



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

Unidad Zacatenco

Departamento de Farmacología

“Registro de la actividad neuronal del Núcleo Accumbens
durante una tarea conductual apetitiva y consumatoria”

T E S I S

Que presenta:

QFB Blanca Ivett Durán Sosa

Para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias
en la Especialidad en Farmacología**

Director de Tesis:

Ranier Gutiérrez Mendoza

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Farmacología, en el Laboratorio de Neurobiología del Apetito bajo la tutoría del Dr. Ranier Gutiérrez; mediante el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Fronteras de la Ciencia 63, Problemas Nacionales 464 y a través de la beca No. de registro 661913.

Agradecimientos:

A mis padres, Gerardo Durán y Blanca Sosa, que me dan la fuerza y el ánimo para nunca dejarme caer, sin importar la situación.

Al Dr. Ranier Gutiérrez por darme la oportunidad de formar parte de su equipo, por nunca dejar de impulsar este proyecto e inspirarme a tratar de ser cada vez mejor.

A todos y cada uno de los integrantes del laboratorio de Neurobiología del Apetito que conocí durante la realización de esta tesis, por su apoyo y sus enseñanzas. Por su amistad, gracias muchachos.

R, gracias por estar conmigo y apoyarme para emprender este viaje.

Índice

Resumen	1
Abstract.....	2
I. Introducción.....	2
Conducta Apetitiva y Conducta Consumatoria en Alimentación	3
Placer (<i>liking</i>), Querer (<i>wanting</i>) y Aprendizaje (<i>learning</i>) en la recompensa	4
Núcleo Accumbens y su participación en el control de la alimentación	7
Planteamiento del problema.....	10
Hipótesis	10
Objetivos.....	10
Objetivo general	10
Objetivos particulares	10
II. Metodologías.....	11
Animales de experimentación	11
Protocolo conductual	11
Cirugía.....	13
Registro con microelectrodos.....	14
Análisis de datos	15
Clasificación de espigas (Offline Spike Sorting).....	15
Análisis de estadístico	15
III. Resultados.....	15
Resultados Conductuales	15
Electrofisiología	19
IV. Discusión	28
V. Conclusión.....	32
VI. Bibliografía.....	33

Resumen

La alimentación estudiada como un comportamiento implica una secuencia de respuestas conductuales que se pueden dividir en dos: la conducta apetitiva, que permite poner al organismo en contacto con los estímulos que desencadenarán la consecuente conducta consumatoria, en este caso, la ingesta. El control de la alimentación es influenciado por la señalización homeostática y por las propiedades recompensantes de la comida, que pueden estimular el apetito no homeostático (comer por placer), por lo que recientemente se ha remarcado la importancia de distinguir entre los componentes de una recompensa: el componente placentero de la alimentación (*liking*), observable durante el consumo; el componente motivacional (*wanting*) que participa en la conducta apetitiva; y el aprendizaje, presente durante todo el ciclo de alimentación. El Núcleo Accumbens Shell (NAcSh) está altamente relacionado en estos procesos. Durante la realización de esta tesis nos propusimos caracterizar el correlato neuronal de las neuronas del NAcSh en el componente apetitivo y consumatorio de la alimentación, para lo cual diseñamos una tarea instrumental, apetitiva y consumatoria donde los sujetos debían realizar cuatro palanqueos (fase apetitiva) para obtener una recompensa de pellets sabor chocolate o solución de sacarosa al 20%. Cada recompensa está asociada a una palanca específica, localizada en paneles opuestos al lugar de entrega de cada recompensa. Posterior al entrenamiento se implantó un arreglo de microelectrodos en los animales. Se registraron en total 109 neuronas del NAcSh, se encontró que más del 90 % se modularon durante al menos un evento de la tarea y de manera selectiva para cada tipo de reforzador (Pellet de chocolate vs. sacarosa). En conclusión, hemos diseñado y estandarizado un nuevo paradigma conductual capaz de separar objetivamente la fase apetitiva de la fase consumatoria durante la conducta de alimentación; y sugieren que las neuronas del NAcSh se modula ante conductas apetitivas (por ejemplo, escuchar estímulos auditivos que predicen una recompensa, una conducta instrumental y ante la anticipación/aproximación a una recompensa). Demostramos por primera vez que las neuronas del NAcSh se modulan con sólo ver el alimento. Además, se encontraron neuronas que se modulan con el consumo de un reforzador; y un tercer grupo cuyas respuestas son moduladas durante las fases apetitivas y consumatorias.

Abstract

Feeding behavior involves a sequence of responses that can be divided into two: appetitive behavior, an exploratory phase that allows the organism to be aware of stimuli that will drive the consequent consummatory behavior, in this case, food intake. Feeding behavior is influenced by peripheral homeostatic signals and the rewarding features of food that can stimulate non homeostatic feeding (eating for pleasure), which is why there's a recent interest to distinguish the main to reward components: 1) liking, as a reaction to hedonic impact and can be observe during consumption; 2) wanting, as a motivational process that drives appetitive behavior and 3) learning, associations and cognitive representations that occur in both appetitive and consummatory phases. Nucleus accumbens shell (NAcSh) is a brain region involved in the three reward components. In this thesis, we characterized the neuronal correlates from NAcSh neurons into the appetitive (wanting) and consummatory (liking) feeding behaviors. In order to do so, we designed an instrumental appetitive/consummatory task where the animals were required to press a lever four times after a tone (appetitive phase), to be rewarded with a 20% sucrose solution and chocolate flavored pellets (consummatory phase). Each reinforcer was associated to a specific lever at the opposite wall from the port where it was delivered. An electrode microarray was implanted after training. We recorded 109 neurons in the NAcSh while mice performed our task. We found that 90% of recorded neurons were modulated at least in one epoch throughout the task, and their responses were reward-selective (chocolate pellet vs sucrose solution). The majority of the neurons tend to respond strongly to the most palatable reward (chocolate pellet). In summary, we have designed and standardized a new behavioral paradigm able to objectively separate the appetitive from the consummatory phase of feeding behavior. Our data suggest that a subset of neurons in the NAcSh selectively respond during appetitive actions only (e.g. hearing an auditory stimuli predicting a reward, operant behavior, anticipation of impending rewards and during approach behavior). We have also shown for the first time that NAcSh neurons may be modulated by just the sight of food rewards. Other neurons responded only during consummatory behavior (consumption), though the majority of responses were modulated in both appetitive and consummatory phases.

I.Introducción

Conducta Apetitiva y Conducta Consumatoria en la Alimentación

La alimentación es una acción común para todos los seres vivos, que consiste en la ingestión de alimento para mantener un equilibrio metabólico, energético y nutricional. La alimentación implica una secuencia sistemática de respuestas conductuales que se pueden dividir en dos: la conducta apetitiva (de búsqueda o acercamiento) y la conducta consumatoria. El término “consumatorio”, acuñado por los etólogos, pretende transmitir la idea de consumación o finalización de una serie de respuestas típicas del comportamiento animal. En contraste, las respuestas apetitivas ocurren al inicio de la conducta, es una fase de búsqueda que permite poner al organismo en contacto con los estímulos que desencadenarán la conducta consumatoria. La conducta apetitiva es variable, espontánea y dependiente del entorno; mientras que la consumatoria consiste en respuestas altamente estereotipadas, haciéndola específica para cada especie (Ball, 2008; Domjan, 2010).

Recientemente se han descrito dos sistemas paralelos que influyen en el control de la alimentación: la señalización homeostática, que es sensible al balance energético del organismo; y la vía de señalización hedónica, impulsada por la palatabilidad y las propiedades recompensantes de la comida, ésta puede influir la ingesta sin tomar en cuenta las propiedades energéticas. El sistema homeostático incluye la interacción de hormonas circulantes que señalizan hambre y saciedad, las cuales inician o inhiben la ingesta de alimento, respectivamente. Por otra parte, el sistema de recompensa desempeña un papel importante en el comportamiento de alimentación. Este incluye los aspectos hedónicos de la comida, señales afectivas o motivacionales, así como pistas discretas de temporalidad y contexto (por ejemplo, la hora del día) (Figura 1) (Lutter, 2009; Johnson, 2013).

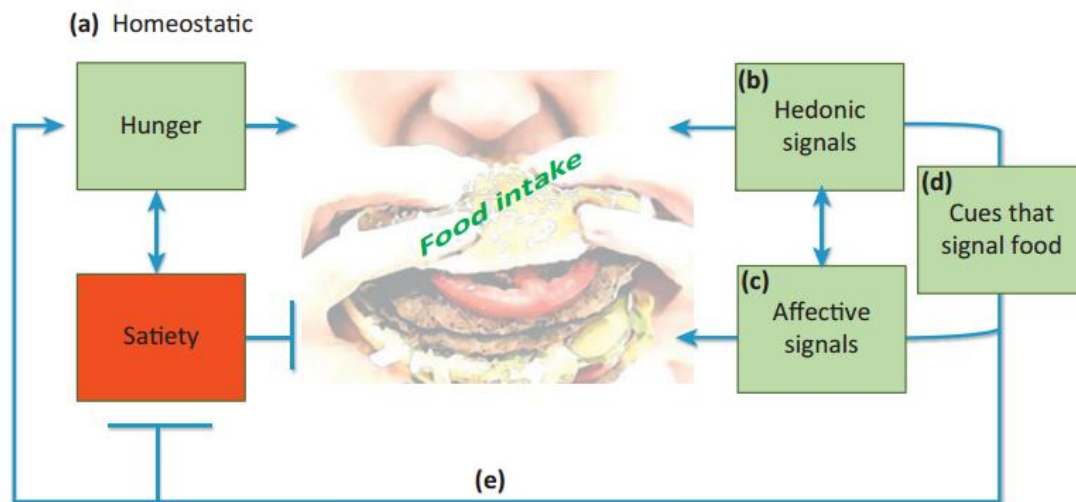


Figura 1. Señales que influyen la ingesta de alimento. El Sistema homeostático (a) incluye interacciones entre señales circulante de hambre y de saciedad; que inician o inhiben la ingesta de alimento, respectivamente. En adición a estas señales del balance energético, las señales de recompensa juegan un papel importante en el comportamiento alimenticio, las cuales incluyen el aspecto hedónico de la ingesta (b), como la palatabilidad y las características recompensantes de la alimentación per se, así como señales afectivas (o motivacionales) (c); y múltiples pistas discretas y contextuales (y/o temporales) asociadas a la alimentación (d), que a través del aprendizaje adquieren control cognitivo y conductual que resulta en consumo de alimento. Estas pistas pueden iniciar la ingesta de alimento al influir en la señalización homeostática (por ejemplo, aumentando la sensación de hambre o inhibiendo los mecanismos que señalizan de saciedad). (Imagen tomada de Johnson, 2013).

Placer (*liking*), Querer (*wanting*) y Aprendizaje (*learning*) en la recompensa

El placer de la alimentación puede estimular el apetito no homeostático, por lo que recientemente se ha profundizado en la importancia de distinguir entre el componente placentero del alimento y el componente motivacional (Mela, 2006). Es decir, si el alimento se considera como una recompensa, se pueden reconocer tres componentes que involucran sus propiedades hedónicas: 1) '*liking*', reacciones básicas al impacto hedónico de la recompensa, que pueden medirse objetivamente, por ejemplo, en expresiones orofaciales como lamerse los labios (Figura 2). 2) '*wanting*', proceso de motivación de la saliencia incentiva. Es decir, el cerebro le asigna un valor a la recompensa, y por ende

un atributo de deseo. 3) *'learning'*, representaciones cognitivas y asociaciones pavlovianas o instrumentales que pueden reforzar la conducta (Berridge & Robinson, 2003).

El proceso de *'wanting'* tiende a dominar la fase apetitiva de la alimentación, mientras que el proceso de *'liking'* domina la subsecuente fase consumatoria. El proceso de *'learning'* ocurre durante todo el ciclo de las conductas de alimentación. El circuito de recompensa del cerebro regula estos procesos y los traduce en comportamiento (Berridge & Kringelbach, 2015).

Hedonic Reactions (sweet)



Aversive Reactions (bitter)



Figura 2. Expresiones orofaciales a diferentes sabores. Se presentan reacciones hedónicas (*liking*) en un recién nacido, un orangután y una rata adulta (panel superior); a comparación de reacciones aversivas (*dislike*) en mismos sujetos ante la presentación de un sabor amargo (panel inferior). Estas expresiones proveen de un índice objetivo del impacto hedónico de un sabor (Imagen tomada de Peciña, 2008).

En las últimas décadas se han encontrado sitios clave (*hot spots*) en la red de zonas hedónicas cerebrales que pueden influir en estas propiedades. En el núcleo accumbens (NAc), por ejemplo, se duplican las reacciones de 'liking' al inyectar agonistas opioides en la región anterior del Shell; mientras que la estimulación dopaminérgica o el bloqueo del receptor AMPA elevan el proceso de 'wanting' sin alterar el 'liking' (Figura 3) (Berridge & Kringelbach, 2015). Esto sugiere que el NAc está altamente relacionado en ambos procesos de los componentes de una recompensa.

Hedonic vs Aversive vs Intake Contrast

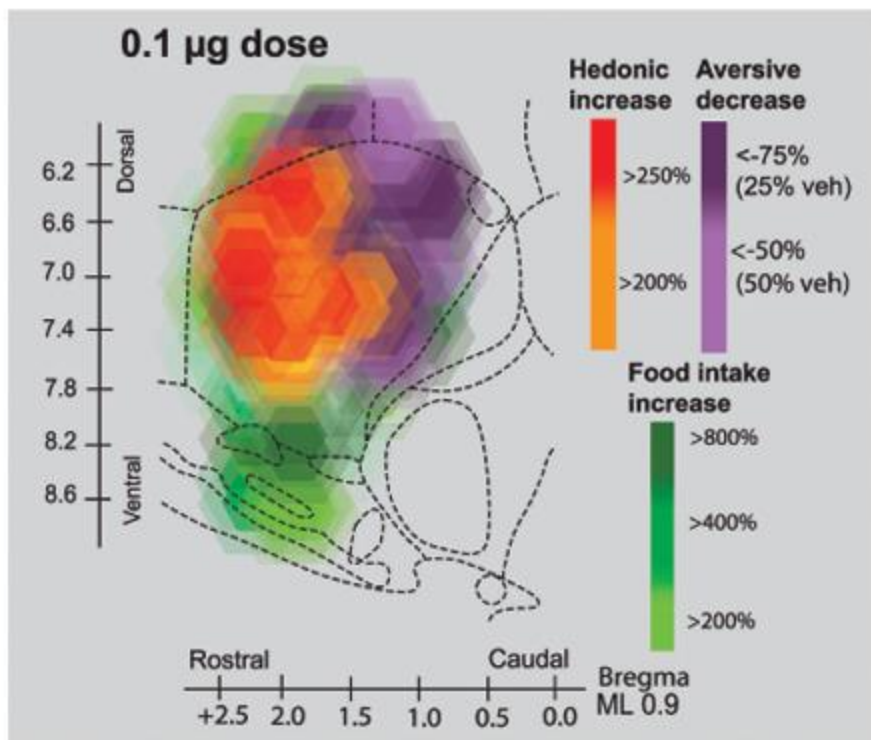


Figura 3. Mapeo de hotspots y coldspots en el NAcSh. Virtualmente, la región medial del Shell estimula el 'wanting' (e.g., aumenta el consumo de alimento) en respuesta a la estimulación opioide. Los hotspots para 'liking', donde la estimulación opioide aumenta reacciones hedónicas positivas se encuentran en la porción anterior y dorsal del Shell (en rojo). Reacciones de 'liking' a sacarosa se reducen por estimulación opioide (aunque sigue estimulando el 'wanting') en una región más posterior que ha sido denominada como coldspot hedónico (morado). Imagen tomada de Castro & Berridge (2014) modificado de Pecina & Berridge (2005).

Núcleo Accumbens y su participación en el control de la alimentación

El núcleo accumbens (NAc) se encuentra en la región ventral del estriado y se subdivide en dos regiones: su porción Shell y Core (Groenewegen et al. 1999). El NAc está compuesto en su gran mayoría -el 95%- por neuronas GABAérgicas espinosas medianas (*medium spiny neurons*, MSN), el 5% restante lo conforman diversas interneuronas (Sesack & Grace 2010; Gutiérrez et al., 2011; Song et al. 2014). Las MSN se subdividen en 2 grandes subtipos las que expresan el receptor a dopamina D1 (MSND1+) y las que tienen el receptor D2 (MSND2+) (Gerfen & Surmeier 2011). Las MSN GABAérgicas del NAc son neuronas de proyección, cuya actividad se ha relacionado con el valor motivacional de una recompensa, observándose mayor actividad de las MSN en la elección y consumo de recompensas con mayor valor motivacional con respecto a las de menor valor (Burton et al. 2015).

El NAc forma un circuito con las neuronas dopaminérgicas en el Área Tegmental Ventral (ATV) que es crucial para reconocer una recompensa en determinado contexto y para iniciar el consumo (Koob & Le Moal, 2008). A su vez, el NAc recibe inervación glutamatérgica de la Corteza Prefrontal (CPF), Amígdala e Hipocampo; y envía inervaciones GABAérgicas al ATV y al hipotálamo lateral (HL) (Figura 4).

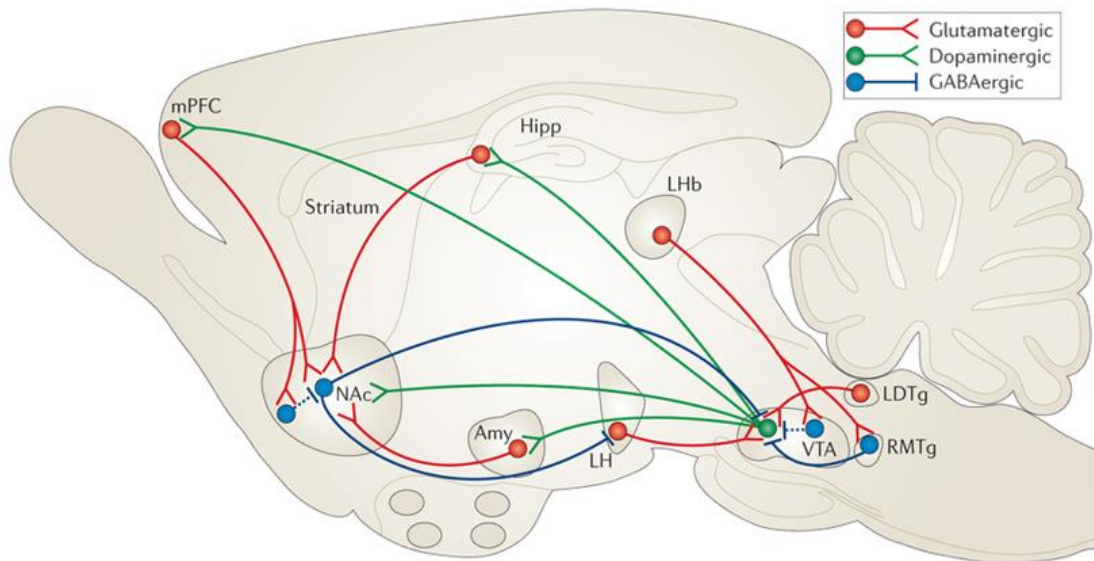


Figura 4. Circuito de recompensa. Esquema simplificado de las conexiones dopaminérgicas, glutamatérgicas y GABAérgicas desde y hacia el ATV (VTA en la imagen) y el NAc en el cerebro murino. El circuito primario de recompensa incluye las proyecciones dopaminérgicas desde ATV hacia el NAc, que liberan dopamina en respuesta a estímulos relacionados con la recompensa y las proyecciones GABAérgicas desde NAc hacia ATV. El NAc recibe densa inervación glutamatérgica desde el área medial de la CPF (mPFC), hipocampo (Hipp) and amígdala (Amy). El ATV recibe inervaciones desde el tegmento lateraldorsal (LDTg), la habenula lateral (LHb) y el HL (LH en la imagen). Imagen tomada de Russo& Nestler (2013).

El NAc ya había sido involucrado en el control neuronal de la alimentación; especialmente en el consumo de alimentos palatables (Kelley et al., 2002) y recientemente ha sido involucrado de forma repetida con el desarrollo de la obesidad (Johnson et al., 2010). En este sentido, se ha visto (tanto en roedores como en humanos) que el comer compulsivamente está relacionado con la disminución de receptores dopaminérgicos del tipo D2 en el estriado ventral (Johnson, 2010; Volkow, 2014). Por otra parte, la inactivación farmacológica mediante la microinfusión de múscimol –un agonista GABAérgico- directamente en esta región incrementa la ingesta de alimentos ricos en grasa (Stratford et al., 1997). En contraste, la activación del NAc -a través de la estimulación eléctrica- interrumpe el consumo (Krause et al., 2010). Es decir, la actividad del NAc tiene un papel bidireccional en el control de la alimentación: 1) Su inactivación –global e indiscriminada- incrementa el apetito

por alimentos palatables y 2) su activación –generalizada- detiene el consumo de alimentos.

En el laboratorio del Dr. Ranier se ha encontrado que la activación por medio de optogenética de las terminales glutamatérgicas que llegan al NAc, en ratones transgénicos Thy1-ChR2 hambrientos, detiene de forma temporal el consumo de azúcar (Prado, et al. 2016, en prensa). Estos resultados sugieren fuertemente que algunas de las neuronas del NAc tienen la capacidad de controlar la alimentación. Además, recientemente en el laboratorio también se demostró que varios de los supresores del apetito más utilizados para el tratamiento de la obesidad (e.g., derivados de la anfetamina, tales como el dietilpropión, la fentermina y el bupropión) inducen pérdida de peso a través de la activación de los receptores D1 y D2 expresados en las neuronas del NAc (Kalyanasundar et al., 2015), lo que nuevamente indica que las neuronas del NAc podrían ser un nuevo blanco farmacológico para controlar el apetito.

Se ha confirmado que el HL se inhibe por las proyecciones de MSND1+ provenientes del NAc, que forman un circuito de control de la alimentación capaz de ignorar la señalización metabólica (O'Connor, et al. 2015). Además, poblaciones celulares del HL se activan diferencialmente en conductas apetitivas y consumatorias; es decir, el HL presenta grupos neuronales que se activan en la fase apetitiva de la conducta de ingesta y un grupo diferente que responde durante el consumo de la recompensa (Jennings, et al. 2015). Sin embargo, no se ha explorado si las poblaciones neuronales presentes en el NAc Shell se modulan de manera específica de acuerdo con el tipo de alimento a consumir (de alimentos sólidos y líquidos) y si estas neuronas se activan diferencialmente durante las fases apetitiva y consumatoria de la conducta de la alimentación. La realización de este proyecto tuvo como finalidad contribuir a identificar y entender cómo la actividad de las neuronas del NAc influye en el control neuronal del apetito.

Planteamiento del problema

En las últimas décadas se ha explorado el papel del NAc en el control de la alimentación (Kelley, 1997; Krause, 2010). Se sabe también que el NAc proyecta MSN D1+ formando la mayor fuente de inhibición del HL (O'Connor, 2015). Se ha confirmado que las neuronas GABAérgicas del hipotálamo lateral se activan diferencialmente en conductas apetitivas y consumatorias (Jennings, et al. 2015). Sin embargo, no se ha explorado si el NAcSh participa diferencialmente en estas conductas (apetitiva y consumatoria).

Hipótesis

En el NAcSh existen distintos grupos neuronales que se activan diferencialmente durante la alimentación; una población de neuronas que responde a conductas apetitivas, y otra población responde a conductas consumatorias. De igual manera, la tasa de disparo de ambos grupos neuronales se modula de manera dependiente del valor hedónico del alimento que se consume y del tipo de alimento o reforzador.

Objetivos.

Objetivo general

Establecer un correlato neuronal en el NAcSh y los componentes conductuales de la alimentación.

Objetivos particulares

1. Diseñar una tarea conductual que permita identificar la participación de las neuronas del NAc en conductas apetitivas y consumatorias para dos reforzadores distintos.

2. Encontrar una correlación entre la actividad eléctrica de las poblaciones neuronales del NAc y el comportamiento (conductas apetitivas y consumatorias) mientras los sujetos ejecutan la tarea.
3. Determinar si las neuronas del NAc se activan de manera diferencial de acuerdo con valor hedónico que se codifica para cada recompensa palatable.

II. Metodologías

Animales de experimentación

Para este estudio se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6J de 20 a 25 gramos de peso. Durante 7 días se pesó cada ratón y se registró su consumo de agua y alimento, para establecer líneas basales de peso corporal e ingesta. Posteriormente se sometieron a un protocolo de control de alimentación, que consiste en dar al animal solamente 3 horas diarias de acceso a agua y alimento *ad libitum*. Si el sujeto disminuía su peso por debajo del 85% del promedio de la medición de peso basal, se suspendía temporalmente la privación de alimento y el entrenamiento o la participación en la tarea hasta que alcanzara nuevamente este porcentaje. Todos los protocolos fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del CINVESTAV.

Protocolo conductual

En esta tesis se diseñó una tarea *ad hoc*, en la cual los ratones se entrenaron en una caja operante de la marca Med Associates para desempeñar una tarea recompensada con solución de sacarosa al 20% y

pellets sabor chocolate (Bio-Serve). La caja cuenta con una palanca retráctil y un puerto con receptáculo de pellet en una de sus caras; en el panel opuesto se encuentra una palanca retráctil y un puerto con un bebedero de sacarosa (Figura 5).

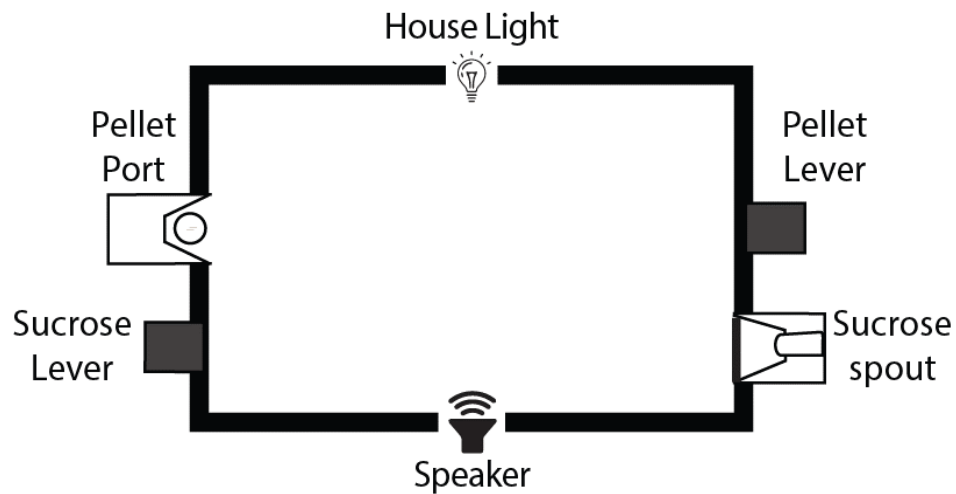


Figura 5. Diagrama de caja operante.

La tarea consistió en sesiones de 30 minutos, cada una con un número n de ensayos; donde el 50% corresponde a ensayos recompensados con sacarosa y el otro 50% a ensayos recompensados con pellet de chocolate, siempre presentados en orden alternado. Cada ensayo iniciaba con la luz de la caja encendida, en seguida se emitía un tono de 7 kHz (Turner, et al. 2005; Heffner & Heffner 2007) con una duración de 2.9 segundos. Cuatrocientos milisegundos después de iniciar el tono, se exponía una de las palancas y se mantenía disponible hasta que el sujeto realizaba cuatro palanqueos (razón fija 4: RF4), después de los cuales obtendría el reforzador correspondiente: un pellet de chocolate de 20 mg o la oportunidad para lengüetear sacarosa durante dos segundos (5 μ L/gota) (Figura 6). En el caso de los ensayos para pellet de chocolate, había una probabilidad del 50% de que el pellet cayera al receptáculo inmediatamente después del cuarto palanqueo, mientras que el

otro 50% de los ensayos el pellet se dispensaba hasta que se registrara la entrada al puerto de recompensa. En ambos casos, se le daba al sujeto 15 segundos (a partir del ingreso al puerto) para consumir el pellet.

En ambos tipos de ensayos, cuando el sujeto salía del puerto de recompensa se iniciaba un contador de 5 segundos antes de iniciar el siguiente ensayo, el cual se reiniciaba si se detectaba ingreso a cualquiera de los puertos de recompensa, para evitar iniciar el ensayo cuando el sujeto se encontraba distraído.

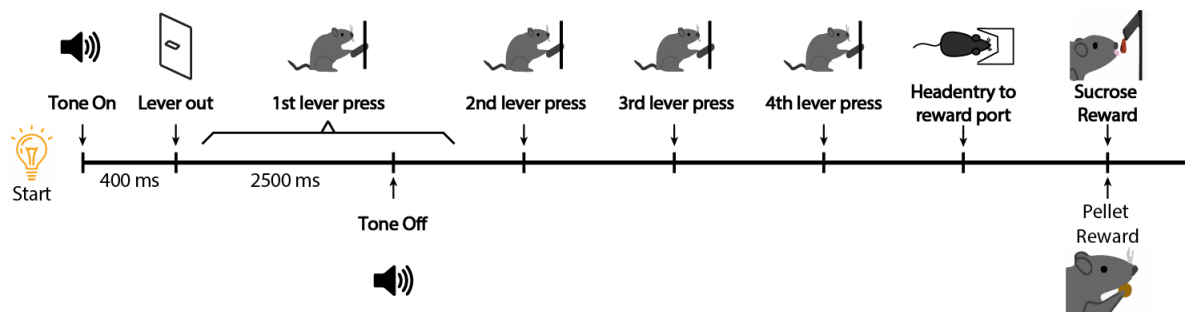


Figura 6. Diagrama de la tarea conductual. El ensayo se inicia con la luz de la caja encendida, seguido de la emisión de un tono de 7 kHz que dura 2.9 segundos. Cuatrocientos milisegundos después de iniciar el tono, se expone una de las palancas y se mantiene disponible hasta que el sujeto realiza cuatro palanqueos (la llave en el primer palanqueo indica que este puede ocurrir durante el tono o después de que el tono termina), después debe dirigirse al puerto de entrega de recompensa donde obtiene el reforzador correspondiente: un pellet de chocolate de 20 mg o la oportunidad para lengüetear sacarosa durante dos segundos (5µL/gota).

Cirugía

Los ratones fueron anestesiados con isoflurano (inducción 3-5%, mantenimiento 1-2%). La cabeza del sujeto fue afeitada y montada en un estereotáxico. Se aplicó un ungüento antibiótico-antiinflamatorio para proteger los ojos (Trióptico compuesto, Grin lab). Se realizó una incisión de aproximadamente 2 cm, posterior a una inyección subcutánea de 0.01 ml de

lidocaína (2 %); se limpió el cráneo con peróxido de hidrógeno y se removió el periostio. Se localizó Bregma y Lambda para nivelar el cráneo en el plano anteroposterior y se niveló el plano mediolateral localizando la coordenada +/- 1.5 a partir de Bregma. Se realizó un trepano unilateral con un taladro dental en las coordenadas para el NAc Shell [AP +1.2, ML +/-1, DV-5.1mm], a través del cual se implantó el arreglo de microelectrodos. Una vez colocado en el sitio, se fijó el electrodo con cemento dental Metabond y se reforzó con acrílico dental. Los sujetos sometidos a cirugía estuvieron en recuperación durante una semana; los primeros tres días de la cual, se les administró enrofloxacin (Baytril) como antibiótico vía intraperitoneal.

Registro con microelectrodos

Los animales fueron evaluados en la realización de la tarea, considerando como criterio de aprendizaje un mínimo de 30 ensayos por sesión. Los sujetos que aprobaron o superaron este criterio fueron sometidos a una cirugía estereotáxica para la implantación de un arreglo de 16 microelectrodos de tungsteno. Gracias a la amplificación del voltaje extracelular, estos microelectrodos permitieron monitorear la actividad eléctrica unitaria extracelular de neuronas localizadas en el NAcSh, en animales en libre movimiento durante la realización de cada ensayo.

Adquisición de datos

Se utilizó el sistema Multichannel Acquisition Processor (MAP) de Plexon Inc., Texas para la adquisición de datos durante el registro de la actividad neuronal.

Análisis de datos

Clasificación de espigas (Offline Spike Sorting)

Se realizó una clasificación previa durante el registro in vivo (online sorting). Al final del registro, las unidades se reclasificaban de acuerdo a la forma del potencial, amplitud y el intervalo entre espigas utilizando el software Offline Sorter de Plexon Inc., Texas.

Análisis de estadístico

Los datos fueron analizados en MATLAB R2013a y Excel 2013. Para el análisis de datos no paramétricos se empleó la prueba de Wilcoxon, mientras que para los datos paramétricos se utilizó la prueba t de Student no pareada. En ambos casos, $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

III. Resultados











Resultados Conductuales

Durante la ejecución de nuestra tarea se asignaron un total de 16 eventos, 8 para los ensayos recompensados con pellet y 8 para los recompensados con sacarosa (**Tabla 1**). La fase apetitiva de la tarea consiste en la emisión del tono que funciona como estímulo condicionado; la salida de la palanca que es un estímulo auditivo y visual, la respuesta operante (cuatro palanqueos) y la aproximación hacia la recompensa, que como se indicó anteriormente, en el caso de los ensayos para pellet se registraron dos tipos de aproximaciones: cuando el pellet de chocolate está disponible en el puerto y cuando el sujeto debe ingresar para que el pellet sea dispensado.

La fase consumatoria de la tarea incluye la ingesta de ambas recompensas, no obstante, el sistema no puede medir el momento exacto en que se inicia el consumo del pellet de chocolate, por lo que la conducta consumatoria se medirá únicamente con los lengüeteos de sacarosa.

Como primera parte del entrenamiento, los sujetos aprendieron a palanquear a través de aproximaciones sucesivas, de acuerdo a la metodología propuesta por Rossi y Yin en el 2012, en un programa de reforzamiento continuo, donde por cada palanqueo se entrega una recompensa.

Tabla 1. Eventos de ambos tipos de ensayo durante la tarea operante.

Eventos de Ensayos de Pellet	Eventos de Ensayos de Sacarosa
Tono 	Tono 
Salida de la palanca 	Salida de la palanca 
Primer palanqueo	Primer palanqueo
Segundo palanqueo 	Segundo palanqueo 
Tercer palanqueo	Tercer palanqueo
Cuarto palanqueo	Cuarto palanqueo
Entrada al puerto con recompensa disponible (pellet en receptáculo) 	Entrada al puerto con recompensa disponible 
Entrada al puerto con recompensa disponible (previo a la entrega de pellet) 	Lengüeteos 

* Los eventos sombreados entran el periodo diseñado para medir las conductas apetitivas de la tarea, mientras que el lengüeteo está considerado como la conducta consumatoria.

Una vez aprendida la conducta de palanqueo se introduce la razón fija, en la cual los animales entrenan hasta alcanzar un mínimo de 20 ensayos completos por sesión (10 ensayos para cada recompensa). Para los ensayos de sacarosa se considera un ensayo completo registrar al menos un lengüeteo con recompensa; mientras que para el ensayo de pellet de chocolate el sujeto debe entrar al puerto de recompensa para considerarse un ensayo terminado.

Si la sesión termina antes de registrarse cualquiera de estos eventos, se elimina el ensayo incompleto para el análisis de resultados.

Cabe destacar que durante las sesiones previas a la implantación del microarreglo, los ensayos para pellet de chocolate entregan el reforzador inmediatamente después del cuarto palanqueo. Es decir, la condición de la recompensa no anticipada se restringe únicamente a las sesiones de registro.

Los sujetos elegidos para ser implantados se entrenaron entre 21 y 30 días, la gráfica A de la Figura 7 muestra el promedio de ensayos realizados en los últimos 10 días de entrenamiento previo a la cirugía, destacando que estas sesiones superan el criterio de ensayos mínimos requeridos, lo que los hizo candidatos ideales para la cirugía. Sin embargo, durante las primeras sesiones post cirugía el rendimiento de los sujetos disminuyó considerablemente. Esto se confirma al observar la latencia para completar los ensayos: previo a la cirugía, los animales realizan un ensayo completo (para ambas recompensas) en menos de 30 segundos; las sesiones posteriores a la cirugía extienden este tiempo hasta un minuto (Figura 7).

Durante el periodo de entrenamiento, se observa que los ratones tienen una tendencia a tardar menos en realizar los ensayos para pellet de chocolate (*latency to complete trial*, panel A), destacando en particular su latencia para engancharse en el palanqueo al escuchar el estímulo condicionado (*latency to first lever press*, panel A). En las sesiones de registro electrofisiológico, el tiempo que tarda el sujeto en dar el primer palanqueo alcanza una diferencia significativa entre ambas recompensas; además de observar también una tendencia a tardar más en completar la razón fija 4 en la palanca de sacarosa (Figura 7). Esto sugiere que los animales adquieren cierta preferencia por la recompensa sólida, de modo que están más motivados para trabajar por pellet de chocolate.

Durante las sesiones de registro, en el caso de los ensayos donde se anticipa la entrega del pellet, no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre el tiempo que tarda el ratón en trasladarse hacia el puerto de recompensa después de realizar el cuarto palanqueo con respecto a los ensayos donde el sujeto no anticipa el reforzador (**Figura 7**).

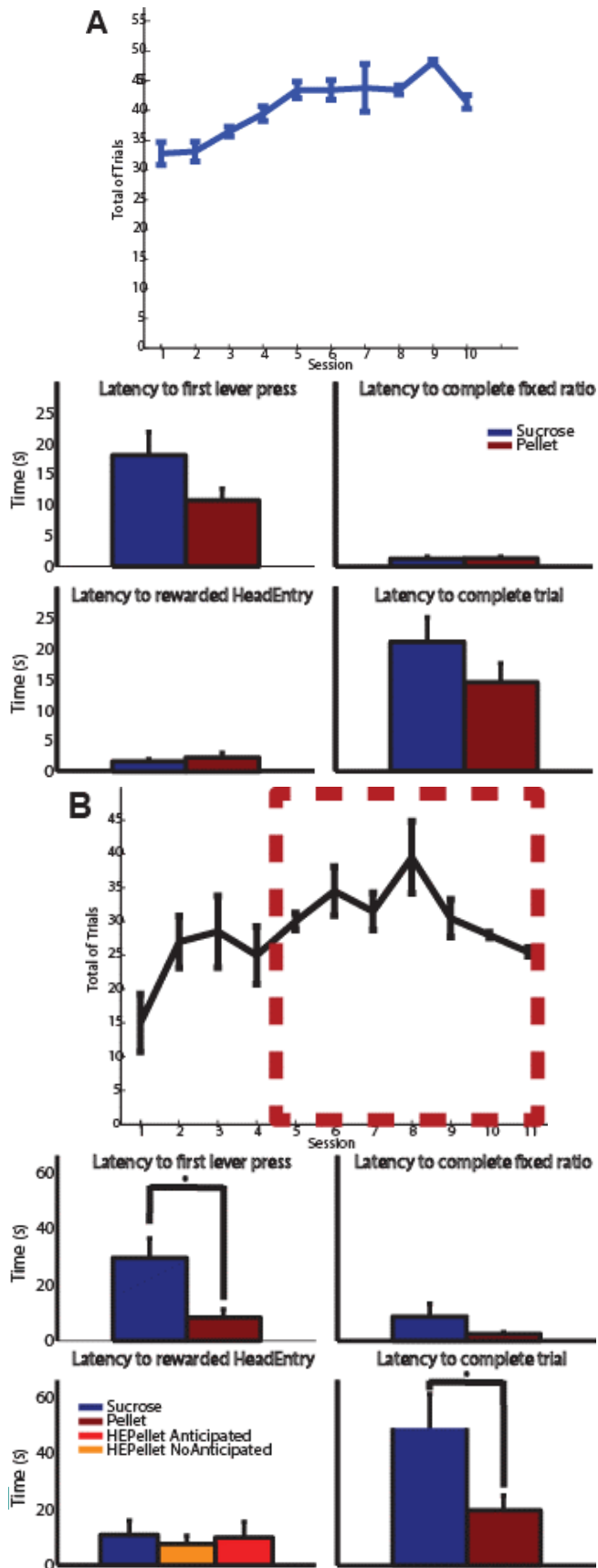


Figura 7. La eficiencia del sujeto (en número de ensayos) disminuye ligeramente post cirugía, pero se mantiene una tendencia conductual a realizar más rápido los ensayos reforzados con pellet en comparación con los de sacarosa. La gráfica muestra el promedio del total de ensayos por sesión realizados por los (A, 10 sesiones previas a la cirugía de implantación de electrodo; B, sesiones de registro). Las gráficas muestran las latencias en tres periodos de la tarea: 1) latencia desde el inicio del tono hasta el primer palanqueo (latency to first lever press), 2) tiempo promedio entre el primer y el cuarto palanqueo (latency to complete fixed ratio), 3) latencia desde el cuarto palanqueo hasta entrada al puerto de recompensa (latency to rewarded headentry); por último, el promedio del tiempo que tarda en realizar un ensayo completo, desde el inicio del tono hasta la entrada al puerto de recompensa (latency to complete trial) (A, 10 sesiones previas a la cirugía de implantación de electrodo; B, sesiones de registro, se calcula la media únicamente de las sesiones destacadas en el recuadro, es decir, cuando el sujeto recupera la conducta de palanqueo).

Para esta tesis se registraron 2 ratones por un periodo de 2 semanas cada uno, obteniendo una $n = 109$ neuronas del NAcSh en total, de las cuales se encontró que el 97.25 % ($n=106$) se modularon significativamente en al menos uno de los eventos enlistados en la tabla 1 (Tabla 1).

Estas modulaciones se midieron estadísticamente mediante una prueba de rangos de Wilcoxon, donde comparamos la tasa de disparo anterior al evento de interés contra la tasa de disparo posterior al momento en que se registró dicho evento. Se consideró que existía una modulación cuando un valor de $P < 0.05$.

Respuestas Apetitivas

Modulaciones durante el periodo del tono

Durante el registro electrofisiológico observamos que las neuronas del NAcSh se ven altamente moduladas durante todos los periodos apetitivos de la tarea. El tono de 7 kHz, que anuncia el inicio del ensayo, es uno de los eventos con mayor número de respuesta ($n=51$ para los ensayos de pellet de chocolate, $n=40$ para los de sacarosa). Todas las modulaciones encontradas dentro de este periodo consistieron en activaciones fásicas, es decir, un rápido aumento en la tasa de disparo, que no duraba más de 500 ms.

Registramos neuronas que respondían principalmente al tono, como la neurona A en la Figura 8, que, aunque presenta una ligera inhibición (estadísticamente significativa) durante el lengüeteo con recompensa, la mayor modulación se observa durante la emisión del tono. Cabe destacar que esta neurona en particular, responde con la misma intensidad al tono, sin importar el tipo de ensayo que precede. Sin embargo, se encontraron neuronas (Figura 8B) que responden diferencialmente cuando el tono anuncia un ensayo de pellet a cuando antecede un ensayo recompensado con sacarosa.

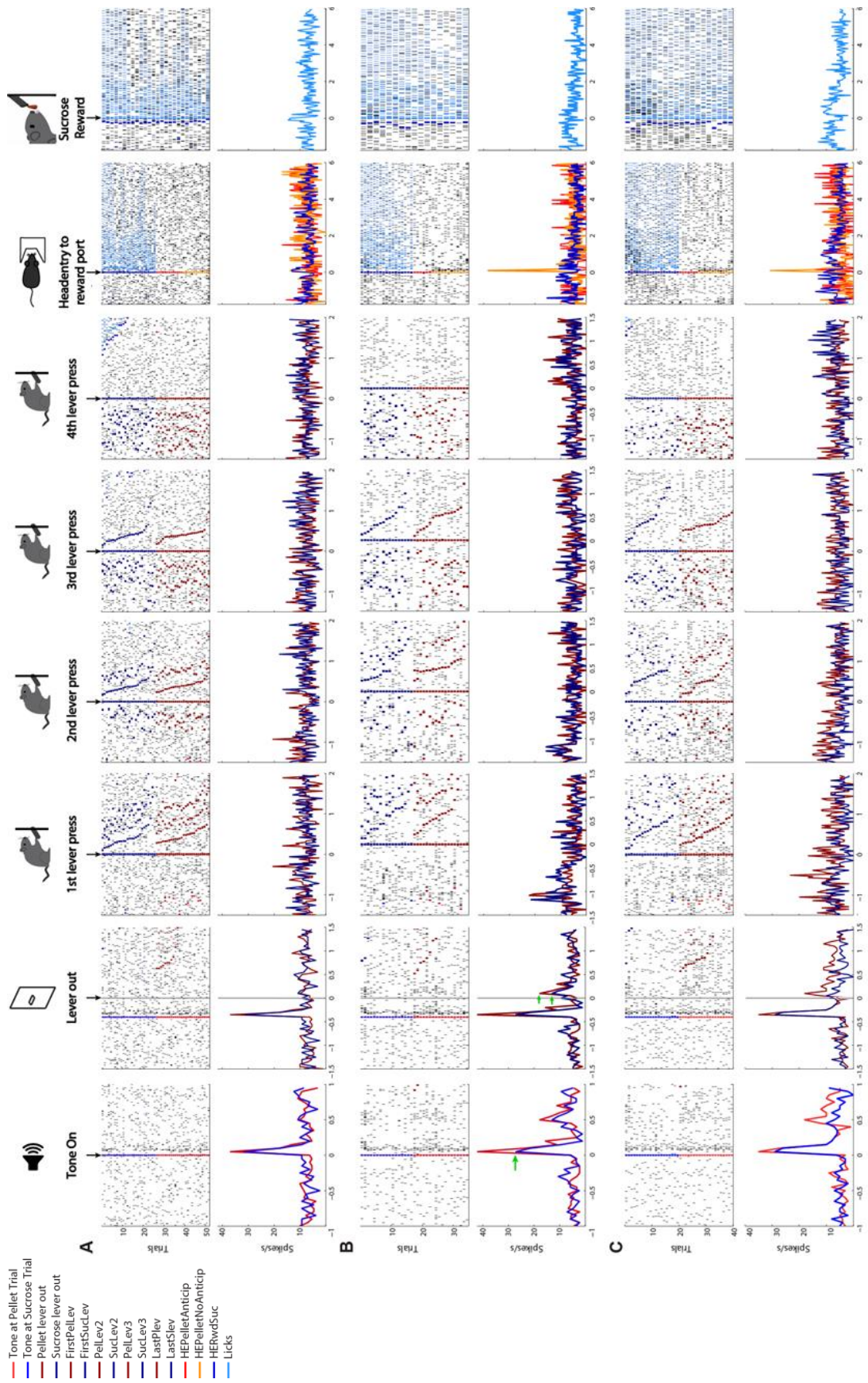


Figura 8. Ejemplos de neuronas moduladas en la fase inicial (apetitiva) del ensayo. Gráficas tipo raster e histogramas periestímulos alineados al tiempo en que ocurre cada uno de los eventos de la tarea, para los eventos en común entre los tipos de ensayo, se separan los ensayos de sacarosa de los de pellet con una codificación de color (azules para los eventos de sacarosa, rojos para los de pellet), que se detalla en los acotamientos. Las flechas verdes indican modulaciones, no distinguibles a simple vista por la escala de la figura.

Algunas de las neuronas que respondían al tono, se encontró que se modulaban también al tiempo en que se expulsaba la palanca correspondiente a cada ensayo (400 ms después de iniciado el tono), como en el caso de las neuronas B y C en la figura anterior. En otras sesiones, encontramos neuronas que se modularon únicamente al ruido producido por la salida de cualquiera de las dos palancas (**Figura 9**).

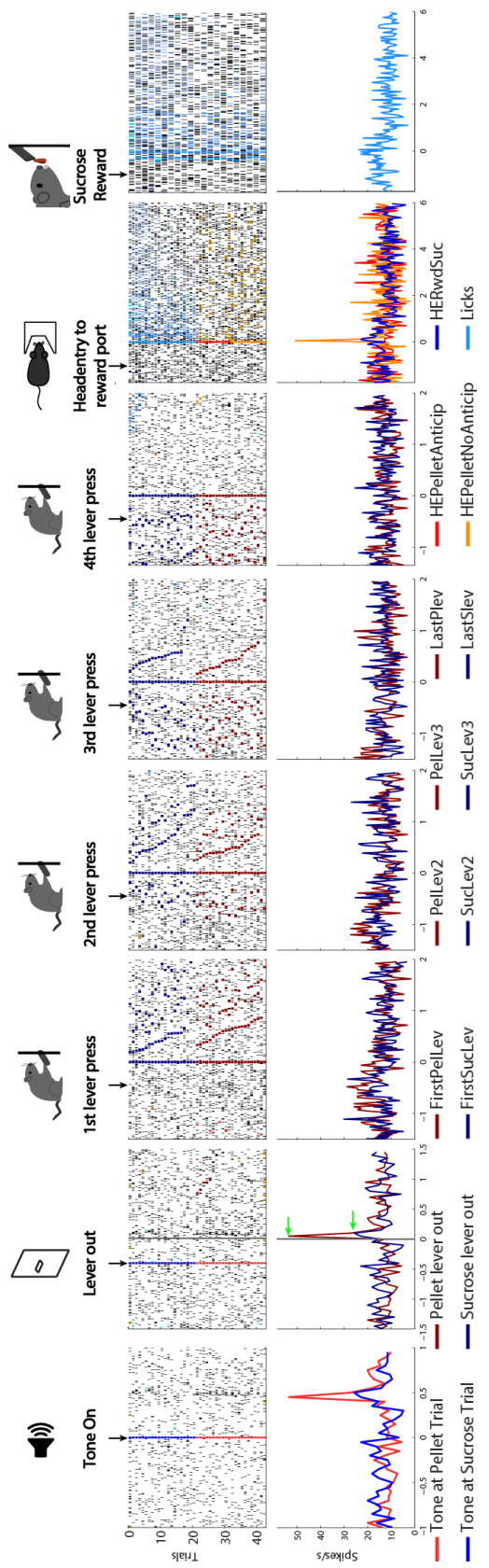


Figura 9. Ejemplo de neurona modulada a la protrusión de la palanca. Gráficas tipo raster e histogramas periestímulos alineados al tiempo en que ocurre cada evento de la tarea (azules para los eventos de sacarosa, rojos para los de pellet).

Modulaciones durante la conducta instrumental (palanqueo)

Nuestro experimento consiste en una razón fija 4 para poder separar dos eventos de alta importancia en la tarea: la acción operante del palanqueo y desplazamiento hacia el puerto de recompensa. La primera implica una conducta instrumental de implicaciones principalmente motoras, mientras que la segunda puede funcionar como parámetro de la motivación del sujeto.

Encontramos que más de el 60% ($n=70$, diferencia entre tipo de ensayos) de las neuronas del NAcSh se inhiben cuando el sujeto realiza los palanqueos. En la Figura 10 se presentan dos ejemplos de neuronas que se inhiben durante el palanqueo.

A pesar de que las evidencias conductuales sugieren que no hay diferencia en desplazamiento hacia el puerto de una recompensa u otra; encontramos que las neuronas del NAcSh se modulan diferencialmente ante este evento. En la Figura 10A observamos que cuando el sujeto se dirige a obtener el reforzador sólido hay un aumento en la actividad neuronal que no ocurre cuando se dirige al puerto de sacarosa (modulación durante el desplazamiento).

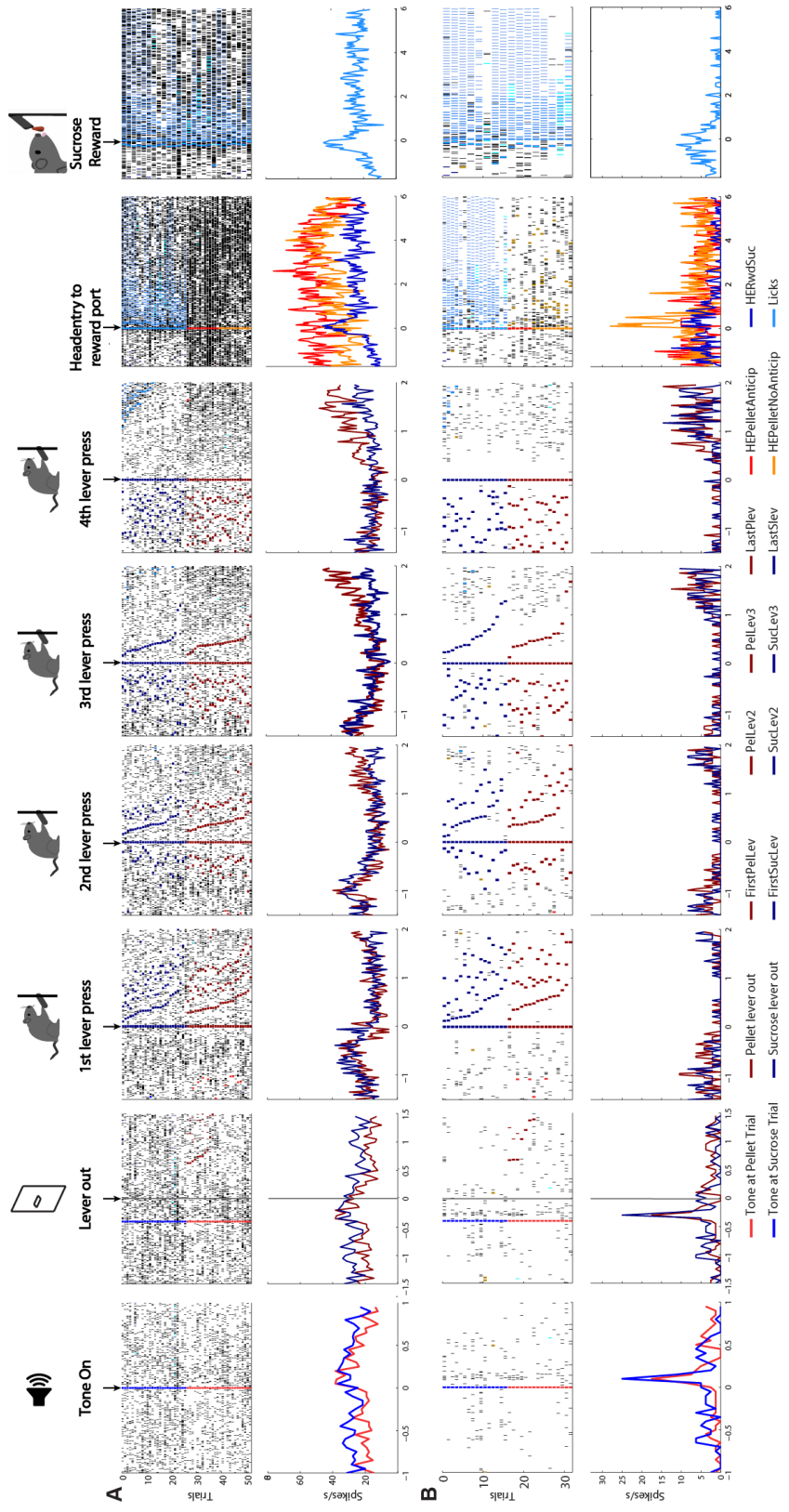


Figura 10. Ejemplos de neuronas moduladas en la conducta instrumental. Gráficas tipo raster e histogramas periestímulos alineados al tiempo en que ocurre cada evento de la tarea (azules para los eventos de sacarosa, rojos para los de pellet). La neurona en 8A es un ejemplo de modulación que inicia al finalizar el último palanqueo y se mantiene durante el desplazamiento al puerto de recompensa. En 8B observamos una neurona con baja tasa de disparo basal que se ve completamente inhibida ante la respuesta operante.

Respuesta de anticipación a la recompensa

Tomando en cuenta que observar el alimento es una conducta básica durante la fase apetitiva de la alimentación y que puede modular fuertemente las neuronas involucradas en el control del comportamiento alimenticio (Betley, et al. 2015) decidimos experimentar con la anticipación de la recompensa en los ensayos de pellet.

Como se indica en los metodos, durante el 50% del total de ensayos de pellet de chocolate se encuentra disponible en el receptáculo tan pronto como el sujeto completa el cuarto palanqueo, mientras que durante los ensayos restantes el pellet caerá únicamente después de que el raton haya ingresado al puerto de recompensa . Esta condición nos permitió encontrar neuronas que se modulan diferencialmente ante la anticipación de la recompensa (**Figura 11**), así como algunas otras que responden ante la “sorpresa” de recibir el reforzador cuando éste no se encuentra disponible con antelación (**Figura 7B** y **Figura 7C**).

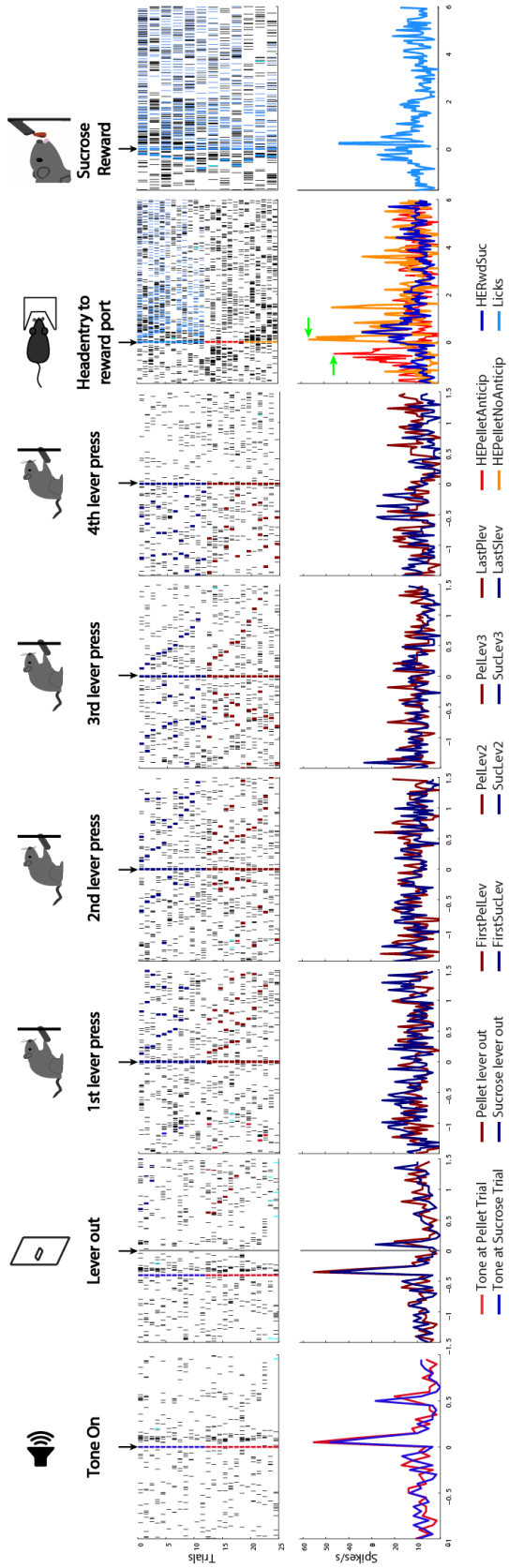


Figura 11. Ejemplo de neurona que modula su actividad ante la anticipación del reforzador. Gráficas tipo raster e histogramas peristímulos alineados al tiempo en que ocurre cada evento de la tarea (azules para los eventos de sacarosa, rojos para los de pellet) de una neurona que tiene una respuesta fásica (indicado con la flecha en verde) durante el desplazamiento cuando el sujeto observa el reforzador en el puerto de entrega de pellet de chocolate; no se anticipa la recompensa, en los que el pico se desplaza hacia la derecha (indicado con la flecha en verde) hasta el momento en que el sujeto ingresa al puerto.

Respuestas Consumatorias

Durante la fase consumatoria, restringimos el análisis de datos únicamente al consumo de recompensa líquida, ya que la disposición de la caja operante y el sistema con el que contamos no nos permite medir los tiempos exactos del consumo del pellet de chocolate.

En la Figura 12 observamos ejemplos de neuronas que, tal como afirman los antecedentes, se inhiben durante el lengüeteo de sacarosa, sin impotar el tipo de respuesta que tuvieron ante los otros eventos de nuestro paradigma conductual.

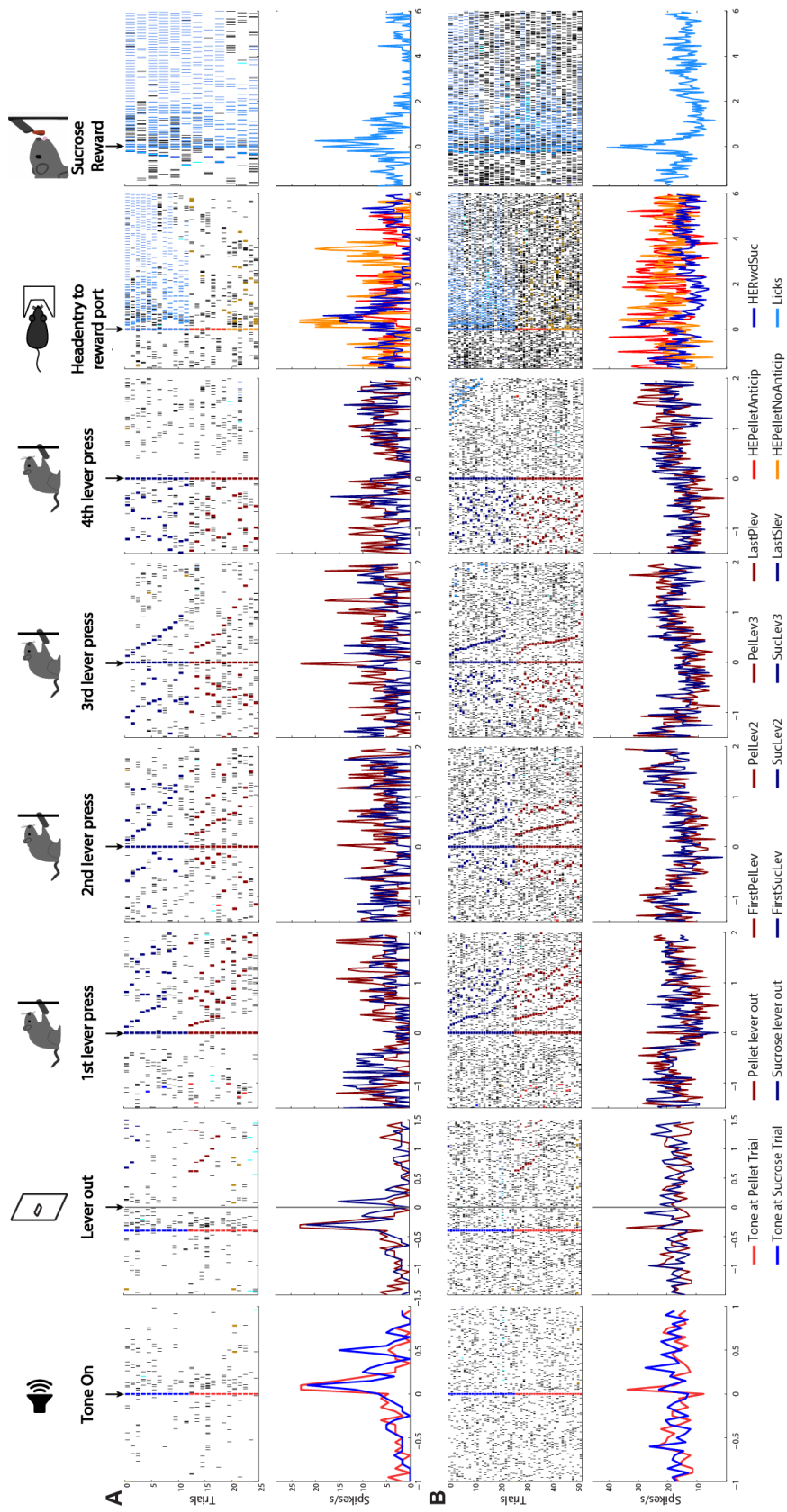


Figura 12. Ejemplos de neuronas con modulaciones durante el consumo de recompensa líquida. Gráficas tipo raster e histogramas peristimulos alineados al tiempo en que ocurre cada evento de la tarea (azules para los eventos de sacarosa, rojos para los de pellet) para dos neuronas que presentan modulaciones en la fase consumatoria. Se destaca una activación fásica cuyo pico se alinea al primer lengüeteo con recompensa, seguida inmediatamente de una inhibición durante el consumo.

IV. Discusión

Esta tarea presenta la oportunidad de consumir dos reforzadores altamente palatables. Durante nuestros estudios piloto para la estandarización de este experimento observamos una fuerte preferencia por el pellet de chocolate (datos no mostrados), consideramos que aunque éste probablemente no estaba cambia el placer que evoca la sacarosa (*liking*), afecta significativamente su valor motivacional, disminuyendo la saliencia del reforzador líquido (*wanting*) (Berridge y Kringelbach, 2015). Se eligió una alta concentración de sacarosa para que está fuera capaz de competir contra el valor hedónico que el sujeto otorga al pellet de chocolate (20% contra una concentración del 10% utilizada en los experimentos piloto).

Observamos también que el aprendizaje (*learning*) afecta el valor de los reforzadores: una vez que optamos por usar una alta concentración de sacarosa, durante nuestras sesiones de entrenamiento no encontramos evidencia estadísticamente significativa para sospechar que el sujeto otorgara un valor motivacional diferente a los reforzadores. Sin embargo, durante el registro electrofisiológico los animales se encuentran más motivados para responder cuando el ensayo es recompensado por pellet de chocolate, lo que sugiere que “aprenden” a conceder más valor a la recompensa sólida. En experimentos futuros, buscaremos implementar análisis de movimiento para evaluar el vigor de desplazamiento con el que el sujeto busca ambas recompensas, de manera que tengamos un nuevo parametro para medir objetivamente la motivación (McGinty, et al. 2013).

En las últimas décadas se proponía que el NAc funcionaba como un switch en la conducta de alimentación; se proponía un papel bidireccional donde ‘apagar’ la actividad del accumbens permitía iniciar y mantener la alimentación, mientras que ‘encender’ detenía inmediatamente el consumo (Stratford et al.,

1997; Krause et al., 2010). El registro electrofisiológico unitario realizado en nuestros experimentos demuestra que la población neuronal del accumbens es altamente heterogénea durante la conducta alimenticia, y que no se limita únicamente al fase consumatoria, que era la más explorada hasta los últimos años.

Los resultados obtenidos con nuestros experimentos coinciden también con el reciente trabajo de Hamid et. al. 2016 donde propone que, las neuronas del NAc integran y comunican señales que guían el comportamiento ante una recompensa: codifican el valor del reforzador y se modulan dinámicamente de acuerdo a la motivación del sujeto en función del aprendizaje (Hamid, et al. 2016).

Actualmente contamos con datos preliminares de la actividad en hipotálamo lateral durante la ejecución de esta tarea, los cuales proponen la posibilidad de confirmar y complementar los hallazgos de Jennings (Jennings, et al. 2015). Buscamos emplear esta tarea con otras técnicas experimentales, como la optogenética y microendoscopía, para continuar explorando la modulación neuronal provocada por los eventos de nuestra tarea, en el NAc y las diversas regiones que se comunican con él (como hipotálamo o el área tegmental ventral), de manera que podamos distinguir entre los efectos provocados por diferentes inputs y diferenciar la modulación entre poblaciones neuronales.

V. Conclusión

Los datos presentados en esta tesis son evidencia de que hemos creado una tarea novedosa, capaz de separar objetivamente la fase apetitiva de la fase consumatoria durante la conducta de alimentación. Los resultados obtenidos durante el registro electrofisiológico respaldan nuestra hipótesis al demostrar que las neuronas del NAcSh se modula ante eventos apetitivos como son estímulos auditivos que anuncian una recompensa (tono condicionado y salida de palanca), así como durante una conducta instrumental y a la anticipación (búsqueda) y consumo de un reforzador (conducta consumatoria); confirmamos también una modulación diferencial ante la presentación de una recompensa líquida y un alimento sólido altamente palatable. Proponemos utilizar esta tarea a la par de otras técnicas (como optogenética y fotometría) así como la posibilidad de implantar en otras regiones cerebrales de interés, con el propósito de explorar a mayor profundidad la participación de las diferentes poblaciones neuronales en el circuito que controlan la alimentación.

VI. Bibliografía

- Ball, G. F., & Balthazart, J. (2008). *How useful is the appetitive and consummatory distinction for our understanding of the neuroendocrine control of sexual behavior?* *Hormones and behavior*, 53(2), 307.
- Berridge, K. C., & Kringelbach, M. L. (2015). *Pleasure systems in the brain.* *Neuron*, 86(3), 646-664.
- Berridge, K. C., & Robinson, T. E. (2003). *Parsing reward.* *Trends in neurosciences*, 26(9), 507-513.
- Burton, A.C., Nakamura, K. & Roesch, M.R., 2015. From ventral-medial to dorsal-lateral striatum: neural correlates of reward-guided decision-making. *Neurobiology of learning and memory*, 117, pp.51–9.
- Castro, D. C., & Berridge, K. C. (2014). Opioid hedonic hotspot in nucleus accumbens shell: mu, delta, and kappa maps for enhancement of sweetness “liking” and “wanting”. *The Journal of Neuroscience*, 34(12), 4239-4250.
- Domjan, M. (2010). *Principios de aprendizaje y conducta.* 6th ed. Mexico, D.F.: Cengage Learning, pp.38-40.
- Gerfen, C. R., & Surmeier, D. J. (2011). Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annual review of neuroscience*, 34, 441.
- Groenewegen, H.J. et al., 1999. Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 877, pp.49–63.
- Gutiérrez, R., Lobo, M. K., Zhang, F., & de Lecea, L. (2011). *Neural integration of reward, arousal, and feeding: recruitment of VTA, lateral hypothalamus, and ventral striatal neurons.* *IUBMB life*, 63(10), 824-830.

- Hamid, A. A., Pettibone, J. R., Mabrouk, O. S., Hetrick, V. L., Schmidt, R., Vander Weele, C. M., ... & Berke, J. D. (2016). Mesolimbic dopamine signals the value of work. *Nature neuroscience*, 19(1), 117-126.
- Heffner, H. E., & Heffner, R. S. (2007). Hearing ranges of laboratory animals. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 46(1), 20-22.
- Jennings, J. H., Ung, R. L., Resendez, S. L., Stamatakis, A. M., Taylor, J. G., Huang, J., ... & Ramakrishnan, C. (2015). *Visualizing hypothalamic network dynamics for appetitive and consummatory behaviors*. *Cell*, 160(3), 516-527.
- Johnson, A. W. (2013). *Eating beyond metabolic need: how environmental cues influence feeding behavior*. *Trends in neurosciences*, 36(2), 101-109.
- Johnson, P.M. and P.J. Kenny, *Dopamine D2 receptors in addiction-like reward dysfunction and compulsive eating in obese rats*. *Nat Neurosci*, 2010
- Kalyanasundar, B., et al., *D1 and D2 antagonists reverse the effects of appetite suppressants on weight loss, food intake, locomotion and rebalance spiking inhibition in the rat NAc shell*. *J Neurophysiol*, 2015: p. jn 00012 2015.
- Kelley, A.E. and K.C. Berridge, *The neuroscience of natural rewards: relevance to addictive drugs*. *J Neurosci*, 2002. 22(9): p. 3306-11.
- Koob, G. F., & Le Moal, M. (2008). Addiction and the brain antireward system. *Annu. Rev. Psychol.*, 59, 29-53.
- Krause, M., et al., *A pause in nucleus accumbens neuron firing is required to initiate and maintain feeding*. *J Neurosci*, 2010. 30(13): p. 4746-56.
- Lutter, M., & Nestler, E. J. (2009). *Homeostatic and hedonic signals interact in the regulation of food intake*. *The Journal of nutrition*, 139(3), 629-632.
- McGinty, V. B., Lardeux, S., Taha, S. A., Kim, J. J., & Nicola, S. M. (2013). Invigoration of reward seeking by cue and proximity encoding in the nucleus accumbens. *Neuron*, 78(5), 910-922.

- Mela, D. J. (2006). Eating for pleasure or just wanting to eat? Reconsidering sensory hedonic responses as a driver of obesity. *Appetite*, 47(1), 10-17.
- Peciña, S. (2008). Opioid reward 'liking' and 'wanting' in the nucleus accumbens. *Physiology & behavior*, 94(5), 675-680.
- Peciña, S., & Berridge, K. C. (2005). Hedonic Hot Spot in Nucleus Accumbens Shell: Where Do μ -Opioids Cause Increased Hedonic Impact of Sweetness? *The Journal of Neuroscience*, 25 (50) 11777-11786; DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2329-05.2005
- Rossi, M. A., & Yin, H. H. (2012). Methods for studying habitual behavior in mice. *Current Protocols in Neuroscience*, 8-29.
- Russo, S. J., & Nestler, E. J. (2013). The brain reward circuitry in mood disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(9), 609-625.
- Sesack, S.R. & Grace, A.A., 2010. Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology europsychopharmacology et work: microcircuitry. uitrNeuropsychopharmacology*, 35(1), pp.27–47.
- Song, S.S. et al., 2014. Optogenetics reveals a role for accumbal medium spiny neurons expressing dopamine D2 receptors in cocaine-induced behavioral sensitization. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 8, p.336.
- Stratford, T. R., & Kelley, A. E. (1997). *GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior*. *The Journal of neuroscience*, 17(11), 4434-4440.
- Turner, J. G., Parrish, J. L., Hughes, L. F., Toth, L. A., & Caspary, D. M. (2005). Hearing in laboratory animals: strain differences and nonauditory effects of noise. *Comparative medicine*, 55(1), 12-23.
- Volkow, N.D. and R.D. Baler, *Addiction science: Uncovering neurobiological complexity*. *Neuropharmacology*, 2014. 76 Pt B: p. 235-49.