.8 A y B). A partir de las curvas obtenidas se calcularon los siguientes parámetros: ubicación del pico, ancho de la curva y alto (amplitud) de la curva (Figuras 3.8 C, D y E). El grupo de ratas PnX mostró menor altura y mayor ancho en la curva, lo cual denota una respuesta más dispersa, en comparación con el grupo de ratas Sham. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en la ubicación del pico (Figura 3.8C; $p = 0.87$ para la ubicación del pico, Figura 3.8D; $p = 0.03$ para el alto y Figura 3.8E; $p = 0.02$ para el ancho de la curva, *t*-test a dos colas, $n = 8/\text{grupo}$).

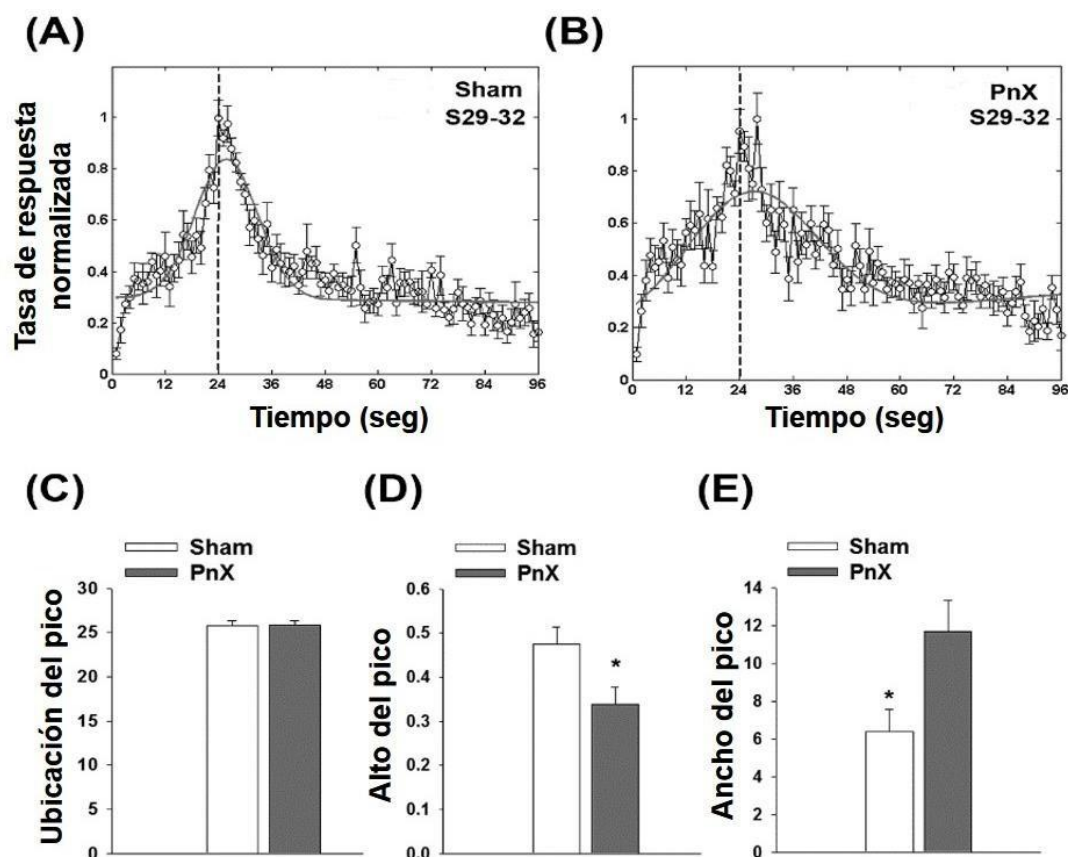


Figura 3.8. Efecto de la pinealectomía sobre los ensayos de prueba en el protocolo de estimación del tiempo. Se muestra la tasa de respuesta normalizada en función del tiempo correspondiente a los ensayos de prueba (PI) del último bloque de sesiones de fase IV (sesiones 29-32) en los grupos Sham (A) y PnX (B). La línea punteada representa el intervalo *target* (24 segundos) y la líneas continuas, el ajuste a una curva de tipo Gaussiana. En (C), (D) y (E) se muestran los parámetros derivados del ajuste gaussiano para los grupos Sham (barras blancas) y PnX (barras grises). * $p < 0.05$, t-test a dos colas para cada parámetro, $n = 8/\text{grupo}$. Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

Los índices S1 y S2 indicaron que ambos grupos lograron aprender a comenzar y terminar, respectivamente, la respuesta cercana al intervalo dado. Esto se evidencia en las pendientes positivas que poseen las curvas de ambos parámetros a lo largo de las sesiones para ambos grupos. Sin embargo, el grupo de ratas Sham adquirió valores más altos que el grupo de ratas PnX en los parámetros S1 y S2, indicando un mejor desempeño en la realización de la tarea (Figura 3.9A; Índice S1 promedio $p < 0.001$ para el

factor sesiones, $p < 0.001$ para el factor grupos; Figura 3.9B; índice S2 promedio $p < 0.001$ para el factor sesiones y $p < 0.001$ para el factor grupos, ANOVA a dos vías de medidas repetidas, $n=8/\text{grupo}$).

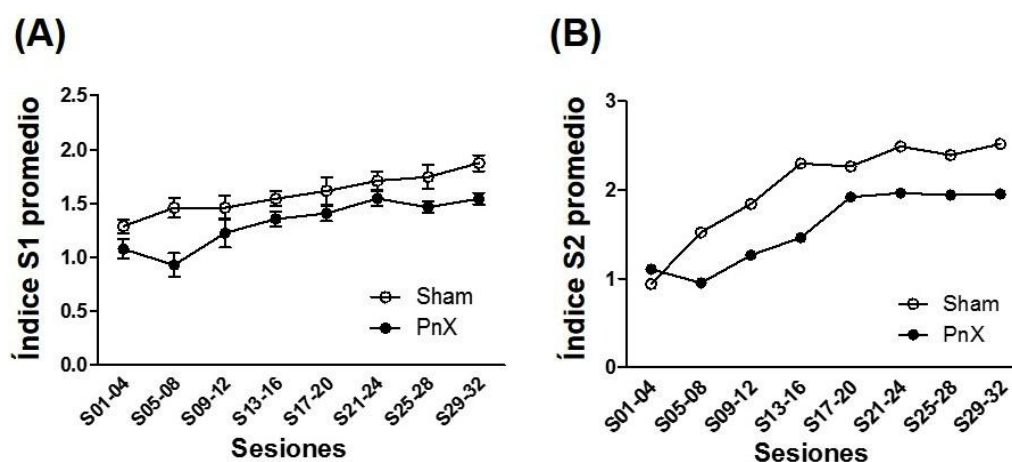


Figura 3.9. Efecto de la pinealectomía sobre los índices S1 y S2 en los ensayos de prueba (PI). Índices S1 (A) y S2 (B) a través de las sesiones para los grupos Sham (círculos blancos) y PnX (círculos negros). $p < 0.001$ para el factor sesiones, $p < 0.001$ para el factor grupos para ambos índices, ANOVA a dos vías de medidas repetidas, $n=8/\text{grupo}$. Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

Por otro lado, se realizó el análisis *trial* por *trial* de cada sujeto en los puntos medio y final del testeo de estimación de tiempo. De esta forma, se obtuvieron los parámetros comienzo, final y ubicación del pico con valores numéricos de tiempo para cada grupo en los bloques de sesiones 13-16 (punto medio del entrenamiento y testeo) y 29-32 (punto final del entrenamiento y testeo). En el bloque de sesiones 13-16, el grupo de ratas PnX mostró valores más bajos del parámetro “comienzo”, haciendo referencia a un disparo más temprano en la respuesta (Figura 3.10). Esto a su vez influyó en el parámetro “ubicación del pico”, ya que el punto medio de la respuesta se desplazó hacia valores más pequeños en el tiempo, dando una ubicación del pico en momentos previos a los 24 segundos fijados como intervalo *target* ($p=0.01$ para el parámetro “comienzo”, $p=0.12$ para el parámetro “final” y $p=0.002$ para el parámetro “ubicación del pico”, $p=$

para “distribución”, t-test a dos colas, $n=8/\text{grupo}$). Luego de 32 sesiones en la fase IV del protocolo, las diferencias en los parámetros del análisis *trial* por *trial* desaparecieron entre los grupos ($p=0.71$ para el parámetro “comienzo”, $p=0.48$ para el parámetro “final” y $p=0.47$ para el parámetro “ubicación del pico”, $p=0.75$ para “distribución”, t-test a dos colas, $n=8/\text{grupo}$).

Estos resultados indican que, si bien las ratas PnX son capaces de aprender la tarea de estimación de tiempo, el aprendizaje se da más eficientemente en las ratas que poseen melatonina endógena. Sin embargo, luego de varias sesiones de entrenamiento ambos grupos llegan a tener resultados similares en el test de estimación temporal.

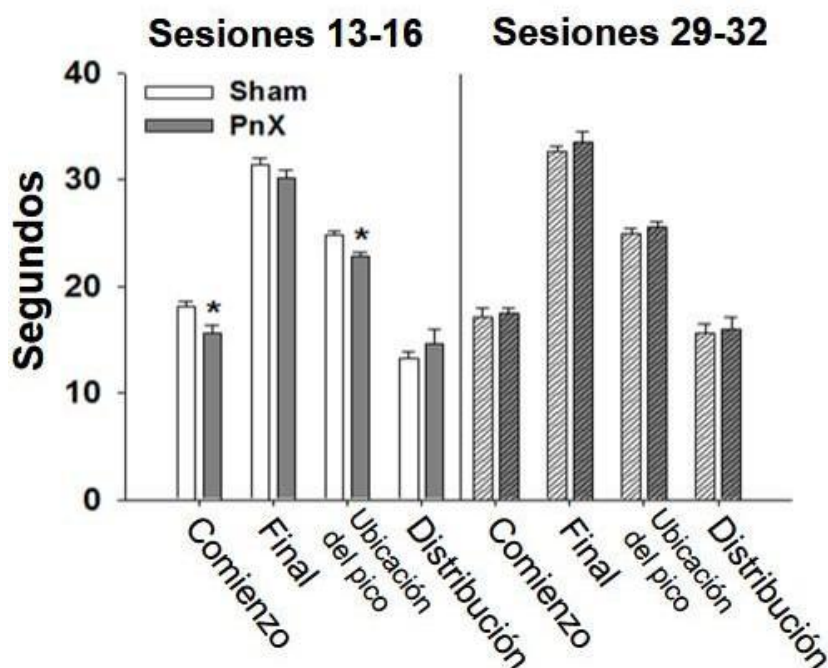


Figura 3.10. Efecto de la pinealectomía sobre el análisis *single trial* de los ensayos de prueba (PI).

Parámetros “comienzo”, “final”, “ubicación del pico” y “distribución” (de la respuesta) derivados del análisis *trial por trial* en los bloques de sesiones 13-16 y 29-32 para los grupos Sham (barras blancas en el bloque 13-16 y blancas rayadas en el bloque 29-32) y PnX (barras grises en el bloque 13-16 y grises rayadas en el bloque 29-32). * $p < 0.05$; $n = 8$ /grupo, t-test a dos colas para cada parámetro analizado. Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

Efecto de la administración de melatonina (MT) sobre la estimación de intervalos cortos de tiempo

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, donde la falta de melatonina causó que las ratas necesitaran más sesiones de entrenamiento para llegar a alcanzar un desempeño similar a las ratas control, se decidió administrar MT exógena a las ratas PnX, de modo de restablecer los niveles de la hormona en circulación. La administración se realizó mediante la disolución de la hormona comercial en agua de bebida (1 mg/kg/día), como se indica en los Métodos. Se utilizó como vehículo 0.1% etanol en agua. La administración comenzó en

la sesión 33 de la fase IV del protocolo y se extendió hasta la sesión 50.

En la Figuras 3.11 A y B puede verse la tasa de respuesta normalizada en función del tiempo para el último bloque de sesiones (sesiones 47-50). Más precisamente, en los parámetros obtenidos a partir del ajuste a una curva de tipo Gaussiana (Figuras 3.11 C, D y E) es donde se observa que no hubo diferencias significativas entre los grupos ($p=0.08$ para la ubicación del pico, $p=0.93$ para el alto de la curva, y $p=0.33$ para el ancho de la curva; t-test a dos colas, $n=4/\text{grupo}$).

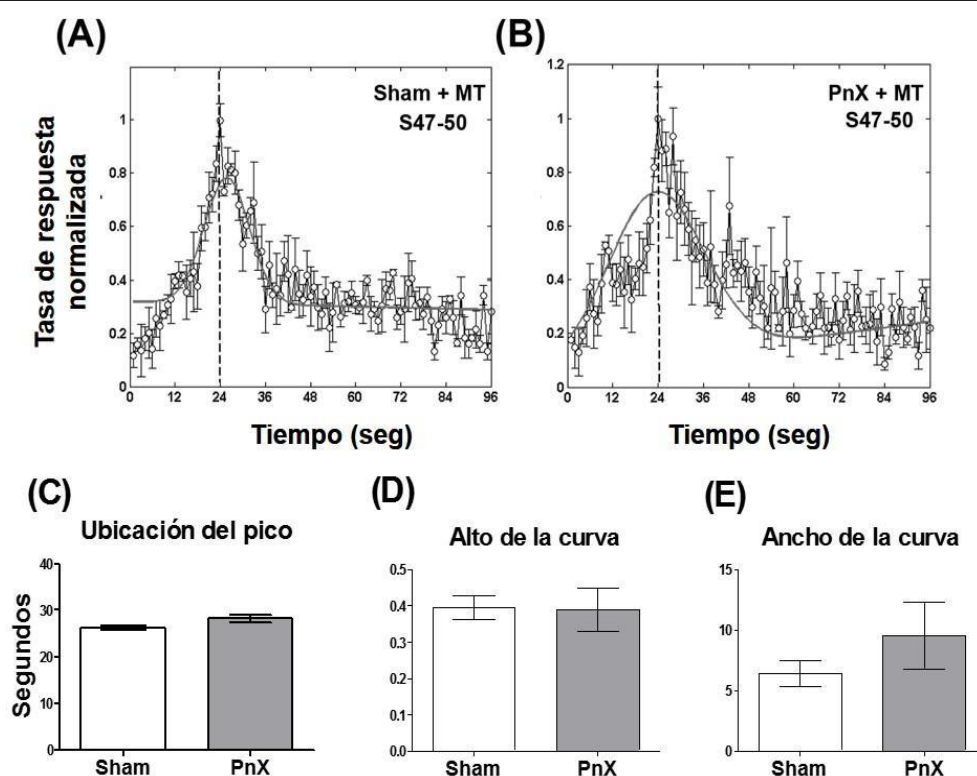


Figura 3.11. Efecto de la administración exógena de MT. Curvas de respuesta normalizadas en función del tiempo para el bloque de sesiones 47-50 de los ensayos de prueba (PI) de fase IV. La línea punteada representa el intervalo *target* (24 segundos) y las líneas continuas, las curvas de tipo Gaussianas ajustadas para los grupos Sham+MT (A) y PnX+MT (B). (C), (D) y (E) muestran los parámetros derivados del ajuste a una curva de tipo Gaussiana de las curvas de respuesta normalizada para los grupos Sham+MT (barras blancas) y PnX+MT (barras grises). $p>0.05$ para todos los parámetros, t-test a dos colas, $n=4/\text{grupo}$.

Las Figuras 3.12 A y B muestran los índices S1 y S2, respectivamente, para los grupos Sham+MT, PnX+MT y PnX+vehículo. El grupo de ratas PnX al que se les administró MT en agua de bebida mostró una mejora en el primer bloque de sesiones luego del comienzo de la administración (sesiones 35-38), alcanzando valores similares a los de las ratas Sham para ambos índices. En los bloques de sesiones siguientes no se observaron diferencias en los valores de los índices entre los grupos tratados con MT (Figura 3.12A; índice S1 promedio: $p < 0.01$ para el factor sesiones, $p > 0.05$ para el factor grupos; Figura 3.12B; índice S2 promedio: $p < 0.05$ para el factor sesiones, $p > 0.05$ para el factor grupos; ANOVA de dos vías de medidas repetidas, $n=4$ /grupo). Cabe destacar, además, que el grupo PnX+MT mostró diferencias significativas cuando se lo comparó con el grupo PnX+vehículo (Figura 3.12A; índice S1 promedio: $p < 0.0001$ y Figura 3.12B; índice S2 promedio: $p < 0.001$ para el factor grupos, ANOVA a dos vías de medidas repetidas).

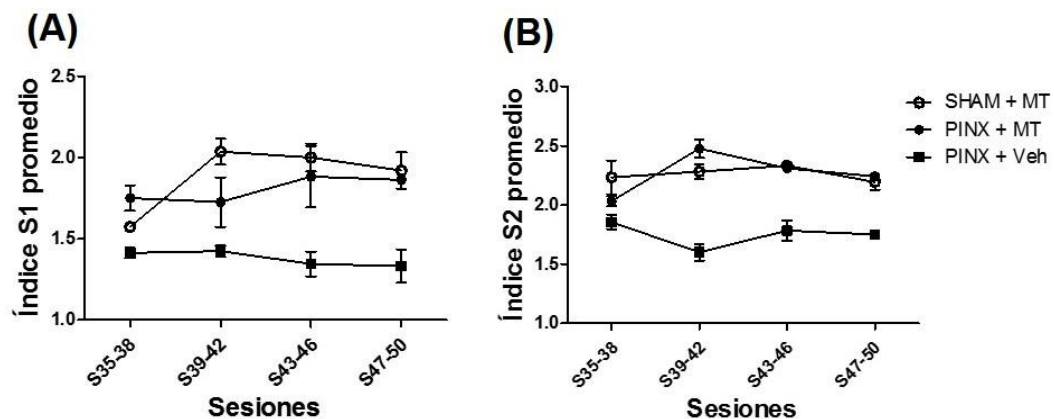


Figura 3.12. Efecto de la administración de MT exógena en los índices S1 y S2 de los ensayos de prueba (PI). (A) y (B) Índices S1 y S2, respectivamente, a través de las sesiones para los grupos Sham+MT (círculos blancos), PnX+MT (círculos negros) y PnX+vehículo (cuadrados negros). $p < 0.001$ para el factor sesiones, $p < 0.001$ para el factor grupos para ambos índices, ANOVA de dos vías de medidas repetidas de Friedman, $n=4$ /grupo.

Además, se realizó el análisis *trial* por *trial* de cada sujeto de cada grupo para los bloques de sesiones 35-38 (principio del testeo con MT exógena) y 47-50 (bloque final del testeo con MT exógena), Figuras 3.13 A y B respectivamente. El mismo reveló que no hubo diferencias significativas entre las variables medidas para los grupos tratados con MT (Sham y PnX) en ambos bloques, mientras que sí hubo diferencias significativas entre los grupos tratados con MT y el grupo PnX+vehículo en el último bloque (sesiones 47-50, Figura 3.14B). Sesiones 35-38: $p=0.61$ para el parámetro “comienzo”, $p=0.94$ para el parámetro “final”, $p=0.90$ para la ubicación del pico y $p=0.81$ para la distribución de la respuesta; sesiones 47-50: $p=0.004$ para el parámetro “comienzo”; $p=0.36$ para el parámetro “final”, $p=0.13$ para la ubicación del pico y $p=0.04$ para la distribución de la respuesta, ANOVA a una vía para cada parámetro, $n=4$ /grupo).

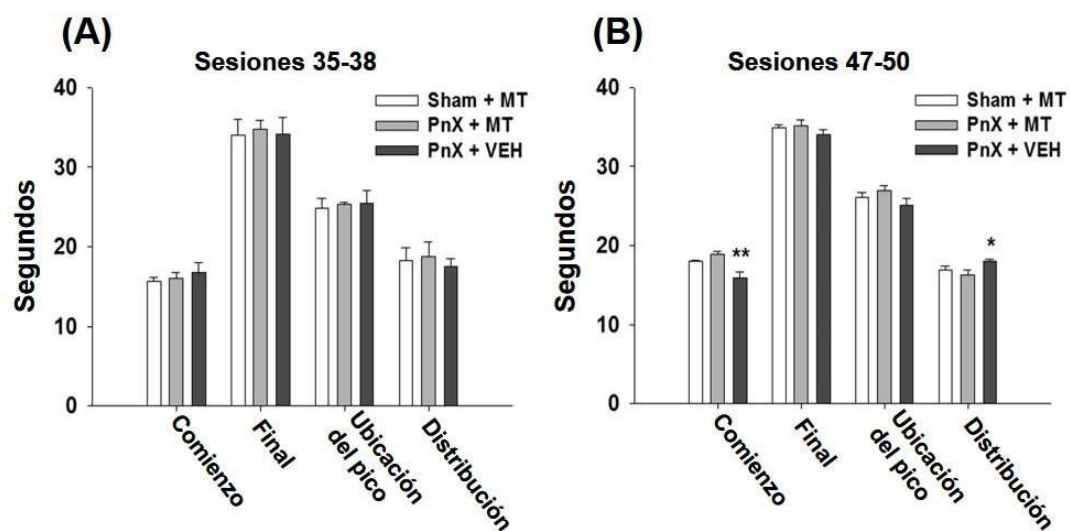


Figura 3.13. Efecto de la administración MT en el análisis *single trial*. Parámetros “comienzo”, “final”, “ubicación del pico” y “distribución” derivados del análisis *trial* por *trial* en los bloques de sesiones 35-38 y 47-50 de los grupos Sham+MT (barras blancas), PnX+MT (barras gris claro) y PnX+veh (barras gris oscuro; ANOVA de una vía para cada parámetro analizado seguido de test de Tukey, $*p<0.05$, $**p<0.01$; $n=4$ /grupo). Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

Estos resultados sugieren que la administración de melatonina exógena puede restaurar la precisión en la estimación de intervalos cortos de tiempo en ratas que carecen de la misma. Además, se pudo ver que la administración de la hormona no tiene efecto en ratas que sí poseen la hormona endógena.

Efecto de un *jet-lag* simulado sobre la estimación de intervalos cortos de tiempo en ratas

Como se pudo ver en el capítulo I, un cambio abrupto en el esquema de iluminación (*jet-lag* simulado) fue capaz de desmejorar el desempeño de los animales en un protocolo de estimación de tiempo. Con el objeto de estudiar el impacto de la ausencia de MT endógena en el desempeño en la tarea de estimación de tiempo de los animales sometidos a un protocolo de desincronización abrupta, se sometió a los grupos de ratas Sham y PnX a un *jet-lag* simulado por avance de once horas en su ciclo de LO. Este avance se realizó luego de la sesión 50 de entrenamiento y testeo de la fase IV del protocolo. A partir del cambio en el esquema de luz, el horario de entrenamiento se mantuvo, por lo que las ratas comenzaron a ser entrenadas y testeadas durante el día. Las Figuras 3.15 A y B muestran los Índices S1 y S2, respectivamente, para ambos grupos a través de los bloques de sesiones previos y posteriores a la simulación de *jet-lag*. En ambos parámetros se observa que en el bloque de sesiones posterior al cambio del ciclo LO, ambos grupos tuvieron una caída en los valores de estos índices, indicando un decremento en la *performances* de estos animales en la tarea de estimación de tiempo. Sin embargo, el grupo Sham presentó una menor caída en los valores de los índices S1 y S2 en el bloque de posterior al *jet-lag* comparado con el grupo PnX (Figura 3.15A; índice S1 promedio: $p=0.01$ para el factor sesiones, $p=0.30$ para el factor grupos y Figura 3.15B; índice S2 promedio: $p=0.003$ para el factor sesiones y $p=0.03$ para el factor grupos, ANOVA de dos vías de medidas repetidas de Friedman comparando el bloque de sesiones anterior al *jet-lag* (sesiones 47-50) con el bloque de sesiones inmediatamente posterior (sesiones 51-54).

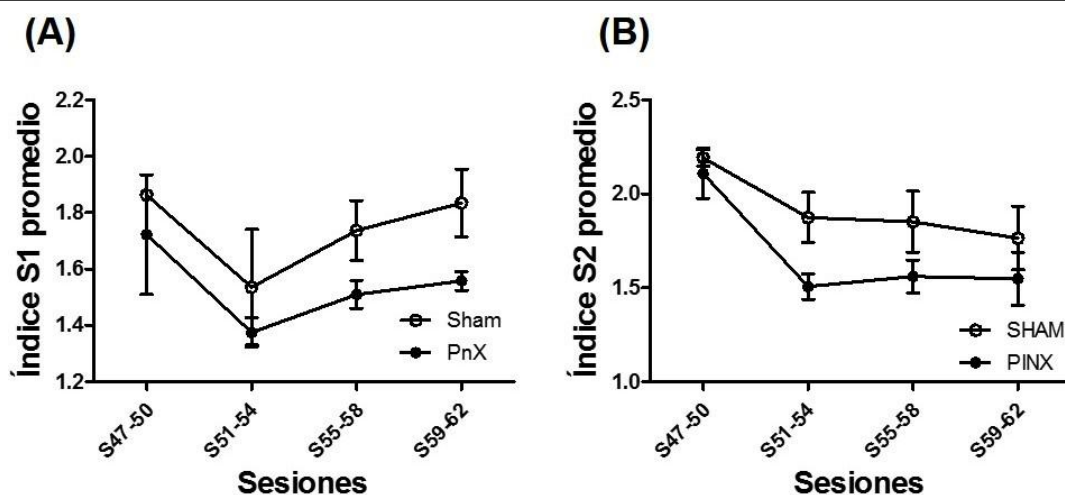


Figura 3.15. Efecto en la estimación de tiempo de un cambio abrupto del ciclo luz/oscuridad.

(A) y (B) representan los índices S1 y S2 promedio a través de los bloques de sesiones de los ensayos PI, para ratas Sham (círculos blancos) y PnX (círculos negros). El bloque de sesiones 47-50 corresponde al bloque previo al *jet-lag* simulado, mientras que el bloque 51-54 es el posterior al mismo. Índice S1 promedio: $p < 0.05$ para el factor sesiones, $p > 0.05$ para el factor grupos; índice S2 promedio: $p < 0.001$ para el factor sesiones, $p < 0.05$ para el factor grupos, ANOVA de dos vías de medidas repetidas de Friedman, $n = 4$ /grupo. Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

El análisis *trial por trial* para cada individuo de cada grupo, reveló un incremento en el valor del parámetro “final” y en la distribución de la respuesta en las ratas PnX en el bloque de sesiones inmediatamente posterior al *jet-lag* (Figura 3.16; sesiones 51-54, $p = 0.69$ para el parámetro “comienzo”, $p = 0.029$ para el parámetro “final”, $p = 0.25$ para el parámetro “ubicación del pico”, y $p = 0.028$ para distribución de la respuesta; Mann-Whitney U test no paramétrico a dos colas, $n = 4$ /grupo). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los grupos en las sesiones 59-62 ($p = 0.11$ para “comienzo”, $p = 0.49$ para “final”, $p = 0.20$ para ubicación del pico y $p = 0.89$ para distribución de la respuesta, Mann-Whitney U test a dos colas no paramétrico, $n = 4$ /grupo), indicando que luego de la resincronización, ambos grupos presentaron la misma capacidad de estimar el tiempo.

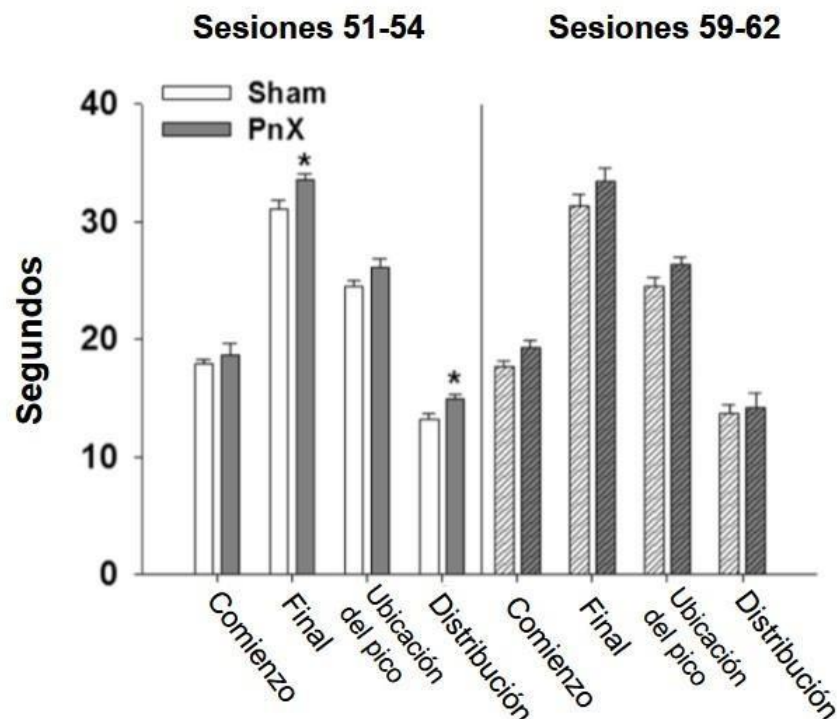


Figura 3.16. Efecto de un cambio abrupto del ciclo luz/oscuridad en los parámetros del análisis *single trial*. Parámetros “comienzo”, “final”, “distribución” y “ubicación del pico” derivados del análisis *trial por trial* en los bloques de sesiones 51-54 y 59-62 para los grupos Sham (barras blancas en sesiones 51-54 y barras blancas rayadas en sesiones 59-62) y PnX (barras grises en sesiones 51-54 y barras grises rayadas en sesiones 59-62). Mann-Whitney U test a dos colas, * $p < 0.05$, $n = 4$ /grupo. Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

Estos resultados indican un mayor efecto de una desincronización circadiana abrupta sobre el grupo PnX, que no posee melatonina endógena. Por otro lado, el menor efecto sobre el grupo Sham indicaría un rol protector de la hormona endógena sobre cambios abruptos en el ciclo de luz/oscuridad.

Efecto de la administración de melatonina en animales testeados durante el día

Resultados previamente expuestos en esta tesis demostraron que la estimación de intervalos cortos de tiempo varía con la hora del día, siendo en ratones más precisa durante la noche, momento en el cual estos animales se encuentran activos.

Con el objetivo de probar si la administración de MT exógena podría mejorar la

estimación de tiempo durante el día, las ratas Sham y Pnx fueron entrenadas y testeadas durante su fase de luz.

Luego del *jet-lag* descripto anteriormente, una vez que los animales se readaptaron al nuevo esquema de iluminación, se comenzó nuevamente con la administración de melatonina en agua de bebida. Las ratas continuaron siendo entrenadas durante el día durante 16 sesiones.

De los datos obtenidos a partir del último bloque de sesiones de esta etapa (sesiones 75-78), se analizó el índice S1 promedio para los grupos Sham+MT y PnX+MT, el cual no mostró diferencias significativas entre los mismos (Figura 3.17A; $p=0.85$ para el factor sesiones, $p=0.11$ para el factor grupos, ANOVA de dos vías de medidas repetidas de Friedman, $n=4$ /grupo). Sin embargo, en el análisis de los valores del índice S2, se encontró que el grupo Sham sufrió una disminución a lo largo de las sesiones, mientras que el grupo PnX mantuvo los valores constantes pero más bajos (Figura 3.17B; $p=0.50$ para el factor sesiones, $p=0.005$ para el factor grupos, ANOVA de dos vías de medidas repetidas de Friedman, $n=4$ /grupo).

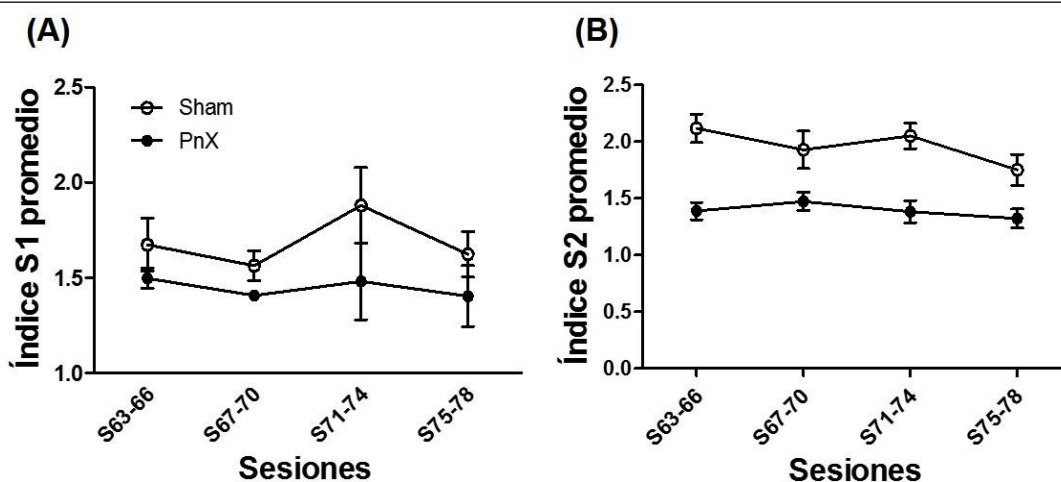


Figura 3.17. Efecto de la administración de MT sobre los índices S1 y S2 de ratas entrenadas y testeadas durante el día. (A) y (B) muestran los índices S1 y S2, respectivamente, a través de los bloques de sesiones para los grupos Sham+MT (círculos blancos) y PnX+MT (círculos negros). Índice S1 promedio: $p>0.05$ para el factor sesiones y $p>0.05$ para el factor grupos; índice S2 promedio: $p>0.05$ para el factor sesiones y $p<0.01$ para el factor grupos, ANOVA de dos vías de medidas repetidas de Friedman, $n=4$ /grupo.

Esta diferencia entre los grupos no fue apreciable en el análisis *trial por trial* (Figura 3.18; $p=0.49$ para el parámetro “comienzo”, $p=0.69$ para el parámetro “final”, $p=0.69$ para

la ubicación del pico y $p=0.77$ para la distribución de la respuesta, Mann-Whitney U test a dos colas, $n=4/\text{grupo}$).

Los resultados obtenidos sugieren que la administración de melatonina en agua de bebida no fue capaz de mejorar la *performance* de los animales en la tarea evaluada cuando la misma fue realizada durante la fase de luz, siendo esta fase coincidente con su fase de reposo y con niveles casi indetectables de melatonina en sangre en condiciones fisiológicas. Esto indica que el efecto de la hormona es horario-específico, y que su administración exógena sólo tiene efecto sobre esta prueba cognitiva cuando se realiza en la fase de oscuridad de las ratas.

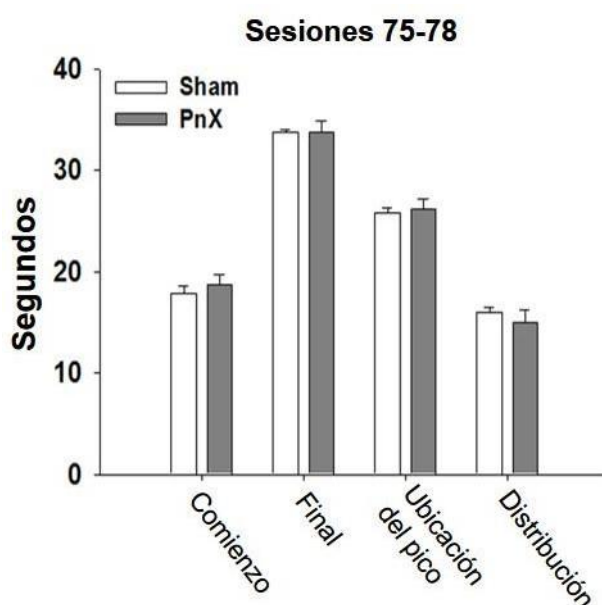


Figura 3.18. Efecto de la administración exógena de MT sobre el análisis *single trial* de ratas entrenadas y testeadas durante el día. Parámetros “comienzo”, “final”, “ubicación del pico” y “distribución de la respuesta” derivados del análisis *trial* por *trial* en el bloque de sesiones 75-78 para los grupos Sham (barras blancas) y PnX (barras grises). $P>0.05$ para todos los parámetros, Mann-Whitney U test a dos colas, $n=4/\text{grupo}$. Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

Efecto de melatonina sobre los niveles de dopamina en el cuerpo estriado.

La estimación de intervalos cortos de tiempo depende de un funcionamiento óptimo de las vías dopaminérgicas. Como se mostró en el capítulo anterior, los niveles de dopamina estriatal correlacionan con la exactitud y precisión en la estimación de intervalos cortos de tiempo en ratones. Además, estudios previos han demostrado que la hormona melatonina y el neurotransmisor dopamina tienen una correlación negativa en varios tejidos y estructuras cerebrales (Zisapel, 2001, Dominguez-Lopez et al., 2014).

Con el objetivo de comprobar si el mejoramiento en la estimación de tiempo por efecto de la administración de melatonina exógena en ratas PnX estaba relacionado con cambios en los niveles de dopamina en el cuerpo estriado, los niveles del neurotransmisor fueron medidos por HPLC-ED. Las mediciones fueron realizadas en muestras provenientes de ratas PnX y Sham con administración de melatonina o vehículo en agua de bebida. Las muestras se tomaron durante la noche, seis horas después del apagado de las luces (ZT18).

En la figura 3.19 se observa que en ratas PnX con administración de vehículo, los niveles de DA estriatal se encuentran aumentados en comparación con las ratas control (Sham con administración de vehículo). A su vez, este aumento pudo ser revertido mediante la administración exógena de melatonina. Por otro lado, la administración de la hormona no generó cambios en los niveles del neurotransmisor en las ratas Sham. Estos resultados indican que la depleción de melatonina (a causa de la remoción quirúrgica de la glándula pineal) causa un aumento en los niveles de dopamina en el estriado, el cual es revertido por la administración exógena de dicha hormona.

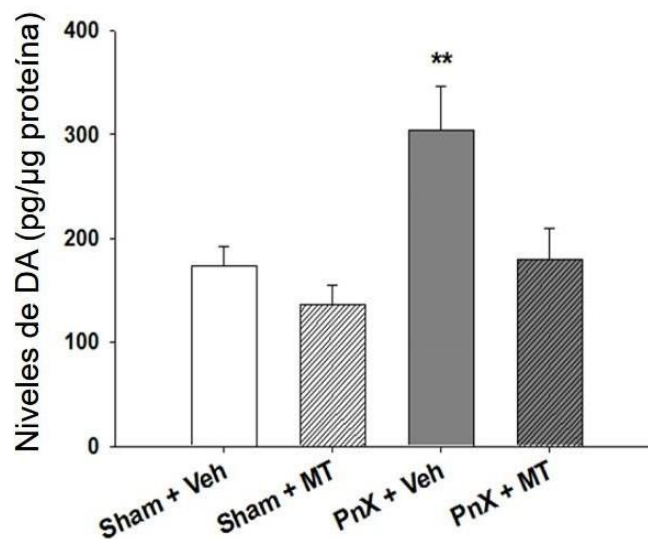


Figura 3.19. Efecto de MT sobre los niveles de DA en el estriado dorsal. Se muestran los niveles de dopamina estriatal medidos por HPLC-ED en los grupos: Sham+veh (barra blanca), Sham+MT (barra blanca rayada), PnX+veh (barra gris) y PnX+MT (barra gris rayada). $p=0,0094$ para el factor grupos (Sham vs. PnX); $p=0,0144$ para el factor tratamiento (MT vs. VEH). ANOVA de dos factores seguido de comparaciones múltiples de Bonferroni, $*p<0.05$; $n=5/\text{grupo}$). Datos expresados como promedio $\pm$ SEM.

Discusión

El objetivo general de este tercer capítulo fue dilucidar el rol de la hormona circadiana melatonina sobre la estimación de intervalos cortos de tiempo, proponiéndola como posible modulador circadiano del comportamiento.

En primer lugar, se demostró que la falta de MT endógena no afectó la preferencia de agua con sacarosa frente a agua común (Figura 3.5). Este control fue necesario para luego comparar estos grupos bajo el protocolo de estimación temporal utilizado, el cual involucra una recompensa de esa naturaleza. Esto es debido a que anteriormente varios trabajos demostraron que la falta de MT, por remoción quirúrgica de la glándula pineal en ratas o por delección del receptor MT1 en ratones, ocasiona un fenotipo depresivo en los animales, reduciendo el consumo de sacarosa (Nenchevskaya et al., 2014; Comai et al., 2015).

Luego se comparó, mediante el protocolo de estimación de intervalos cortos de tiempo, el desempeño entre ratas Sham y ratas PnX. Se demostró que las ratas que poseen MT endógena logran una mejor *performance* que aquellas que no la poseen (Figuras 3.8 y 3.10). Si bien en las últimas sesiones del entrenamiento los grupos alcanzaron resultados similares, las pendientes de aprendizaje del aumento de la respuesta en tiempos cercanos al intervalo *target* fueron más pronunciada en ratas Sham que en ratas PnX. Además, mediante el análisis *trial* por *trial* pudo verse que las ratas PnX mostraron un comienzo de respuesta más temprano y un corrimiento de la ubicación de pico hacia valores menores que las ratas Sham. Este comienzo de respuesta temprano es asociado generalmente con un estado motivacional alto provocado por niveles altos de dopamina en el estriado (Balci, 2014). Por otro lado, la mejora evidenciada en las ratas PnX puede ser explicada por el hecho de que la MT no es el único mensajero del reloj circadiano.

En un sistema que no tiene MT, la modulación circadiana puede estar ejecutada por otras señales eferentes del reloj, nerviosas o humorales (Pevety Challet, 2011).

En este capítulo también se demostró que la administración de MT exógena mejora el desempeño de las ratas PnX, igualando de esta forma a las ratas Sham (Figuras 3.11 y 3.14). Esto pudo verse por medio de los análisis promedio y *trial* por *trial*, donde las ratas PnX con administración de MT retoman valores normales de “comienzo” de la respuesta semejantes a los obtenidos por las ratas Sham y significativamente distintos al grupo PnX con administración de vehículo. Además, la administración de MT no tuvo efecto sobre las ratas Sham que poseen la hormona endógena. Esto se debe a que la hormona administrada de forma endógena sólo tiene efecto en el momento que la hormona endógena está en concentraciones bajas o no se encuentra en el sistema (Pevet y Challet, 2011). Como la forma de administración fue mediante agua de bebida, la misma ocurrió de manera prolongada durante la noche, momento en el cual las ratas consumen el 95% del agua en el transcurso de un día (Carpentieri et al., 2006). Por lo tanto, la administración ocurre en el mismo momento en que la

hormona endógena tiene su máxima liberación en las ratas Sham, con lo cual es esperable que la misma no tenga efecto sobre la estimación temporal en este grupo.

Además, se comprobó que la exposición a un cambio brusco en el esquema de luz/oscuridad, como es un adelanto de fase de 11 horas, perjudica el desempeño en la tarea de estimación de tiempo en ambos grupos de ratas (Figuras 3.15 y 3.16). Esta desmejora en la capacidad de estimar el tiempo luego de una simulación de *jet-lag* coincide con estudios que afirman que las condiciones de desincronización interna causadas por trabajos en turnos rotativos y *jet-lag* crónicos causan problemas de sueño y alerta, y afectan asimismo capacidades cognitivas y metabólicas en humanos y animales (Kyriacou y Hastings, 2010, Wright et al., 2012). Sin embargo, las capacidades cognitivas se van recuperando a medida que el organismo se resincroniza al nuevo ciclo (Soshi et al., 2010). No obstante, estos efectos fueron más profundos en el grupo de ratas que no poseía MT endógena. En el análisis *trial por trial*, la desmejora luego del cambio abrupto en el esquema de luz/oscuridad solo se evidenció en las ratas PnX, y en particular sobre el parámetro que describe la finalización de la respuesta. Este parámetro por lo general no es fácil de afectar, siendo más estable que el índice “comienzo” (Balci, 2014). Se ha reportado que la adquisición de la finalización de la respuesta requiere la síntesis de proteínas *de novo* en el estriado dorsal, y que esta estructura controla el “valor” de la recompensa obtenida luego de un evento de estimación de tiempo (Macdonald et al., 2012). Por consiguiente, el cambio abrupto del ciclo LO podría estar generando un desalineamiento en el procesamiento de la recompensa, lo que desemboca en una disminución de la precisión frente a la tarea de estimación temporal. Por otro lado, las ratas Sham no mostraron cambios en los parámetros del análisis *trial por trial*, sólo una desmejora transitoria en los índices S1 y S2 del análisis promedio. Esto sugiere que la presencia de la hormona endógena tiene un rol protector frente a la desincronización transitoria causada ante un cambio abrupto del esquema de luz/oscuridad.

Luego se demostró que el efecto de la MT es horario-específico, ya que su administración nocturna no influye en la *performance* de las ratas PnX cuando la tarea de estimación se realiza durante el día (Figuras 3.17 y 3.18). Esto sugiere que la hormona sólo es capaz de modular la estimación de tiempo durante la noche, cuando el sistema es sensible a la misma (Pevet y Challet, 2011).

Por último, se demostró que la remoción quirúrgica de la glándula pineal, y por consiguiente la depleción de melatonina, ocasiona un incremento en los niveles de dopamina estriatal (Figura 3.19). Este efecto es revertido mediante la administración exógena de la hormona. El resultado encontrado es consistente con trabajos previos en los que se demostró una correlación negativa entre la MT y los niveles de DA en tejidos como la retina y en áreas cerebrales como el hipocampo y el área preóptica (Zisapel et al., 1982, Doyle et al., 2002). Sin embargo, la administración de MT en ratas Sham no tuvo efecto alguno sobre los niveles del neurotransmisor en el estriado. Esto también puede ser explicado mediante la variación en la sensibilidad del sistema a la hormona exógena dependiendo de la hora del día y si la hormona

endógena está presente en ese momento o no (Pevet y Challet, 2011).

La utilización de dos tipos de análisis distintos para los datos derivados del *test* de estimación de intervalos cortos de tiempo utilizado en esta tesis (esto es, análisis de los datos promedio y análisis de los datos *trial* por *trial*) se debe a que ambos tipos de análisis brindan información complementaria sobre el fenómeno estudiado. El análisis de datos promedio, que da como resultado el ajuste a una curva de tipo Gaussiana de la tasa de respuesta normalizada, da una idea general de la exactitud y la precisión de la estimación del intervalo en un grupo de individuos. Muestra de manera clara si hay o no un aumento de la respuesta cerca del intervalo, es decir, si todos los individuos aprendieron a estimar el intervalo. Por otro lado, este tipo de análisis suele enmascarar los resultados individuales de parámetros como el comienzo y el final de la respuesta. Para describir mejor esos parámetros se utilizó el método de análisis *trial* por *trial*, ya que el mismo aporta datos claros sobre el tiempo en que cada individuo aumenta o cesa su respuesta, y de esa manera permite ver más claramente cuando hay corrimientos en la ubicación del pico para cada individuo (Balci, 2014).

Todos juntos, los resultados de este capítulo refuerzan la idea de que la MT modula negativamente los niveles de DA en el estriado, ocasionando que las ratas que no poseen la hormona endógena adquieran altos niveles de DA estriatal. Esto, a su vez ocasionaría que, frente a un *test* de estimación temporal, estos animales tengan un comienzo de respuesta temprano y un corrimiento del pico de respuesta hacia la izquierda (subestimación del intervalo), rasgo bien caracterizado en modelos hiperdopaminérgicos (Balci et al., 2010, Balci, 2014, Agostinoy Cheng, 2016).

Discusión general y Conclusiones

Esta tesis, dividida en tres grandes capítulos, tuvo como objetivo principal entender la relación entre los sistemas circadiano y de estimación de intervalos cortos de tiempo, estudiando tanto las bases moleculares de la interacción como la salida comportamental de la misma.

En el primer capítulo, se demostró que el sistema circadiano ejerce un control sobre la estimación de intervalos cortos de tiempo, y que las condiciones bien caracterizadas que modifican parámetros de los ritmos circadianos o desafían al reloj también modifican de alguna manera la percepción del tiempo.

El segundo capítulo se propuso ahondar en el conocimiento del rol que cumple el sistema dopaminérgico en la conexión entre el sistema circadiano y el de estimación de intervalos cortos de tiempo, siendo la dopamina un neurotransmisor fundamental para la estimación temporal, y estando a la vez regulada por elementos del sistema circadiano. Se encontró que la administración de dopamina puede subsanar en parte el efecto deletéreo de la arritmicidad circadiana producida por exposición a luz constante sobre la estimación de intervalos cortos de tiempo. Además, se encontró que tanto los niveles de DA en el estriado, como TH (la enzima limitante de la síntesis de DA), DOPAC (metabolito de DA) y el mRNA y proteína del receptor de dopamina D2 presentan ritmos diarios en estriado dorsal, y que estos ritmos no son evidenciables en condiciones de luz constante. Es decir, que todos estos elementos de la señalización dopaminérgica están regulados por el reloj circadiano, y que cuando éste es disfuncional, el patrón de los mismos se modifica (tornándose los niveles de los mismos constantes a lo largo del día). Además, la proteína reloj PER2, un posible modulador circadiano de la expresión de estos elementos dopaminérgicos, no sólo se expresa en estriado y SN sino que presenta un ritmo diario en estas regiones, que desaparece en condiciones de LL. Esto nos permite decir que la señalización dopaminérgica es un eslabón clave en la comunicación entre los sistemas circadiano y de estimación de intervalos cortos de tiempo. Y, como era de esperar, la modulación circadiana a través de las vías dopaminérgicas se da mediante el control de la expresión de los elementos que participan en el metabolismo de este neurotransmisor. Además, la dopamina controla la estimación de tiempo de dos formas posibles: 1) modulando la velocidad del reloj de *interval timing*, o 2) ejerciendo un efecto motivacional en los individuos capaz de modificar la estimación.

Por último, en el tercer capítulo, se propuso otro posible modulador de la interacción entre el sistema circadiano y el de intervalos cortos de tiempo: la hormona melatonina. En este capítulo se demostró que la falta de la hormona en ratas provoca una desmejora en la estimación de intervalos de tiempo que se compensa con el correr de las sesiones. Además, pudo verse que la administración de la hormona mejora la estimación temporal únicamente cuando los animales

son entrenados y testeados de noche. Por otro lado, corroboramos que la relación antagónica que poseen la MT y la DA, que ya era conocida en otros tejidos, se extiende al estriado dorsal. En esta región, la falta de MT por remoción de la glándula pineal causa un aumento de los niveles de DA que puede revertirse con la administración de MT exógena. Estos resultados muestran que si bien el efecto de la falta de la hormona es sutil, ésta actúa como un mensajero circadiano y modifica la estimación de intervalos cortos de tiempo. La sutileza del efecto de la falta de MT se lo puede adjudicar a la redundancia del sistema circadiano en cuanto a sus mensajeros de salida, que pueden solaparse entre sí y compensar la falta de alguno de ellos.

En la Figura 12 se muestra un modelo propuesto de interacción entre los dos sistemas estudiados. En este modelo se puede observar que la liberación de melatonina por parte de la glándula pineal es rítmica y está regulada por los NSQ del hipotálamo, sede del reloj central circadiano. La conexión entre los NSQ y la glándula pineal se da de forma multisináptica (Guadarrama-Ortiz et al., 2014). A su vez, la MT, como mensajero endócrino, podría estar actuando sobre los receptores MT1 y MT2 ubicados en el estriado y en SNPC (Lacoste et al., 2015).

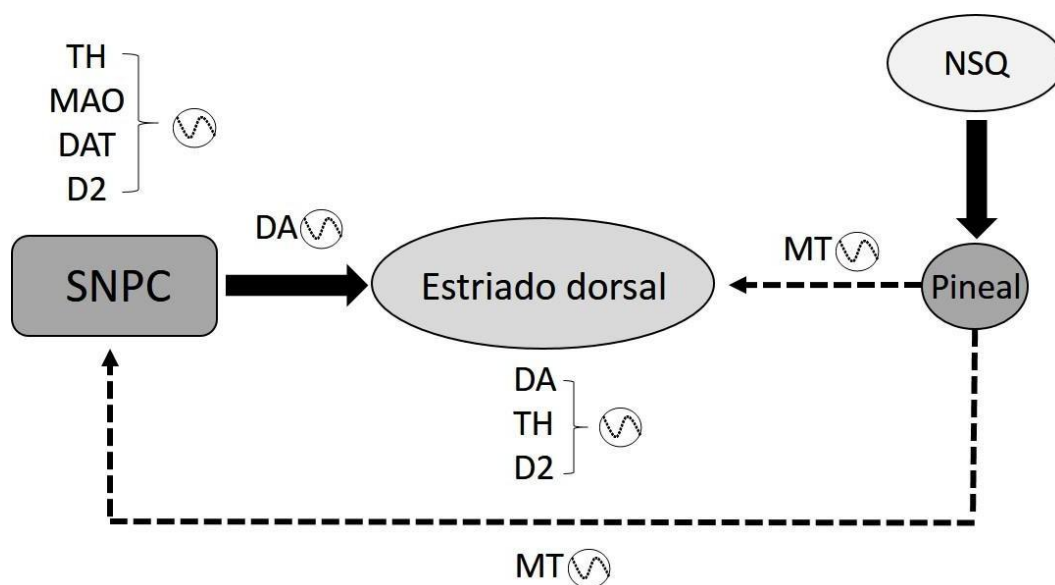


Figura 12. Modelo propuesto de interacción entre el sistema circadiano y de estimación de intervalos cortos de tiempo mediada por DA y MT. Las flechas continuas indican conexiones conocidas, mientras que las discontinuas indican conexiones hipotéticas deducidas a partir del trabajo realizado en esta tesis.

La MT actuaría poniendo en fase la expresión de las proteínas reloj en estas estructuras, las cuales a su vez actúan como factores de transcripción promoviendo la expresión de elementos dopaminérgicos susceptibles a modulación circadiana. Algunos de estos

elementos son: TH, MAO, DAT y D2 (autorreceptor) en SNPC; así como TH y D2 en el estriado. A su vez, la modulación circadiana sobre estos elementos conduciría al ritmo diario en los niveles de DA estriatales. Estos fenómenos regulatorios sobre la señalización dopaminérgica impactan directamente sobre la estimación de intervalos cortos de tiempo, que depende de los niveles de DA en estructuras como la SNPC y el estriado dorsal.

Queda pendiente el estudio molecular de la cinética de unión de factores de transcripción circadianos a elementos dopaminérgicos, a fin de realizar una evaluación más profunda del control que ejerce este sistema sobre la señalización dopaminérgica. A su vez, resta hacer foco en el estudio de otros neurotransmisores involucrados en la estimación de intervalos cortos de tiempo, como por ejemplo, el glutamato, señal que lleva la información desde las neuronas oscilatorias de la corteza prefrontal hacia el estriado. Este tipo de estudios ampliarán el campo de conocimiento de la regulación circadiana sobre este comportamiento y permitirá una visión más integral de la misma. Por otra parte, este trabajo aportó evidencias al hecho de que la DA es un modulador muy importante de la estimación de intervalos cortos de tiempo, y que el funcionamiento del sistema dopaminérgico (con niveles de DA dentro de un rango óptimo) asegura una estimación precisa y exacta del intervalo dado. El hecho de que los niveles óptimos de DA correlacionen con la correcta estimación de tiempo y que a su vez, el corrimiento de las curvas de respuesta en el protocolo de estimación se manifiesten en distintos desórdenes dopaminérgicos (tales como enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, y otros desordenes psiquiátricos), sugieren que este tipo de test cognitivo podría proponerse como una prueba para detectar de manera temprana este tipo de enfermedades, aún antes de que los síntomas avanzados relacionados al daño neuronal se expresen. El diagnóstico temprano de estas enfermedades ha permitido la aplicación adelantada de tratamientos que lograron aminorar el deterioro cognitivo (Svensson et al., 1995, Savitt et al., 2006, Paulsen, 2011).

Asimismo, esta tesis ha reforzado la idea del control circadiano sobre elementos de la transmisión dopaminérgica. Este también es un punto importante en las enfermedades que tienen su base en la disfunción dopaminérgica, ya que se sabe que en muchos casos los pacientes presentan trastornos en sus ritmos de actividad/reposo y en sus patrones de sueño (Boivin, 2000, Morton et al., 2005, Wulff et al., 2010). Esto no solo afecta la calidad de vida del paciente, sino que además podrían estar empeorando el funcionamiento del sistema dopaminérgico, desregulando los patrones de expresión de elementos asociados a la transmisión (Sleipness et al., 2007, Ikeda et al., 2013, Chung et al., 2014). A su vez, los trastornos circadianos en pacientes de este tipo podrían ser estudiados como trastornos comórbidos a las enfermedades y no como una consecuencia de la enfermedad misma. De esta manera, la regulación de los ritmos circadianos en este tipo de pacientes, no solo mejoraría su calidad de vida sino que podría tener un impacto positivo sobre los síntomas cognitivos y motores de los mismos (Wulff et al., 2010).

Por otro lado, la regulación circadiana de elementos dopaminérgicos sugiere que este

sistema podría estar relacionado con la adicción a drogas de abuso (McClung, 2007). Además, es sabido que los adictos a drogas de abuso por lo general presentan trastornos asociados a la disrupción de los ritmos circadianos, tales como patrones de actividad/reposo alterados, hábitos alimenticios desordenados y ritmos anormales en temperatura corporal, niveles hormonales y presión sanguínea [(revisado en Falcón y McClung (2009)]. A su vez, personas con trastornos de sueño e insomnio son más propensas a las adicciones (Shibley et al., 2008). Por otro lado, algunos trabajos han demostrado que existen variaciones diarias en la sensibilidad a distintas drogas de abuso como el alcohol, la cocaína y las anfetaminas (Van Reen et al., 2013, Doyle et al., 2015, Stowie et al., 2015). Esta influencia del sistema circadiano sobre la propensión a las drogas de abuso está íntimamente relacionado con la regulación del comportamiento de búsqueda de una recompensa (Webb et al., 2015). Es por eso que los resultados de esta tesis pueden ser tomados como base para la investigación en el campo de drogas de abuso, utilizando al protocolo de intervalos cortos de tiempo como un *test* cognitivo integral que involucra elementos de motivación, es además dependiente de la función dopaminérgica y a su vez se encuentra regulado por el sistema circadiano.

Esta tesis se considera un primer paso hacia el camino del conocimiento de la relación entre el sistema circadiano y el de estimación de intervalos cortos de tiempo, y se espera que sirva como base para la investigación aplicada a problemas concretos de la salud, en particular aquellos relacionados con trastornos dopaminérgicos.

Los resultados del presente trabajo de tesis se encuentran en los siguientes trabajos y revisiones publicadas:

2011- AGOSTINO, P.V., DO NASCIMENTO, M, BUSSI, I.L. AND GOLOMBEK, D.A. **Circadian Modulation of Interval Timing in Mice.** Brain Research 1370: 154-163.

2014- GOLOMBEK, D.A., BUSSI, I.L., AND AGOSTINO, P.V.
Minutes, days and years: molecular interactions among different scales of biological timing. Philosophical Transactions Royal Society of London B Biological Sciences 369(1637):20120465.

2014- BUSSI, I.L., LEVIN, G., GOLOMBEK, D.A. AND AGOSTINO, P.V.
Involvement of Dopamine Signaling in the Circadian Modulation of Interval Timing. European Journal of Neuroscience 40(1):2299-310.

2015- BUSSI, I.L., LEVIN, G., GOLOMBEK, D.A. AND AGOSTINO, P.V.
Melatonin modulates interval timing in rats: effect of pinealectomy. *International Journal of Comparative Psychology*, 28.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer al Estado Nacional, que mediante sus políticas inclusivas permitió que esta joven hija y nieto de la familia se convirtiera en la primera profesional de la familia y ahora en una flamante doctora.

Luego quiero agradecer a mi familia, que con sus aciertos y desaciertos me apoyaron siempre en el camino que elegí. A mi abuela, un ser de luz que siempre creyó en mí ciegamente, mi ejemplo de mujer a seguir.

A mis amigas hermanas de la vida, que siempre estuvieron y estarán ahí, en la casa de al lado o en una charla de Skype para aguantar mis desbordes emocionales.

A Juan, mi amigo del alma que desde el curso de ingreso compartimos día tras día en la carrera y el doctorado.

A mis compañeros de laboratorio (escriba su nombre aquí) que hacen del trabajo diario un carnaval de anécdotas, agradezco haberlos conocido y haberlos tenido al lado en cada paso de este doctorado porque de cada uno aprendí algo.

A mis directores, Pato y Diego, que supieron tenerme la paciencia infinita y jamás dejaron de creer en mí (si lo hicieron, no me di cuenta).

A mi amor, que con la paciencia y la calma que lo caracterizan me ayudó a afrontar las crisis doctorales y seguirá acompañándome sin soltarme la mano en las futuras crisis postdoctorales.

Bibliografía

- Abilio, V. C., J. A. Vera, Jr., L. S. Ferreira, C. R. Duarte, C. R. Martins, D. Torres-Leite, A. Ribeiro Rde and R. Frussa-Filho (2003). "Effects of melatonin on behavioral dopaminergic supersensitivity." Life Sci **72**(26): 3003-3015.
- Abraham, U., M. Saleh and A. Kramer (2013). "Odor is a time cue for circadian behavior." J Biol Rhythms **28**(1): 26-37.
- Agostino, P. V. and R. K. Cheng (2016). "Contributions of dopaminergic signaling to timing accuracy and precision." Current Opinion in Behavioral Sciences **In Press**.
- Aguilar-Roblero, R. (2015). Introduction to Circadian Rhythms, Clocks, and Its Genes. Mechanisms of Circadian Systems in Animals and Their Clinical Relevance, Springer: 1- 12.
- Aguilar-Roblero, R. and A. Vega-Gonzalez (1993). "Splitting of locomotor circadian rhythmicity in hamsters is facilitated by pinealectomy." Brain Res **605**(2): 229-236.
- Arendt, J. and J. Broadway (1987). "Light and melatonin as zeitgebers in man." Chronobiol Int **4**(2): 273-282.
- Arnsten, A. F. and K. Rubia (2012). "Neurobiological circuits regulating attention, cognitive control, motivation, and emotion: disruptions in neurodevelopmental psychiatric disorders." Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry **51**(4): 356-367.
- Aron, A. R., S. Durston, D. M. Eagle, G. D. Logan, C. M. Stinear and V. Stuphorn (2007). "Converging evidence for a fronto-basal-ganglia network for inhibitory control of action and cognition." J Neurosci **27**(44): 11860-11864.
- Aschoff, J., S. Daan and K.-I. Honma (1982). Zeitgebers, entrainment, and masking: some unsettled questions, Springer.
- Backman, L., L. Nyberg, U. Lindenberger, S. C. Li and L. Farde (2006). "The correlative triad among aging, dopamine, and cognition: current status and future prospects." Neurosci Biobehav Rev **30**(6): 791-807.
- Balci, F. (2014). "Interval timing, dopamine, and motivation." Timing & Time Perception **2**(3): 379-410.
- Balci, F., E. A. Ludvig, R. Abner, X. Zhuang, P. Poon and D. Brunner (2010). "Motivational effects on interval timing in dopamine transporter (DAT) knockdown mice." Brain Res **1325**: 89-99.
- Balci, F., M. Wiener, B. Cavdaroglu and H. Branch Coslett (2013). "Epistasis effects of dopamine genes on interval timing and reward magnitude in humans." Neuropsychologia **51**(2): 293-308.
- Bauer, L. O. (2001). "Antisocial personality disorder and cocaine dependence: their

effects on behavioral and electroencephalographic measures of time estimation." Drug Alcohol Depend **63**(1): 87-95.

- Beaulieu, J.-M. and R. R. Gainetdinov (2011). "The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors." Pharmacological reviews **63**(1): 182-217.
- Beierholm, U., M. Guitart-Masip, M. Economides, R. Chowdhury, E. Duzel, R. Dolan and P. Dayan (2013). "Dopamine modulates reward-related vigor." Neuropsychopharmacology **38**(8): 1495-1503.
- Bell-Pedersen, D., V. M. Cassone, D. J. Earnest, S. S. Golden, P. E. Hardin, T. L. Thomas and M. J. Zoran (2005). "Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms." Nat Rev Genet **6**(7): 544-556.
- Bello, E. P., Y. Mateo, D. M. Gelman, D. Noain, J. H. Shin, M. J. Low, V. A. Alvarez, D. M. Lovinger and M. Rubinstein (2011). "Cocaine supersensitivity and enhanced motivation for reward in mice lacking dopamine D2 autoreceptors." Nat Neurosci **14**(8): 1033-1038.
- Binkofski, F. and R. A. Block (1996). "Accelerated time experience after left frontal cortex lesion." Neurocase **2**(6): 485-493.
- Blatter, K. and C. Cajochen (2007). "Circadian rhythms in cognitive performance: methodological constraints, protocols, theoretical underpinnings." Physiol Behav **90**(2- 3): 196-208.
- Bohnen, N., R. Koeppe, P. Meyer, E. Ficaró, K. Wernette, M. Kilbourn, D. Kuhl, K. Frey and R. Albin (2000). "Decreased striatal monoaminergic terminals in Huntington disease." Neurology **54**(9): 1753-1759.
- Boivin, D. B. (2000). "Influence of sleep-wake and circadian rhythm disturbances in psychiatric disorders." Journal of Psychiatry and Neuroscience **25**(5): 446.
- Borjigin, J., L. S. Zhang and A. A. Calinescu (2012). "Circadian Regulation of Pineal Gland Rhythmicity." Mol Cell Endocrinol **349**(1): 13-19.
- Breukelaar, J. W. and J. C. Dalrymple-Alford (1999). "Effects of lesions to the cerebellar vermis and hemispheres on timing and counting in rats." Behav Neurosci **113**(1): 78-90.
- Bromberg-Martin, E. S., M. Matsumoto, S. Hong and O. Hikosaka (2010). "A pallidus- habenula-dopamine pathway signals inferred stimulus values." J Neurophysiol **104**(2): 1068-1076.
- Bubenik, G. A. (2002). "Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance." Dig Dis Sci **47**(10): 2336-2348.

- Buetti, D., V. Walsh, C. Frith and G. Rees (2008). "Different brain circuits underlie motor and perceptual representations of temporal intervals." J Cogn Neurosci **20**(2): 204-214.
- Buhr, E. D. and J. S. Takahashi (2013). "Molecular components of the Mammalian circadian clock." Handb Exp Pharmacol(217): 3-27.
- Buhusi, C. V. and W. H. Meck (2005). "What makes us tick? Functional and neural mechanisms of interval timing." Nat Rev Neurosci **6**(10): 755-765.
- Buonomano, D. V. (2007). "The biology of time across different scales." Nat Chem Biol **3**(10): 594-597.
- Carneiro, B. T. S. and J. F. Araujo (2011). "Influence of scheduled restricted feeding on reentrainment of motor activity rhythm after a 6-h light-dark advance in rats." Psychology & Neuroscience **4**: 317-322.
- Carpentieri, A. R., M. A. Pujolras, J. J. Chiesa, A. D. Noguera and T. Cambras (2006). "Effect of melatonin and diazepam on the dissociated circadian rhythm in rats." J Pineal Res **40**(4): 318-325.
- Casiraghi, L. P., G. A. Oda, J. J. Chiesa, W. O. Friesen and D. A. Golombek (2012). "Forced desynchronization of activity rhythms in a model of chronic jet lag in mice." J Biol Rhythms **27**(1): 59-69.
- Cassone, V. M. and A. K. Natesan (1997). "Time and time again: the phylogeny of melatonin as a transducer of biological time." J Biol Rhythms **12**(6): 489-497.
- Castro, J. P., R. Frussa-Filho, D. F. Fukushima, C. C. Chinen, V. C. Abilio and R. H. Silva (2005). "Effects of long-term continuous exposure to light on memory and anxiety in mice." Physiol Behav **86**(1-2): 218-223.
- Claustrat, B., M. Geoffriau, J. Brun and G. Chazot (1995). "[Melatonin in humans: a biochemical marker of the circadian clock and an endogenous synchronizer]." Neurophysiol Clin **25**(6): 351-359.
- Comai, S., R. Ochoa-Sanchez, S. Dominguez-Lopez, F. R. Bambico and G. Gobbi (2015). "Melancholic-Like behaviors and circadian neurobiological abnormalities in melatonin MT1 receptor knockout mice." Int J Neuropsychopharmacol **18**(3).
- Cordes, S. and C. R. Gallistel (2008). "Intact interval timing in circadian CLOCK mutants." Brain Res **1227**: 120-127.
- Challet, E., I. Caldelas, C. Graff and P. Pevet (2003). "Synchronization of the molecular clockwork by light- and food-related cues in mammals." Biol Chem **384**(5): 711-719.
- Charnov, E. L. (1976). "Optimal foraging, the marginal value theorem." Theor Popul Biol
 - **9**(2): 129-136.

- Chatteraj, A., T. Liu, L. S. Zhang, Z. Huang and J. Borjigin (2009). "Melatonin formation in mammals: in vivo perspectives." Rev Endocr Metab Disord **10**(4): 237-243.
- Chaudhury, D. and C. S. Colwell (2002). "Circadian modulation of learning and memory in fear-conditioned mice." Behav Brain Res **133**(1): 95-108.
- Cheng, M. Y., C. M. Bullock, C. Li, A. G. Lee, J. C. Bermak, J. Belluzzi, D. R. Weaver, F. M. Leslie and Q. Y. Zhou (2002). "Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus." Nature **417**(6887): 405-410.
- Cheng, R. K. and W. H. Meck (2007). "Prenatal choline supplementation increases sensitivity to time by reducing non-scalar sources of variance in adult temporal processing." Brain Res **1186**: 242-254.
- Cho, K. (2001). "Chronic jet lag produces temporal lobe atrophy and spatial cognitive deficits." Nat Neurosci **4**(6): 567-568.
- Chung, S., E. J. Lee, S. Yun, H. K. Choe, S. B. Park, H. J. Son, K. S. Kim, D. E. Dluzen, I. Lee, O. Hwang, G. H. Son and K. Kim (2014). "Impact of circadian nuclear receptor REV- ERBalpha on midbrain dopamine production and mood regulation." Cell **157**(4): 858- 868.
- Church, R. M., W. H. Meck and J. Gibbon (1994). "Application of scalar timing theory to individual trials." J Exp Psychol Anim Behav Process **20**(2): 135-155.
- Daubner, S. C., T. Le and S. Wang (2011). "Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis." Arch Biochem Biophys **508**(1): 1-12.
- Davalos, D. B., D. C. Rojas and J. R. Tregellas (2011). "Temporal processing in schizophrenia: effects of task-difficulty on behavioral discrimination and neuronal responses." Schizophr Res **127**(1-3): 123-130.
- De Bundel, D., G. Gangarossa, A. Biever, X. Bonnefont and E. Valjent (2013). "Cognitive dysfunction, elevated anxiety, and reduced cocaine response in circadian clock-deficient cryptochrome knockout mice." Front Behav Neurosci **7**: 152.
- De Mei, C., M. Ramos, C. Litaka and E. Borrelli (2009). "Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors." Curr Opin Pharmacol **9**(1): 53-58.
- Dominguez-Lopez, S., R. D. Howell, M. G. Lopez-Canul, M. Leyton and G. Gobbi (2014). "Electrophysiological characterization of dopamine neuronal activity in the ventral tegmental area across the light-dark cycle." Synapse **68**(10): 454-467.
- Doyle, S. and M. Menaker (2007). "Circadian photoreception in vertebrates." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **72**: 499-508.

- Doyle, S. E., H. Feng, G. Garber, M. Menaker and W. J. Lynch (2015). "Effects of circadian disruption on methamphetamine consumption in methamphetamine-exposed rats." Psychopharmacology (Berl) **232**(12): 2169-2179.
- Doyle, S. E., M. S. Grace, W. McIlvor and M. Menaker (2002). "Circadian rhythms of dopamine in mouse retina: the role of melatonin." Vis Neurosci **19**(5): 593-601.
- Drew, M. R., S. Fairhurst, C. Malapani, J. C. Horvitz and P. D. Balsam (2003). "Effects of dopamine antagonists on the timing of two intervals." Pharmacol Biochem Behav **75**(1): 9-15.
- Drew, M. R., E. H. Simpson, C. Kellendonk, W. G. Herzberg, O. Lipatova, S. Fairhurst, E. R. Kandel, C. Malapani and P. D. Balsam (2007). "Transient overexpression of striatal D2 receptors impairs operant motivation and interval timing." J Neurosci **27**(29): 7731- 7739.
- Droit-Volet, S. and W. H. Meck (2007). "How emotions colour our perception of time." Trends Cogn Sci **11**(12): 504-513.
- Dubocovich, M. L. (1995). "Melatonin receptors: are there multiple subtypes?" Trends Pharmacol Sci **16**(2): 50-56.
- Dubocovich, M. L. and M. Markowska (2005). "Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals." Endocrine **27**(2): 101-110.
- Dubocovich, M. L., M. A. Rivera-Bermudez, M. J. Gerdin and M. I. Masana (2003). "Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors." Front Biosci **8**: d1093-1108.
- Dunlap, J. C. (1999). "Molecular bases for circadian clocks." Cell **96**(2): 271-290.
- Eckel-Mahan, K. and P. Sassone-Corsi (2013). "Metabolism and the circadian clock converge." Physiol Rev **93**(1): 107-135.
- Eckel-Mahan, K. L. and D. R. Storm (2009). "Circadian rhythms and memory: not so simple as cogs and gears." EMBO Rep **10**(6): 584-591.
- Edgar, D. M. and W. C. Dement (1991). "Regularly scheduled voluntary exercise synchronizes the mouse circadian clock." Am J Physiol **261**(4 Pt 2): R928-933.
- Falcón, E. and C. A. McClung (2009). "A role for the circadian genes in drug addiction." Neuropharmacology **56**: 91-96.
- Felipo, V., B. Piedrafita, J. A. Barios, A. Agustí, H. Ahabrach, M. Romero-Vives, L. C. Barrio, B. Rey, J. M. Gaztelu and M. Llansola (2015). "Rats with minimal hepatic encephalopathy show reduced cGMP-dependent protein kinase activity in hypothalamus correlating with circadian rhythms alterations." Chronobiol Int **32**(7): 966-979.

- Fernandez, F., D. Lu, P. Ha, P. Costacurta, R. Chavez, H. C. Heller and N. F. Ruby (2014). "Circadian rhythm. Dysrhythmia in the suprachiasmatic nucleus inhibits memory processing." Science **346**(6211): 854-857.
- Ferris, M. J., R. A. Espana, J. L. Locke, J. K. Konstantopoulos, J. H. Rose, R. Chen and S. R. Jones (2014). "Dopamine transporters govern diurnal variation in extracellular dopamine tone." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(26): E2751-2759.
- Fuller, P. M., J. J. Gooley and C. B. Saper (2006). "Neurobiology of the sleep-wake cycle: sleep architecture, circadian regulation, and regulatory feedback." J Biol Rhythms **21**(6): 482-493.
- Gallistel, C. R., A. King and R. McDonald (2004). "Sources of variability and systematic error in mouse timing behavior." J Exp Psychol Anim Behav Process **30**(1): 3-16.
- Gerfen, C. R. (2000). "Molecular effects of dopamine on striatal-projection pathways." Trends Neurosci **23**(10 Suppl): S64-70.
- Gerfen, C. R., T. M. Engber, L. C. Mahan, Z. Susel, T. N. Chase, F. J. Monsma, Jr. and D. R. Sibley (1990). "D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons." Science **250**(4986): 1429-1432.
- Gerstner, J. R. and J. C. Yin (2010). "Circadian rhythms and memory formation." Nat Rev Neurosci **11**(8): 577-588.
- Gibbon, J. (1977). "Scalar expectancy theory and Weber's law in animal timing." Psychological review **84**(3): 279.
- Gibson, E. M., C. Wang, S. Tjho, N. Khattar and L. J. Kriegsfeld (2010). "Experimental 'jet lag' inhibits adult neurogenesis and produces long-term cognitive deficits in female hamsters." PLoS One **5**(12): e15267.
- Giros, B., P. Sokoloff, M. P. Martres, J. F. Riou, L. J. Emorine and J. C. Schwartz (1989). "Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms." Nature **342**(6252): 923-926.
- Golombek, D. A., P. Pevet and D. P. Cardinali (1996). "Melatonin effects on behavior: possible mediation by the central GABAergic system." Neurosci Biobehav Rev **20**(3): 403-412.
- Golombek, D. A. and R. E. Rosenstein (2010). "Physiology of circadian entrainment." Physiol Rev **90**(3): 1063-1102.
- Gooch, C. M., M. Wiener, E. B. Wencil and H. B. Coslett (2010). "Interval timing disruptions in subjects with cerebellar lesions." Neuropsychologia **48**(4): 1022-1031.

- Graybiel, A. M., T. Aosaki, A. W. Flaherty and M. Kimura (1994). "The basal ganglia and adaptive motor control." Science **265**(5180): 1826-1831.
- Gritton, H. J., A. Kantorowski, M. Sarter and T. M. Lee (2012). "Bidirectional interactions between circadian entrainment and cognitive performance." Learn Mem **19**(3): 126- 141.
- Gritton, H. J., B. C. Sutton, V. Martinez, M. Sarter and T. M. Lee (2009). "Interactions between cognition and circadian rhythms: attentional demands modify circadian entrainment." Behav Neurosci **123**(5): 937-948.
- Grondin, S. (2012). "Violation of the scalar property for time perception between 1 and 2 seconds: evidence from interval discrimination, reproduction, and categorization." J Exp Psychol Hum Percept Perform **38**(4): 880-890.
- Guadarrama-Ortiz, P., R. Ramírez-Aguilar, A. Madrid-Sánchez, C. Castillo-Rangel, D. Carrasco-Alcántara and R. Aguilar-Roblero (2014). "Controladores del tiempo y el envejecimiento: núcleo Supraquiasmático y glándula pineal." International Journal of Morphology **32**(2): 409-414.
- Hamid, A. A., J. R. Pettibone, O. S. Mabrouk, V. L. Hetrick, R. Schmidt, C. M. Vander Weele, R. T. Kennedy, B. J. Aragona and J. D. Berke (2016). "Mesolimbic dopamine signals the value of work." Nat Neurosci **19**(1): 117-126.
- Hampp, G., J. A. Ripperger, T. Houben, I. Schmutz, C. Blex, S. Perreau-Lenz, I. Brunk, R. Spanagel, G. Ahnert-Hilger and J. H. Meijer (2008). "Regulation of monoamine oxidase A by circadian-clock components implies clock influence on mood." Current Biology **18**(9): 678-683.
- Harb, M. R., N. Sousa, J. Zihl and O. F. Almeida (2014). "Reward components of feeding behavior are preserved during mouse aging." Frontiers in aging neuroscience **6**.
- Hardeland, R. (2010). "Melatonin metabolism in the central nervous system." Curr Neuroparmacol **8**(3): 168-181.
- Hardeland, R. and S. R. Pandi-Perumal (2005). "Melatonin, a potent agent in antioxidative defense: actions as a natural food constituent, gastrointestinal factor, drug and prodrug." Nutr Metab (Lond) **2**: 22.
- Harrington, D. L., G. N. Castillo, P. A. Greenberg, D. D. Song, S. Lessig, R. R. Lee and S. M. Rao (2011). "Neurobehavioral mechanisms of temporal processing deficits in Parkinson's disease." PLoS One **6**(2): e17461.

- Harrington, D. L. and K. Y. Haaland (1999). "Neural Underpinnings of Temporal Processing: A Review of Focal Lesion, Pharmacological, and Functional Imaging Research." Reviews in the Neurosciences **10**(2): 91-116.
- Harrington, D. L., K. Y. Haaland and R. T. Knight (1998). "Cortical networks underlying mechanisms of time perception." J Neurosci **18**(3): 1085-1095.
- Harrington, D. L., R. R. Lee, L. A. Boyd, S. Z. Rapcsak and R. T. Knight (2004). "Does the representation of time depend on the cerebellum? Effect of cerebellar stroke." Brain **127**(Pt 3): 561-574.
- Hastings, M., J. S. O'Neill and E. S. Maywood (2007). "Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms." J Endocrinol **195**(2): 187-198.
- Henley, S. M., L. E. Downey, J. M. Nicholas, K. M. Kinnunen, H. L. Golden, A. Buckley, C. J. Mahoney and S. J. Crutch (2014). "Degradation of cognitive timing mechanisms in behavioural variant frontotemporal dementia." Neuropsychologia **65**: 88-101.
- Hinton, S. C. and W. H. Meck (1996). "Increasing the speed of an internal clock: the effects of nicotine on interval timing." Drug development research **38**(3-4): 204-211.
- Hinton, S. C. and W. H. Meck (1997). "How Time Flies: Functional and Neural Mechanisms of Interval." Time and behaviour: Psychological and neurobehavioural analyses **120**: 409.
- Hinton, S. C. and W. H. Meck (2004). "Frontal-striatal circuitry activated by human peak- interval timing in the supra-seconds range." Brain Res Cogn Brain Res **21**(2): 171-182.
- Hoffman, R. A. and R. J. Reiter (1965). "Rapid pinealectomy in hamsters and other small rodents." Anat Rec **153**(1): 19-21.
- Hood, S., P. Cassidy, M. P. Cossette, Y. Weigl, M. Verwey, B. Robinson, J. Stewart and S. Amir (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." J Neurosci **30**(42): 14046-14058.
- Howes, O. D., J. Kambeitz, E. Kim, D. Stahl, M. Slifstein, A. Abi-Dargham and S. Kapur (2012). "The nature of dopamine dysfunction in schizophrenia and what this means for treatment: meta-analysis of imaging studies." Archives of general psychiatry **69**(8): 776- 786.
- Huether, G. (1993). "The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates." Experientia **49**(8): 665-670.

- Ikeda, E., N. Matsunaga, K. Kakimoto, K. Hamamura, A. Hayashi, S. Koyanagi and S. Ohdo (2013). "Molecular mechanism regulating 24-hour rhythm of dopamine D3 receptor expression in mouse ventral striatum." Mol Pharmacol **83**(5): 959-967.
- Imbesi, M., S. Yildiz, A. Dirim Arslan, R. Sharma, H. Manev and T. Uz (2009). "Dopamine receptor-mediated regulation of neuronal "clock" gene expression." Neuroscience **158**(2): 537-544.
- Ivry, R. B. and R. M. Spencer (2004). "The neural representation of time." Current opinion in neurobiology **14**(2): 225-232.
- Kalsbeek, A., I. F. Palm, S. E. La Fleur, F. A. Scheer, S. Perreau-Lenz, M. Ruiter, F. Kreier, C. Cailotto and R. M. Buijs (2006). "SCN outputs and the hypothalamic balance of life." J Biol Rhythms **21**(6): 458-469.
- Kawagoe, R., Y. Takikawa and O. Hikosaka (1998). "Expectation of reward modulates cognitive signals in the basal ganglia." Nat Neurosci **1**(5): 411-416.
- Kawaguchi, Y., T. Aosaki and Y. Kubota (1997). "Cholinergic and GABAergic interneurons in the striatum." Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi **17**(2): 87-90.
- Kawarai, T., H. Kawakami, Y. Yamamura and S. Nakamura (1997). "Structure and organization of the gene encoding human dopamine transporter." Gene **195**(1): 11-18.
- Khaldy, H., J. Leon, G. Escames, L. Bikjdaouene, J. J. Garcia and D. Acuna-Castroviejo (2002). "Circadian rhythms of dopamine and dihydroxyphenyl acetic acid in the mouse striatum: effects of pinealectomy and of melatonin treatment." Neuroendocrinology **75**(3): 201-208.
- Kiessling, S., G. Eichele and H. Oster (2010). "Adrenal glucocorticoids have a key role in circadian resynchronization in a mouse model of jet lag." J Clin Invest **120**(7): 2600-2609.
- Kim, J., J.-W. Ghim, J. H. Lee and M. W. Jung (2013). "Neural correlates of interval timing in rodent prefrontal cortex." The Journal of Neuroscience **33**(34): 13834-13847.
- Klein, D. C. and R. Y. Moore (1979). "Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-O- methyltransferase: control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus." Brain Res **174**(2): 245-262.
- Koch, G., M. Oliveri, S. Torriero, S. Salerno, E. Lo Gerfo and C. Caltagirone (2007). "Repetitive TMS of cerebellum interferes with millisecond time processing." Exp Brain Res **179**(2): 291-299.
- Konturek, S. J., P. C. Konturek, T. Brzozowski and G. A. Bubenik (2007). "Role of melatonin in upper gastrointestinal tract." J Physiol Pharmacol **58 Suppl 6**: 23-52.

- Kott, J., G. Leach and L. Yan (2012). "Direction-dependent effects of chronic "jet-lag" on hippocampal neurogenesis." Neurosci Lett **515**(2): 177-180.
- Kozaki, T., A. Kubokawa, R. Taketomi and K. Hatae (2016). "Light-induced melatonin suppression at night after exposure to different wavelength composition of morning light." Neurosci Lett **616**: 1-4.
- Kramer, A., F. C. Yang, P. Snodgrass, X. Li, T. E. Scammell, F. C. Davis and C. J. Weitz (2001). "Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling." Science **294**(5551): 2511-2515.
- Kraves, S. and C. J. Weitz (2006). "A role for cardiotrophin-like cytokine in the circadian control of mammalian locomotor activity." Nat Neurosci **9**(2): 212-219.
- Kuriyama, K., M. Uchiyama, H. Suzuki, H. Tagaya, A. Ozaki, S. Aritake, K. Shibui, T. Xin, L. Lan, Y. Kamei and K. Takahashi (2005). "Diurnal fluctuation of time perception under 30- h sustained wakefulness." Neurosci Res **53**(2): 123-128.
- Kyriacou, C. P. and J. C. Hall (1980). "Circadian rhythm mutations in *Drosophila melanogaster* affect short-term fluctuations in the male's courtship song." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(11): 6729-6733.
- Kyriacou, C. P. and M. H. Hastings (2010). "Circadian clocks: genes, sleep, and cognition." Trends Cogn Sci **14**(6): 259-267.
- Lacoste, B., D. Angeloni, S. Dominguez-Lopez, S. Calderoni, A. Mauro, F. Fraschini, L. Descarries and G. Gobbi (2015). "Anatomical and cellular localization of melatonin MT1 and MT2 receptors in the adult rat brain." J Pineal Res **58**(4): 397-417.
- Lewis, P. A., R. C. Miall, S. Daan and A. Kacelnik (2003). "Interval timing in mice does not rely upon the circadian pacemaker." Neurosci Lett **348**(3): 131-134.
- Li, S. X., L. J. Liu, W. G. Jiang and L. Lu (2009). "Morphine withdrawal produces circadian rhythm alterations of clock genes in mesolimbic brain areas and peripheral blood mononuclear cells in rats." J Neurochem **109**(6): 1668-1679.
- Lindgren, N., M. Goiny, M. Herrera-Marschitz, J. W. Haycock, T. Hökfelt and G. Fisone (2002). "Activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 by depolarization stimulates tyrosine hydroxylase phosphorylation and dopamine synthesis in rat brain." European Journal of Neuroscience **15**(4): 769-773.
- Lotharius, J. and P. Brundin (2002). "Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -synuclein." Nature Reviews Neuroscience **3**(12): 932-942.
- Lustig, C., M. S. Matell and W. H. Meck (2005). "Not "just" a coincidence: frontal-striatal interactions in working memory and interval timing." Memory **13**(3-4): 441-448.

- Macchi, M. M. and J. N. Bruce (2004). "Human pineal physiology and functional significance of melatonin." Front Neuroendocrinol **25**(3-4): 177-195.
- Macdonald, C. J., R. K. Cheng and W. H. Meck (2012). "Acquisition of "Start" and "Stop" response thresholds in peak-interval timing is differentially sensitive to protein synthesis inhibition in the dorsal and ventral striatum." Front Integr Neurosci **6**: 10.
- Marquardt, D. W. (1963). "An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters." Journal of the society for Industrial and Applied Mathematics **11**(2): 431- 441.
- Matell, M. S., M. Bateson and W. H. Meck (2006). "Single-trials analyses demonstrate that increases in clock speed contribute to the methamphetamine-induced horizontal shifts in peak-interval timing functions." Psychopharmacology (Berl) **188**(2): 201-212.
- Matell, M. S., G. R. King and W. H. Meck (2004). "Differential modulation of clock speed by the administration of intermittent versus continuous cocaine." Behav Neurosci **118**(1): 150-156.
- Matell, M. S. and W. H. Meck (2000). "Neuropsychological mechanisms of interval timing behavior." Bioessays **22**(1): 94-103.
- Matell, M. S. and W. H. Meck (2004). "Cortico-striatal circuits and interval timing: coincidence detection of oscillatory processes." Brain Res Cogn Brain Res **21**(2): 139- 170.
- McClung, C. A. (2007). "Circadian rhythms, the mesolimbic dopaminergic circuit, and drug addiction." The Scientific World Journal **7**: 194-202.
- McGrath, M. J., K. M. Campbell, M. B. Veldman and F. H. Burton (1999). "Anxiety in a transgenic mouse model of cortical-limbic neuro-potentiated compulsive behavior." Behav Pharmacol **10**(5): 435-443.
- McGuire, J. T. and J. W. Kable (2012). "Decision makers calibrate behavioral persistence on the basis of time-interval experience." Cognition **124**(2): 216-226.
- Meck, W. H. (1996). "Neuropharmacology of timing and time perception." Brain Res Cogn Brain Res **3**(3-4): 227-242.
- Meck, W. H. (2006). "Neuroanatomical localization of an internal clock: a functional link between mesolimbic, nigrostriatal, and mesocortical dopaminergic systems." Brain Res **1109**(1): 93-107.
- Meck, W. H. and A. M. Benson (2002). "Dissecting the brain's internal clock: how frontal- striatal circuitry keeps time and shifts attention." Brain Cogn **48**(1): 195-211.

- Meck, W. H., R. K. Cheng, C. J. MacDonald, R. R. Gainetdinov, M. G. Caron and M. O. Cevik (2012). "Gene-dose dependent effects of methamphetamine on interval timing in dopamine-transporter knockout mice." Neuropharmacology **62**(3): 1221-1229.
- Meiser, J., D. Weindl and K. Hiller (2013). "Complexity of dopamine metabolism." Cell Commun Signal **11**(1): 34.
- Mendoza, J. (2007). "Circadian clocks: setting time by food." J Neuroendocrinol **19**(2): 127-137.
- Meng, T., S. Yuan, Z. Zheng, T. Liu and L. Lin (2015). "Effects of endogenous melatonin on glutamate and GABA rhythms in the striatum of unilateral 6-hydroxydopamine-lesioned rats." Neuroscience **286**: 308-315.
- Miall, C. (1989). "The storage of time intervals using oscillating neurons." Neural Computation **1**(3): 359-371.
- Middleton, F. A. and P. L. Strick (2000). "Basal ganglia output and cognition: evidence from anatomical, behavioral, and clinical studies." Brain Cogn **42**(2): 183-200.
- Missale, C., S. R. Nash, S. W. Robinson, M. Jaber and M. G. Caron (1998). "Dopamine receptors: from structure to function." Physiol Rev **78**(1): 189-225.
- Mistlberger, R. E. and D. J. Skene (2004). "Social influences on mammalian circadian rhythms: animal and human studies." Biol Rev Camb Philos Soc **79**(3): 533-556.
- Miyazaki, K., T. Nagase, M. Mesaki, J. Narukawa, O. Ohara and N. Ishida (2004). "Phosphorylation of clock protein PER1 regulates its circadian degradation in normal human fibroblasts." Biochem J **380**(Pt 1): 95-103.
- Monnet, F. P. (2002). "Melatonin modulates [3h]serotonin release in the rat hippocampus: effects of circadian rhythm." J Neuroendocrinol **14**(3): 194-199.
- Monsma, F. J., Jr., L. D. McVittie, C. R. Gerfen, L. C. Mahan and D. R. Sibley (1989). "Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing." Nature **342**(6252): 926-929.
- 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.
- Moreno, M. C., H. J. Marcos, J. Oscar Croxatto, P. H. Sande, J. Campanelli, C. O. Jaliffa, J. Benozzi and R. E. Rosenstein (2005). "A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injections of hyaluronic acid." Exp Eye Res **81**(1): 71-80.
- Morgan, D., K. A. Grant, H. D. Gage, R. H. Mach, J. R. Kaplan, O. Prioleau, S. H. Nader, N. Buchheimer, R. L. Ehrenkaufer and M. A. Nader (2002). "Social

dominance in monkeys: dopamine D2 receptors and cocaine self-administration." Nat Neurosci **5**(2): 169-174.

- 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.
- Morofushi, M., K. Shinohara and F. Kimura (2001). "Menstrual and circadian variations in time perception in healthy women and women with premenstrual syndrome." Neurosci Res **41**(4): 339-344.
- Morton, A. J., N. I. Wood, M. H. Hastings, C. Hurelbrink, R. A. Barker and E. S. Maywood (2005). "Disintegration of the sleep-wake cycle and circadian timing in Huntington's disease." The Journal of Neuroscience **25**(1): 157-163.
- Munoz, E., M. Brewer and R. Baler (2002). "Circadian Transcription. Thinking outside the E-Box." J Biol Chem **277**(39): 36009-36017.
- Natsubori, A., K. Honma and S. Honma (2014). "Dual regulation of clock gene Per2 expression in discrete brain areas by the circadian pacemaker and methamphetamine- induced oscillator in rats." Eur J Neurosci **39**(2): 229-240.
- Nenchovska, Z., L. Kortenska, M. Stefanova, L. Alova, M. Atanasova and J. Tchekalarova (2014). "EFFECTS OF PINEALECTOMY ON ANXIETY AND DEPRESSIVE-LIKE BEHAVIOUR IN WISTAR RATS." Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences **67**(12).
- O'Neill, J. S. and A. B. Reddy (2011). "Circadian clocks in human red blood cells." Nature **469**(7331): 498-503.
- O'Neill, J. S., G. van Ooijen, L. E. Dixon, C. Troein, F. Corellou, F. Y. Bouget, A. B. Reddy and A. J. Millar (2011). "Circadian rhythms persist without transcription in a eukaryote." Nature **469**(7331): 554-558.
- Okamura, H., S. Yamaguchi and K. Yagita (2002). "Molecular machinery of the circadian clock in mammals." Cell Tissue Res **309**(1): 47-56.
- Papachristos, E. B., E. H. Jacobs and Y. Elgersma (2011). "Interval timing is intact in arrhythmic Cry1/Cry2-deficient mice." J Biol Rhythms **26**(4): 305-313.
- Parker, K. L. (2015). "Timing Tasks Synchronize Cerebellar and Frontal Ramping Activity and Theta Oscillations: Implications for Cerebellar Stimulation in Diseases of Impaired Cognition." Front Psychiatry **6**: 190.
- Parker, K. L., K. H. Chen, J. R. Kingyon, J. F. Cavanagh and N. S. Narayanan (2014). "D1- dependent 4 Hz oscillations and ramping activity in rodent medial frontal cortex during interval timing." J Neurosci **34**(50): 16774-16783.

- Pati, A. and S. Gupta (1994). "Time estimation circadian rhythm in shift workers and diurnally active humans." Journal of Biosciences **19**(3): 325-330.
- Paulsen, J. S. (2011). "Cognitive impairment in Huntington disease: diagnosis and treatment." Current neurology and neuroscience reports **11**(5): 474-483.
- Pellow, S. and S. E. File (1986). "Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat." Pharmacol Biochem Behav **24**(3): 525-529.
- Pevet, P. (2003). "Melatonin in animal models." Dialogues Clin Neurosci **5**(4): 343-352.
- Pevet, P. and E. Challet (2011). "Melatonin: both master clock output and internal time- giver in the circadian clocks network." J Physiol Paris **105**(4-6): 170-182.
- Pfaff, D. (1968). "Effects of temperature and time of day on time judgments." Journal of Experimental Psychology **76**(3p1): 419.
- Portnova, G. V., O. V. Sysoeva, N. V. Maliuchenko, M. A. Timofeeva, M. A. Kulikova, A. G. Tonevitskii, M. P. Kirpichnikov and A. M. Ivanitskii (2007). "[Genetic basis of time perception in athletes]." Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova **57**(4): 450-460.
- Preitner, N., F. Damiola, L. Lopez-Molina, J. Zakany, D. Duboule, U. Albrecht and U. Schibler (2002). "The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator." Cell **110**(2): 251-260.
- Ralph, M. R. and M. N. Lehman (1991). "Transplantation: a new tool in the analysis of the mammalian hypothalamic circadian pacemaker." Trends Neurosci **14**(8): 362-366.
- Rangel-Barajas, C., I. Coronel and B. Floran (2015). "Dopamine Receptors and Neurodegeneration." Aging Dis **6**(5): 349-368.
- Rankin, M. L. and D. R. Sibley (2010). "Constitutive phosphorylation by protein kinase C regulates D1 dopamine receptor signaling." J Neurochem **115**(6): 1655-1667.
- Rao, X., X. Huang, Z. Zhou and X. Lin (2013). "An improvement of the 2⁻($\Delta\Delta$ CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis." Biostat Bioinforma Biomath **3**(3): 71-85.
- Reddy, A. B., M. D. Field, E. S. Maywood and M. H. Hastings (2002). "Differential resynchronisation of circadian clock gene expression within the suprachiasmatic nuclei of mice subjected to experimental jet lag." J Neurosci **22**(17): 7326-7330.
- Redman, J., S. Armstrong and K. T. Ng (1983). "Free-running activity rhythms in the rat: entrainment by melatonin." Science **219**(4588): 1089-1091.

- Refinetti, R. (2010). "Entrainment of circadian rhythm by ambient temperature cycles in mice." J Biol Rhythms **25**(4): 247-256.
- Refinetti, R. and M. Menaker (1992). "The circadian rhythm of body temperature." Physiol Behav **51**(3): 613-637.
- Reid, K. J., L. L. McGee-Koch and P. C. Zee (2010). "Cognition in circadian rhythm sleep disorders." Progress in brain research **190**: 3-20.
- Richardson, N. R. and D. C. Roberts (1996). "Progressive ratio schedules in drug self- administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy." J Neurosci Methods **66**(1): 1-11.
- Roedel, A., C. Storch, F. Holsboer and F. Ohl (2006). "Effects of light or dark phase testing on behavioural and cognitive performance in DBA mice." Laboratory animals **40**(4): 371- 381.
- Rondou, P., G. Haegeman and K. Van Craenenbroeck (2010). "The dopamine D4 receptor: biochemical and signalling properties." Cell Mol Life Sci **67**(12): 1971-1986.
- Ruby, N. F., F. Fernandez, A. Garrett, J. Klima, P. Zhang, R. Sapolsky and H. C. Heller (2013). "Spatial memory and long-term object recognition are impaired by circadian arrhythmia and restored by the GABAAAntagonist pentylenetetrazole." PLoS One **8**(8): e72433.
- Salgado-Delgado, R., M. Angeles-Castellanos, M. R. Buijs and C. Escobar (2008). "Internal desynchronization in a model of night-work by forced activity in rats." Neuroscience **154**(3): 922-931.
- Sande, P. H., D. C. Fernandez, H. J. Aldana Marcos, M. S. Chianelli, J. Aisemberg, D. M. Silberman, D. A. Saenz and R. E. Rosenstein (2008). "Therapeutic effect of melatonin in experimental uveitis." Am J Pathol **173**(6): 1702-1713.
- Savitt, J. M., V. L. Dawson and T. M. Dawson (2006). "Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine." J Clin Invest **116**(7): 1744-1754.
- Schwartz, M. D., C. Wotus, T. Liu, W. O. Friesen, J. Borjigin, G. A. Oda and H. O. de la Iglesia (2009). "Dissociation of circadian and light inhibition of melatonin release through forced desynchronization in the rat." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(41): 17540- 17545.
- Seeman, P. (2006). "Targeting the dopamine D2 receptor in schizophrenia." Expert Opin Ther Targets **10**(4): 515-531.
- Shi, Z., R. M. Church and W. H. Meck (2013). "Bayesian optimization of time perception." Trends Cogn Sci **17**(11): 556-564.

- Shibley, H. L., R. J. Malcolm and L. M. Veatch (2008). "Adolescents with insomnia and substance abuse: consequences and comorbidities." Journal of Psychiatric Practice® **14**(3): 146-153.
- Shumay, E., J. S. Fowler, G. J. Wang, J. Logan, N. Alia-Klein, R. Z. Goldstein, T. Maloney, C. Wong and N. D. Volkow (2012). "Repeat variation in the human PER2 gene as a new genetic marker associated with cocaine addiction and brain dopamine D2 receptor availability." Transl Psychiatry **2**: e86.
- Shurtleff, D., T. G. Raslear and L. Simmons (1990). "Circadian variations in time perception in rats." Physiol Behav **47**(5): 931-939.
- Sibley, D. R. (1999). "New insights into dopaminergic receptor function using antisense and genetically altered animals." Annu Rev Pharmacol Toxicol **39**: 313-341.
- Sidor, M. M., S. M. Spencer, K. Dzirasa, P. K. Parekh, K. M. Tye, M. R. Warden, R. N. Arey, J. F. Enwright, 3rd, J. P. Jacobsen, S. Kumar, E. M. Remillard, M. G. Caron, K. Deisseroth and C. A. McClung (2015). "Daytime spikes in dopaminergic activity drive rapid mood- cycling in mice." Mol Psychiatry **20**(11): 1406-1419.
- Sleipness, E. P., B. A. Sorg and H. T. Jansen (2007). "Diurnal differences in dopamine transporter and tyrosine hydroxylase levels in rat brain: dependence on the suprachiasmatic nucleus." Brain Res **1129**(1): 34-42.
- Slotten, H., B. Pitrosky and P. Pevet (1999). "Entrainment of rat circadian rhythms by daily administration of melatonin. Influence of the mode of administration." Adv Exp Med Biol **460**: 279-281.
- Smith, S. M., R. Renden and H. von Gersdorff (2008). "Synaptic vesicle endocytosis: fast and slow modes of membrane retrieval." Trends Neurosci **31**(11): 559-568.
- Sokoloff, P., J. Diaz, B. Le Foll, O. Guillin, L. Leriche, E. Bezard and C. Gross (2006). "The dopamine D3 receptor: a therapeutic target for the treatment of neuropsychiatric disorders." CNS Neurol Disord Drug Targets **5**(1): 25-43.
- Soshi, T., K. Kuriyama, S. Aritake, M. Enomoto, A. Hida, M. Tamura, Y. Kim and K. Mishima (2010). "Sleep deprivation influences diurnal variation of human time perception with prefrontal activity change: a functional near-infrared spectroscopy study." PLoS One **5**(1): e8395.
- Steeves, T. D., J. H. Ko, D. M. Kideckel, P. Rusjan, S. Houle, P. Sandor, A. E. Lang and A. P. Strafella (2010). "Extrastriatal dopaminergic dysfunction in Tourette syndrome." Annals of neurology **67**(2): 170-181.

- 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.
- Stowie, A. C., R. A. Prosser and J. D. Glass (2015). "Cocaine modulation of the mammalian circadian clock: potential therapeutic targets." Therapeutic Targets for Neurological Diseases **2**.
- 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.
- Sumaya, I. C., D. M. Byers, L. N. Irwin, S. Del Val and D. E. Moss (2004). "Circadian- dependent effect of melatonin on dopaminergic D2 antagonist-induced hypokinesia and agonist-induced stereotypies in rats." Pharmacol Biochem Behav **78**(4): 727-733.
- Surmeier, D. J., J. Ding, M. Day, Z. Wang and W. Shen (2007). "D1 and D2 dopamine- receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons." Trends Neurosci **30**(5): 228-235.
- Surmeier, D. J., W. Shen, M. Day, T. Gertler, S. Chan, X. Tian and J. L. Plotkin (2010). "The role of dopamine in modulating the structure and function of striatal circuits." Prog Brain Res **183**: 149-167.
- Svensson, A., M. Carlsson and A. Carlsson (1995). "Crucial role of the accumbens nucleus in the neurotransmitter interactions regulating motor control in mice." Journal of Neural Transmission/General Section JNT **101**(1-3): 127-148.
- Tan, D. X., L. C. Manchester, M. P. Terron, L. J. Flores, H. Tamura and R. J. Reiter (2007). "Melatonin as a naturally occurring co-substrate of quinone reductase-2, the putative MT3 melatonin membrane receptor: hypothesis and significance." J Pineal Res **43**(4): 317-320.
- Taylor, K. M., J. C. Horvitz and P. D. Balsam (2007). "Amphetamine affects the start of responding in the peak interval timing task." Behav Processes **74**(2): 168-175.
- Thanos, P. K., N. D. Volkow, P. Freimuth, H. Umegaki, H. Ikari, G. Roth, D. K. Ingram and R. Hitzemann (2001). "Overexpression of dopamine D2 receptors reduces alcohol self- administration." J Neurochem **78**(5): 1094-1103.
- Thompson, T., L. Grabowski-Boase and L. M. Tarantino (2015). "Prototypical anxiolytics do not reduce anxiety-like behavior in the open field in C57BL/6J mice." Pharmacology Biochemistry and Behavior **133**: 7-17.

- Tosini, G. and M. Menaker (1996). "Circadian rhythms in cultured mammalian retina." Science **272**(5260): 419-421.
- Trifilieff, P., B. Feng, E. Urizar, V. Winiger, R. D. Ward, K. M. Taylor, D. Martinez, H. Moore, P. D. Balsam, E. H. Simpson and J. A. Javitch (2013). "Increasing dopamine D2 receptor expression in the adult nucleus accumbens enhances motivation." Mol Psychiatry **18**(9): 1025-1033.
- Ueda, H. R., W. Chen, A. Adachi, H. Wakamatsu, S. Hayashi, T. Takasugi, M. Nagano, K. Nakahama, Y. Suzuki, S. Sugano, M. Iino, Y. Shigeyoshi and S. Hashimoto (2002). "A transcription factor response element for gene expression during circadian night." Nature **418**(6897): 534-539.
- Valentinuzzi, V. S., D. E. Kolker, M. H. Vitaterna, E. A. Ferrari, J. S. Takahashi and F. W. Turek (2001). "Effect of circadian phase on context and cued fear conditioning in C57BL/6J mice." Animal Learning & Behavior **29**(2): 133-142.
- Vallone, D., R. Picetti and E. Borrelli (2000). "Structure and function of dopamine receptors." Neurosci Biobehav Rev **24**(1): 125-132.
- Van Reen, E., T. L. Rupp, C. Acebo, R. Seifer and M. A. Carskadon (2013). "Biphasic effects of alcohol as a function of circadian phase." Sleep **36**(1): 137.
- Verwey, M., B. Robinson and S. Amir (2013). "Recording and analysis of circadian rhythms in running-wheel activity in rodents." J Vis Exp(71).
- Volkow, N. D., J. S. Fowler, G. J. Wang, R. Baler and F. Telang (2009). "Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction." Neuropharmacology **56 Suppl 1**: 3-8.
- Walf, A. A. and C. A. Frye (2007). "The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents." Nature protocols **2**(2): 322-328.
- Ward, R. D., C. Kellendonk, E. H. Simpson, O. Lipatova, M. R. Drew, S. Fairhurst, E. R. Kandel and P. D. Balsam (2009). "Impaired timing precision produced by striatal D2 receptor overexpression is mediated by cognitive and motivational deficits." Behav Neurosci **123**(4): 720-730.
- Webb, I. C., R. M. Baltazar, X. Wang, K. K. Pitchers, L. M. Coolen and M. N. Lehman (2009). "Diurnal variations in natural and drug reward, mesolimbic tyrosine hydroxylase, and clock gene expression in the male rat." J Biol Rhythms **24**(6): 465-476.
- Webb, I. C., M. N. Lehman and L. M. Coolen (2015). "Diurnal and circadian regulation of reward-related neurophysiology and behavior." Physiol Behav **143**: 58-69.

- Weber, M., T. Lauterburg, I. Tobler and J.-M. Burgunder (2004). "Circadian patterns of neurotransmitter related gene expression in motor regions of the rat brain." Neurosci Lett **358**(1): 17-20.
- Wiener, M., F. W. Lohoff and H. B. Coslett (2011). "Double dissociation of dopamine genes and timing in humans." J Cogn Neurosci **23**(10): 2811-2821.
- Wolf, M. E. and R. H. Roth (1990). "Autoreceptor regulation of dopamine synthesis." Ann N Y Acad Sci **604**: 323-343.
- Wright, K. P., C. A. Lowry and M. K. Lebourgeois (2012). "Circadian and wakefulness- sleep modulation of cognition in humans." Front Mol Neurosci **5**: 50.
- Wulff, K., S. Gatti, J. G. Wettstein and R. G. Foster (2010). "Sleep and circadian rhythm disruption in psychiatric and neurodegenerative disease." Nature Reviews Neuroscience **11**(8): 589-599.
- Yamazaki, S., R. Numano, M. Abe, A. Hida, R. Takahashi, M. Ueda, G. D. Block, Y. Sakaki, M. Menaker and H. Tei (2000). "Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats." Science **288**(5466): 682-685.
- Yoon, S. O. and D. M. Chikaraishi (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.
- Zhang, L. S. (2011). "Photoperiodic properties of circadian rhythm in rat." Unpublished PhD thesis University of Michigan.
- Zhang, R., N. F. Lahens, H. I. Ballance, M. E. Hughes and J. B. Hogenesch (2014). "A circadian gene expression atlas in mammals: implications for biology and medicine." Proceedings of the National Academy of Sciences **111**(45): 16219-16224.
- Zisapel, N. (2001). "Melatonin-dopamine interactions: from basic neurochemistry to a clinical setting." Cell Mol Neurobiol **21**(6): 605-616.
- Zisapel, N., Y. Egozi and M. Laudon (1982). "Inhibition of dopamine release by melatonin: regional distribution in the rat brain." Brain Res **246**(1): 161-163.